Impacts de la disponibilité en sulfate sur la physiologie de la feuille et sur la qualité, le métabolisme soufré et la germination de la graine de colza

Philippe d'Hooghe

▶ **To cite this version:**

Philippe d'Hooghe. Impacts de la disponibilité en sulfate sur la physiologie de la feuille et sur la qualité, le métabolisme soufré et la germination de la graine de colza. Biologie végétale. Université de Caen, 2013. Français. NNT : . tel-00937062

HAL Id: tel-00937062

https://theses.hal.science/tel-00937062

Submitted on 27 Jan 2014

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

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

Université de Caen Basse-Normandie

Ecole doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Thèse de doctorat

présentée et soutenue le : 11/12/2013

par

Philippe D'HOOGHE

en vue de l'obtention du

Doctorat de l'Université de Caen Basse-Normandie

Spécialité : Biologie animale et végétale

Impacts de la disponibilité en sulfate sur la physiologie de la feuille et sur la qualité, le métabolisme soufré et la germination de la graine de colza.

Directeur de thèse : Pr Jean-Christophe AVICE
Co-encadrant : Dr Jacques TROUVERIE

Membres du Jury

Marie-Pascale PRUD'HOMME, Professeur, Université de Caen Basse-Normandie	(Présidente)
Jean-Claude DAVIDIAN, Professeur, Montpellier SUP-Agro	(Rapporteur)
Dominique JOB, Directeur de recherche, CNRS/Bayer CropScience Lyon	(Rapporteur)
Karine GALLARDO, Chargée de recherche, UMR Agroécologie de Dijon	(Examinatrice)
Jean-Christophe AVICE, Professeur, Université de Caen Basse-Normandie	(Directeur de thèse)
Jacques TROUVERIE, Maitre de conférences, Université de Caen Basse-Normandie	(Co-encadrant)

Ces trois dernières années furent pour moi riches de nombreuses rencontres, et j'espère réussir, dans ces quelques pages, à remercier chaque personne qui m'aura apporté son soutien et aura contribué à l'achèvement de cette thèse.

En premier lieu, je tiens à remercier le Pr. Marie-Pascale Prud'homme, pour sa bienveillance à mon égard, pour l'attention et la considération qu'elle porte à chaque doctorant et pour la qualité de son engagement et de son travail en tant que Directrice d'Unité de l'UMR EVA. Marie, j'ai beaucoup d'affection pour toi, tu es une personne sur qui l'on peut compter et je souhaite que l'avenir t'apporte de nombreux instants de joie et de bonheur. Je remercie également le Pr. Philippe Lainé, Directeur Adjoint de l'UMR, que j'ai appris à connaître davantage au cours de ces quelques années et avec qui je garde de très bons souvenirs. Chers directeurs, vous avez su être à mon écoute lorsque j'en avais besoin et je n'oublierai pas cela.

Il est maintenant temps pour moi d'exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse, le Pr. Jean-Christophe Avice. Merci en premier lieu de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche dès ma 3ème année de licence et de m'avoir, depuis, accordé ta confiance qui m'a permis de m'épanouir dans mes travaux et de tenir la cadence durant ces 3 années. Merci également de m'avoir soutenu dans mes envies de collaborations, de congrès, de formations et d'enseignement et de m'avoir formé à l'encadrement de stagiaires.

Je tiens à remercier également mon co-encadrant, le Dr. Jacques Trouverie pour son écoute attentionnée, son aide quotidienne et ses précieux conseils, qui m'ont aidé à voler de mes propres ailes. Merci également de m'avoir permis d'encadrer Dimitri Picot avec toi, ce fut une expérience très enrichissante.

Messieurs, ce fut un vrai plaisir de travailler avec vous. Votre soutien constant et vos conseils avisés m'ont permis d'évoluer dans mes conceptions de la recherche scientifique et de la façon de la mener. Votre présence rassurante et votre grande ouverture d'esprit m'ont beaucoup apporté. Merci également pour votre soutien et votre attention lors de la période difficile que j'ai eu récemment à traverser. Si cela était possible, je souhaiterais à chaque doctorant d'avoir des encadrants tels que vous.

Je remercie également le Pr. Alain Ourry, anciennement directeur de l'EdNBISE, pour l'aide financière apportée à mon déplacement à Prague lors du « 13th Rapeseed congress », où j'ai eu l'occasion de présenter une partie de mes travaux sous forme d'un poster. Un grand merci, Alain, pour l'intérêt que tu as porté à mon travail, pour la pertinence des questions que tu m'as posées lors de mes diverses présentations et qui m'ont beaucoup apporté, et pour m'avoir permis de présenter les résultats obtenus sur l'impact de la limitation en S sur la qualité de la graine aux partenaires du projet Sérapis.

Je suis très honoré que le Pr. Dominique Job et le Pr. Jean-Claude Davidian aient accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, et je souhaite leur exprimer ma grattitude.

Je remercie également chaleureusement le Dr. Karine Gallardo et le Pr. Marie-Pascale Prud'homme pour leur présence à la table de mon jury de thèse.

Au cours de cette thèse, j'ai eu la chance de collaborer avec le Dr. Karine Gallardo, de l'UMR Agroécologie (Dijon, anciennement UMR LEG), notamment experte en protéomique de la graine, et le Dr. Stanislav Kopriva, « Project leader » au John Innes Centre (Norwich, UK), connu pour l'excellence de ces travaux portant sur le métabolisme soufré d'*Arabidopsis thaliana*. Je suis très heureux d'avoir pu rencontrer ces chercheurs qui m'ont chaleureusement accueilli dans leurs laboratoires respectifs et ont accepté de suivre mes travaux, notamment à travers mon comité de pilotage de thèse, mais aussi en relisant attentivement et en apportant leur expertise à l'article décrivant les impacts de la limitation en S sur la qualité de la graine de colza. Je vous souhaite à chacun de continuer à vous épanouir (et à vous éclater !) dans vos domaines respectifs, et j'espère, par ma petite contribution, avoir fait honneur à vos travaux de recherche. Lors de mon déplacement à l'UMR LEG de Dijon, j'ai également rencontré Delphine Aimé, qui m'a accompagné, aidé et soutenu dans chaque étape de l'analyse du protéome de la graine de colza et avec qui j'ai partagé de très intéressantes conversations. Merci Delphine pour ton aide et ta gentillesse ! Mes deux déplacements en Angleterre m'ont aussi permis de rencontrer Anna Koprivova, qui m'a apporté son aide, au jour le jour, dans la réalisation de mes expérimentations, et avec qui j'ai partagé de très intéressantes discussions. Mes pensées vont également à Patrycja Baraniecka, actuelle doctorante de Stanislav Kopriva, et à Dalibor Hùska, jeune docteur, avec qui je garde d'excellents souvenirs et que je pense pouvoir désormais compter parmi mes amis. Même s'il y a peu de chance pour que vous lisiez ces mots, et surtout, pour que vous en compreniez le sens sans l'aide de « Google traduction », je vous souhaite à chacun une vie pleine de belles choses. Patrycja, permet moi de t'envoyer un maximum de bonnes vibrations, qui, je l'espère, te permettront de finir ta thèse avec l'esprit serein. Dali, mon ami, j'ai eu souvent l'impression de me voir dans un miroir en te regardant et d'entendre l'écho de mes pensées dans tes paroles. J'espère que tes projets se réaliseront comme tu l'entends et gouter ton miel très prochainement !

Je tiens également à remercier le Dr. Lucie Dubousset, pour sa grande disponibilité et pour l'attention qu'elle a portée à mes travaux de recherche.

Un grand merci au Pr. Dimitris Bouranis, de l'université d'Athènes, pour m'avoir permis de présenter une partie de mes travaux lors du « 4th Sulphyton », ainsi qu'à sa chaleureuse équipe, notamment Stella et Yiorgos, avec qui j'ai passé de très bons moments.

Les filles, mes chères, je me suis vraiment éclaté avec vous… Je garde tellement de bons souvenirs !! Dans les phrases qui suivent, je vais vous remercier, mais sachez que mes pensées vont au delà de ce que je pourrais dire avec de simples mots. Si je fais un « tir groupé », c'est surtout pour éviter la création d'un nouveau chapitre à cette thèse. Ce fut vraiment pour moi un plaisir de vous rencontrer, de travailler, mais surtout simplement de vivre ces moments avec chacune d'entre vous. J'espère vous avoir suffisamment fait

partager les expérimentations sur lesquelles vous m'avez apporté votre aide précieuse ! Les nombreuses tranches de rire que l'on a eues ensemble resteront gravées dans ma mémoire. Anne-Françoise, tu as été pour moi d'une aide incomparable au cours de ces 3 années… Mais merci avant tout pour ton amitié, que j'espère mériter. Merci également pour tous ces moments passés en serre à s'occuper des petites poulettes et à ouvrir notre cœur et notre esprit sur des sujets multiples. Permets moi de te féliciter pour le courage avec lequel tu mènes ta vie… Je te souhaite plein de bonheur, mon amie, car tu le mérites !! Ces mots sonnent peut être comme une fin, mais ce n'est que le début d'un longue amitié ! Magali, Josiane, Julie, merci d'abord pour votre aide, votre présence de chaque instant ainsi que pour la rigueur de votre travail. Vous savez que cette thèse n'aurait pas été ce qu'elle est sans vous. Je tiens également à remercier Marie-Paule et Josette, pour leur contribution importante dans ce travail de thèse, et, d'une manière générale, pour la qualité de leur travail, indispensable aux expérimentations menées au laboratoire. Votre gentillesse et votre chaleur m'ont beaucoup apporté au cours de ces années. Sophie (V.), merci pour ton aide dans la complétion des tâches administratives (parfois à la dernière seconde, j'en suis désolé) et pour ton humour que j'adore !

Je remercie chaleureusement chaque enseignant-chercheur de ce laboratoire que j'affectionne pour le savoir qu'ils m'ont transmis durant ces 8 années, et pour l'amour que je porte à la physiologie végétale, qui avait déjà germé en moi, mais qu'ils ont cultivé avec passion. Un grand merci également à Marie-Laure, Patrick, Dominique et Bénédicte, pour leur aide précieuse dans les expérimentations que j'ai eu à mener. J'adresse un remerciement particulier à ma très chère Sophie (BM), courageuse Dr. animatrice des fameux « séminaires du jeudi », lesquels, de par les échanges qu'ils créent, contribuent fortement à la bonne ambiance du laboratoire. Merci à toi pour ces échanges professionnels fructueux. D'ailleurs, pardonne-moi de ne pas avoir pu intégrer les résultats obtenus sur le développement des graines de Yudal… Mais, bon, fini de parler boulot ! Merci également pour ton précieux soutien. Et merci pour tes rires à mes blagues idiotes… Je t'adore !

Merci également à Julien Besnard et Dimitri Picot, mes stagiaires, pour leur travail de qualité. Encadrer votre travail m'a beaucoup appris ! Je remercie également Noémie et Amélie, pour leur aide lors de la transplantation des colzas.

Ces remerciements seraient incomplets si je n'adressais pas quelques mots à mes camarades doctorants. Je ne sais par où commencer… Alors je vais simplement vous dire que je me suis vraiment éclaté avec vous au jour le jour dans notre bureau, dans les couloirs, mais aussi dans nos soirées (parfois quelque peu arrosées). Je vous souhaite à chacun une bonne fin, une bonne continuation, ou un bon début de thèse, et j'espère que vous prendrez soin de cette bonne ambiance qui règne entre vous.

Ivàn, c'était un vrai plaisir de te rencontrer. J'espère te revoir bientôt en Espagne et partager encore de supers moments avec toi !

J’ai également une pensée pour mes prédécesseurs, et plus particulièrement pour les Dr. Alexandre Berthier et Mustapha Arkoun, avec qui je me suis toujours bien entendu et grâce à qui j’ai beaucoup appris.

Je remercie chacun des étudiants de L1 de Biologie végétale (des promotions 2010-2011 et 2011-2012) pour m’avoir permis de faire mes armes d’enseignant. Sait-on jamais, peut être l’un d’entre vous sera amené à lire ces quelques lignes et se rappellera à mon bon (ou mauvais) souvenir ! J’espère simplement avoir réussi à vous faire découvrir et à vous intéresser aux merveilles du monde végétal. Merci au Pr. Pascal Claquin ainsi qu’aux Drs. Isabelle Mussio, Juliette Fauchot et Anne-Marie Rusig, enseignant chaque année la Biologie Végétale aux L1, pour leurs conseils, leur grande disponibilité et leur gentillesse.

Mes potos, Julien, Nico, Raph, Sacha, PMF, votre amitié et votre soutien furent pour moi d’une grande aide au cours de ces 3 années. Je me souviendrais toujours de ces moments passés avec vous, qui resteront parmi les plus cool de ma vie. Vous savez chacun que je vous adore… C’est quand même pas pareil de travailler sans vous…

Charlotte, ma pineco, merci pour tout. Tu es une fille extraordinaire et je suis très fier de te compter parmi mes amis les plus chers. Merci pour tout ce que tu m’as apporté… J’aurai aimé que l’on puisse se voir plus souvent au cours de ces années et partager davantage encore. Je souhaite que tu t’éclates à fond en Allemagne car, quoi que tu en dises, je pense que tu es une future très grande chercheuse !

Benji, Elo, Vinc’, Oré, sans vos amitiés et tout ce qu’elles m’apportent, je ne crois pas que j’aurais pu aller au bout de cette thèse sans devenir quelqu’un d’autre. Sachez simplement que je pense à vous chaque jour. Nono, merci pour ton soutien sans faille ! Kevin, mon hobbit, je te souhaite tout le bonheur que tu mérites.

Ma smala, je vous aime ! Papa, moune, merci pour l’amour des sciences et des plantes que je tiens de vous. Ce serait « bateau » d’écrire que si je suis l’homme que je suis devenu, c’est grâce à vous, mais je me permets tout de même de le faire. Vous avez toujours été présents à mes côtés et je souhaite que cela dure longtemps encore…

Depuis que j’ai rencontré Calypso, ma famille s’est agrandie (assez brusquement)… Je veux adresser un mot particulier à Patricia et Eric Sohier, mes beaux parents, qui sont bien plus que cela à mes yeux. Merci pour votre confiance, et merci de me considérer comme vous le faites, presque comme un fils… Et merci pour ces choses sur lesquelles je ne souhaite pas m’étaler dans ces pages…

Calypso, ma femme… Aucun mot ne permettrait de décrire ce que je ressens pour toi et ce que je te dois. Sans toi, rien n’aurait été possible et rien ne le serait… Tu es ce que j’ai de plus cher sur cette terre (et je n’ai aucune possession dans l’espace). Avec toi, durant ces 8 années passées à tes côtés, j’ai grandit. L’avenir nous comblera de bonheur, j’en suis certain.

Table des matières

TABLE DES MATIERES **1**

LISTE DES ABREVIATIONS **8**

CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE **12**

A Contexte général 12

B Objectifs généraux et plan de thèse 14

CHAPITRE II : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **16**

A Généralités sur le colza, enjeux économiques et contexte agro-environnnemental 16

A – 1 Place du colza dans la filière des oléoprotéagineux *16*

A – 2 Cycle de développement du colza et bilan agro-environnemental *18*

A – 2.a Cycle de développement du colza 18

A – 2.b Bilan agro-environnemental 19

B La nutrition soufrée chez les Brassicacées 20

B – 1 Les composés soufrés et leurs rôles chez les végétaux *20*

B – 2 Acquisition, transport et assimilation du soufre *22*

B – 2.a Absorption et transport du S chez les Brassicacées 22

B – 2.b Assimilation du S chez les Brassicacées 25

B – 3 Réponses des Brassicacées à la limitation en S *27*

B – 3.a Réponses métaboliques et transcriptomiques 28

B – 3.b Réponses physiologiques et symptômes de déficience en S 34

C La graine de colza : développement, remplissage et germination 35

C – 1 Développement de la graine *35*

C – 2 Réserves lipidiques et protéiques *37*

C – 2.a Les lipides de réserve 37

C – 2.b Les protéines de réserves séminales 39

C – 3 Germination et croissance de la plantule *39*

C – 3.a Germination sensu stricto 40

C – 3.b Evènements post-germinatifs 40

D La graine et le métabolisme soufré 41

D – 1 Transport du S dans la graine en développement *41*

D – 2 Métabolisme du S dans la graine en développement *43*

D – 3 Régulation de la germination et implication du S dans les processus germinatifs et post-germinatifs *44*

D – 4 Conséquences d'une oligotrophisation en S sur le rendement grainier, la qualité, la viabilité et le métabolisme soufré de la graine *46*

E Plan de recherche : Objectifs, hypothèses de travail et démarches associées 48

E – 1 Identifier des processus métaboliques impliqués dans la réponse du colza à la limitation en S (Chapitre IV) *48*

E – 2 Déterminer l'impact d'une restriction en S appliquée aux stades GS32, GS53 et GS70 sur la qualité de la graine de colza (Chapitre V) *49*

E – 3 Mettre en évidence la capacité d'assimilation du sulfate au niveau de la graine et du péricarpe et étudier l'impact de la limitation en S sur le développement de la graine et son métabolisme soufré (Chapitre VI) *50*

E – 4 Étudier l'impact de la limitation en S sur la capacité germinative et la viabilité des graines produites (Chapitre VII) *51*

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES **54**

A Matériel végétal et conditions de cultures 54

A – 1 Dispositif expérimental mis en place pour l'étude d'une restriction en sulfate appliquée au stade rosette sur la physiologie et le protéome d'une jeune feuille de colza d'hiver *54*

A – 2 Dispositif expérimental mis en place pour l'étude de l'effet de restrictions en sulfate appliquées à différents stades du développement sur la qualité de la graine de colza d'hiver *55*

A – 3 Dispositif expérimental mis en place pour l'étude de l'effet de restrictions en sulfate appliquées à deux génotypes de colza d'hiver sur la remobilisation du S, son métabolisme dans la graine en développement et sur les composantes du rendement *56*

A – 3.a Conditions de culture 56

A – 3.b Dispositif expérimental mis en place pour la mise en évidence et l'étude de l'assimilation du sulfate par la graine et le péricarpe en réponse à une restriction en sulfate appliquée au stade GS53 (inflorescence principale dégagée) 57

A – 4 Dispositif expérimental mis en place pour l'étude de l'effet de limitations et de restrictions en sulfate sur la germination des graines produites et la gestion du S au cours de la germination et des évènements post-germinatifs *58*

A – 4.a Production de graines en condition de restrictions de l'apport de S à différents stades de développement (cv. Capitol) 58

A – 4.b Production de graines sous différents niveaux de nutrition S (cv. Yudal) 58

A – 4.c Tests de germination 58

A – 4.d Dispositif expérimental mis en place pour étudier la capacité d'assimilation du sulfate par les plantules de la variété Yudal 59

B Mesures de l'état physiologique de la plante 59

B – 1 Mesure de l'activité photosynthétique, de la teneur en chlorophylles, en flavonols et en anthocyanes *59*

B – 2 Détermination de la surface foliaire et de la biomasse des différents organes *60*

C Détermination de la vigueur et de la capacité germinative 60

C – 1 Calcul des indices de germination 60

C – 2 Détermination du taux de plantules ayant un développement normal 61

D Analyses biochimiques 61

D – 1 Détermination des teneurs en S et N totales et de la composition isotopique en ^{34}S *61*

D – 2 Méthode utilisée pour le calcul de flux de S remobilisé (provenant des réserves) et alloué (issu de l'absorption) *62*

D – 3 Extraction, dosage du sulfate et détermination de la composition isotopique en ^{34}S-sulfate *64*

D – 4 Détermination des teneurs en sulfite, cysteine, γ-glutamylcysteine (γ-EC), et glutathion total par HPLC *65*

D – 5 Détermination de la teneur en H_2O_2 ..... *65*

D – 6 Détermination de la composition en acides aminés *66*

E Analyses du contenu et de la composition protéiques 66

E – 1 Extraction, dosage des protéines solubles et détermination de la composition en N, S, et ^{34}S 66

E – 2 Analyse du protéome de la jeune feuille en réponse à une restriction de l'apport de S au stade rosette 67

E – 2.a Extraction et dosage des protéines totales 67

E – 2.b Electrophorèse bidimensionnelle (2-DE) 68

E – 2.c Coloration et analyses des gels 69

E – 2.d Séquençage des protéines d'intérêt par LC MS/MS 69

E – 3 Analyse du protéome de la graine mature en réponse à une restriction de l'apport de S aux stades GS32 (début de montaison), GS53 (inflorescence principale dégagée) et GS70 (chute des premiers pétales). 71

E – 3.a Extraction et dosage des protéines totales 71

E – 3.b Electrophorèse bidimensionnelle (2-DE) 71

E – 3.c Coloration et analyses des gels 72

E – 3.d Séquençage des protéines d'intérêt par LC MS/MS 72

F Détermination des teneurs en huile, en protéines et en glucosinolates et analyse de la composition lipidique des graines 73

F – 1 Détermination des teneurs en huile, en protéines et en glucosinolates par Near InfraRed Spectroscopy (NIRS) 73

F – 2 Extraction et quantification de l'huile et détermination de la composition lipidique 74

F – 2.a Extraction des lipides et dérivatisation des acides gras 74

F – 2.b Chromatographie en phase gazeuse 74

G Mesures des activités enzymatiques ATPS et APR dans la graine de colza en développement 75

G – 1 Préparation de l'extrait protéique 75

G – 2 Mesure de l'activité ATPS 75

G – 3 Mesure de l'activité APR 76

H Analyse de l'expression des gènes 77

H – 1 Extraction des ARN_{totaux} et reverse transcription (RT) 77

H – 2 Analyse de l'expression des gènes par PCR quantitative (Q-PCR) 78

H – 3 Calcul de l'expression relative par la méthode des « delta-delta de Ct » : 78

I Exploitation statistique des données 79

CHAPITRE IV : SULPHUR LIMITATION PROVOKES PHYSIOLOGICAL AND LEAF PROTEOME CHANGES IN OILSEED RAPE THAT LEAD TO PERTURBATION OF SULPHUR, CARBON AND OXIDATIVE METABOLISMS 82

Abstract 83

A Background 84

B Results 85

B – 1 Impact of S limitation on physiological parameters 85

B – 2 S restriction affects the young leaf proteome 86

C Discussion 88

C – 1 S limitation at the rosette stage does not change the total shoot biomass but inhibits growth and photosynthesis of young leaves 88

C – 2 Proteins associated with S metabolism and remobilisation of S compounds are specifically modulated by S restriction *88*

C – 3 Proteins involved in C metabolism and processes related to energy production are impacted by S restriction *90*

C – 4 S restriction provokes physiological and proteomic changes related to oxidative stress in young leaves *92*

D Conclusions 93

E Methods 94

E – 1 Plant material, experimental treatments and tissue sampling *94*

E – 2 Measurement of physiological parameters during application of treatments *95*

E – 3 S and ^{34}S analysis *95*

E – 4 Determination of H_2O_2 content *96*

E – 5 Extraction and determination of total proteins *96*

E – 6 Two–dimensional electrophoresis (2–DE) and image analysis *97*

E – 7 Protein Identification by ESI LC–MS/MS *97*

E – 8 Statistics *98*

CHAPITRE V : EVIDENCE FOR PROTEOMIC AND METABOLIC ADAPTATIONS ASSOCIATED TO ALTERATIONS OF SEED YIELD AND QUALITY IN SULPHUR-LIMITED *BRASSICA NAPUS* L. 100

Summary 101

A Introduction 102

B Experimental procedures 104

B – 1 Experimental treatments and tissue sampling *104*

B – 2 Determination of total S and S-proteic contents *104*

B – 3 Extraction and quantification of sulphate content *105*

B – 4 Determination of free cysteine and total glutathione contents by HPLC *105*

B – 5 Determination of oil, proteins and glucosinolates contents by NIRS *105*

B – 6 Extraction and quantification of oil content and lipids composition *106*

B – 7 Two–dimensional electrophoresis (2–DE) and image analysis *106*

B – 8 Protein Identification by electrospray ionization liquid chromatography–tandem mass spectrometry *107*

B – 9 Statistics *108*

C Results 108

C – 1 Impact of S limitation on yield components, quality and S status in mature seeds *108*

C – 2 Modifications in the seed proteome in response to S limitation *109*

C – 2.a Modulations of SSP, proteins involved in protein synthesis and processing, and LEA 109

C – 2.b Proteome changes related to S, N metabolisms, cell structure, growth and signal transduction 111

C – 2.c Modulations of proteins involved in lipid storage, C metabolism and Energy 112

C – 2.d Modulation of proteins involved in plant stress response and lectins 113

D Discussion 113

D – 1 Seed oil content and quality are impacted by an early S limitation, related to disturbance of C metabolism and energy *114*

D – 2 Seed metabolic changes induced in response to S limitation may contribute to maintain protein content but not quality. 115

D – 3 Proteins involved in plant stress response exhibit different responses depending on the severity of S limitation. 116

D – 4 Numerous protein modulations could have negative impacts on germination and seedling development. 118

CHAPITRE VI : DEMONSTRATION OF THE ABILITY TO ASSIMILATE SULPHATE IN *BRASSICA NAPUS* DEVELOPING SEEDS AND POD WALLS AND IMPACT OF S RESTRICTION ON SEED DEVELOPMENT AND SEED S METABOLISM . 121

VIA : A SPECIFIC METHOD OF ^{34}S LABELLING PROVIDES EVIDENCE THAT SULPHATE ASSIMILATION OCCURS IN DEVELOPING SEEDS AND POD WALLS OF *BRASSICA NAPUS* L. 121

Abstract 122

A Introduction 123

B Experimental 124

B – 1 Experimental treatments and tissue sampling 124

B – 2 $^{34}SO_4^{2-}$ feeding method for testing S assimilation in isolated pod walls and seeds 125

B – 3 Determination of total S, S-proteic content and corresponding ^{34}S labelling. 125

B – 4 Determination of sulphate content and ^{34}S-sulphate labelling 126

B – 5 Analysis of amino acids profiles in pod walls and seeds 126

B – 6 Statistics 127

C Results 127

C – 1 Seed and pod walls status before $^{34}SO_4^{2-}$ feeding 127

C – 2 Impacts of 24h-$^{34}SO_4^{2-}$ feeding on biomass, S contents and ^{34}S labelling in isolated pod walls and seeds 128

C – 3 Effects of 24h-$^{34}SO_4^{2-}$ feeding on S-sulphate contents and ^{34}S-sulphate labelling 128

C – 4 Impacts of 24h-$^{34}SO_4^{2-}$ feeding on protein, S-proteic contents and ^{34}S-proteic labelling 128

C – 5 Effects of 24h-$^{34}SO_4^{2-}$ feeding on amino acids patterns 128

D Discussion 129

D – 1 S status of seeds and pod walls are differently impacted by sulphate restriction applied at visible buds stage. 129

D – 2 Seeds are able to rapidly incorporate S as SO_4^{2-} independently of their initial S status. 129

D – 3 Pod walls proteins undergo a turnover in HS and LS conditions. 131

E Conclusion 132

VIB : S MANAGEMENT BY *BRASSICA NAPUS* SEEDS IN CONNECTION WITH S FLOWS AT THE WHOLE PLANT LEVEL. A COMPARATIVE STUDY OF TWO GENOTYPES EXHIBITING DIFFERENT NUMBER OF SEEDS PRODUCED PER PLANT. **..... 133**

Abstract 134

A Introduction 135

B Material and methods 137

B – 1 Experimental treatments and tissue sampling 137

B – 2 S, N and ^{34}S analysis 138

B – 3 Calculation of S remobilisation 138

B – 4 Determination of seed yield components *139*
B – 5 Extraction and quantification of proteins, S-proteic and N-proteic contents *139*
B – 6 Quantification of sulphate amount *139*
B – 7 Quantification of sulphite, γ-glutamylcysteine (γ-EC) and total glutathione amounts by HPLC *140*
B – 8 Determination of ATPS and APR activities *140*
B – 9 Statistics *140*
C Results 140
C – 1 Seed yield, yield components, SHI, NHI, SUtE and NUtE *140*
C – 2 Changes in S remobilization and S allocation flows *141*
C – 3 Evolution of seed dry weight, S, N and N/S ratio in developing seeds *142*
C – 4 Changes in S-sulphate amounts and S-sulphate/S ratio in developing seeds *143*
C – 5 Evolution of protein, S-proteic amounts, S-proteic/S and N/S_p ratio *144*
C – 6 Changes in thiols amounts *144*
C – 7 Evolution of ATPS and APR activities *145*
D Discussion 145
D – 1 S restriction reduced seed yield of Capitol by affecting the number of seeds produced per plant *145*
D – 2 S remobilisation in LS treated plants is enhanced earlier for Aviso than for Capitol. *146*
D – 3 S metabolism in developing seeds is modulated by S restriction *147*
E Conclusion 148

CHAPITRE VII : GERMINATIVE AND POST-GERMINATIVE BEHAVIOURS OF *BRASSICA NAPUS* SEEDS ARE IMPACTED BY THE SEVERITY OF S LIMITATION APPLIED TO THE MOTHER PLANTS. 151
Abstract 152
A Introduction 153
B Material and methods 154
B – 1 Seeds and plant material *155*
B – 1.a Production of seeds from plants submitted to S limitation applied at different growth stages (Experiment 1, cv. Capitol) 155
B – 1.b Production of seeds from plants supplied with different levels of sulphate (Experiment 2, cv. Yudal) 155
B – 1.c Protocol for studying the development and sulphate uptake capacities of seedlings coming from seeds produced by plants supplied with suboptimal levels of sulphate from the beginning of the plant growth cycle (Experiment 2, cv. Yudal) 155
B – 2 Germination tests *156*
B – 3 Germination indexes *156*
B – 4 Determination of normal seedling rate *157*
B – 5 Biochemical and molecular analyses *157*
B – 5.a S and ^{34}S analysis 157
B – 5.b Determination of S-sulphate amount 157
B – 5.c Determination of S-proteic amount 158
B – 5.d Determination of protein amount 158
B – 5.e Determination of sulphite, cysteine, γ-glutamylcysteine (γ-EC) and total glutathione amounts by HPLC 158

B – 5.f Relative expression of BnSultr1 genes using Q-PCR 158
B – 6 Statistics.....*159*
C Results.....160
C – 1 Impacts of S limitation applied at different growth stages on S status of seeds and consequences for germination and seedlings establishment (Experiment 1, cv. Capitol) ..160
C – 2 Biochemical changes associated to the germination of seeds obtained from plants subjected to S limitation applied at different growth stages (Experiment 1, cv. Capitol)...160
C – 3 Impacts of suboptimal levels of sulphate applied from the beginning of the plant growth cycle on S status of seeds and consequences on germination and seedlings establishment (Experiment 2, cv. Yudal).....*161*
C – 4 Development and S management of cv. Yudal seedlings.....*162*
D Discussion 163
D – 1 S-limitation impacts on germination sensu stricto and on post-germinative events.163
D – 2 Sulphur metabolism is early active in germinated seeds (cv. Capitol).....*165*
D – 3 Seedling sulphate uptake capacity is impacted by S limitation applied to the mother plant.....*165*
CHAPITRE VIII : DISCUSSION GENERALE 168
A La limitation en S affecte la physiologie des organes végétatifs.....168
A – 1 Le métabolisme foliaire est affecté par la limitation en S.....*168*
A – 2 La gestion du S présente une variabilité génotypique en réponse à une limitation en S 171
A – 3 La limitation en S influe également sur la gestion du S par le péricarpe 172
B La limitation en S affecte le métabolisme et la qualité de la graine de colza 174
B – 1 Les changements métaboliques induits par la limitation en S peuvent contribuer à maintenir la teneur en protéine de la graine, malgré une réduction de la qualité protéique 174
B – 2 La limitation en S affecte le métabolisme carboné de la graine de colza et réduit la qualité lipidique (Chapitre V) *177*
B – 3 La limitation en S module l'expression de protéines associées à différents stress.....*179*
C La limitation en S altère la germination *sensu stricto* des graines produites et les évènements post-germinatifs 180
CHAPITRE IX : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 183
A Conclusion générale.....183
B Perspectives 186
B – 1 Perspectives au niveau physiologique.....*186*
B – 1.a Sur le métabolisme foliaire du colza 186
B – 1.b Sur le métabolisme de la graine de colza 187
B – 2 Perspectives au niveau agronomique *187*
REFERENCES 190
LISTE DES ILLUSTRATIONS 206
A Liste des figures 206
B Liste des tableaux.....211
ANNEXES 213

Liste des abréviations

#

2–DE : électrophorèse bidimensionnelle

A

ABA : acide abscissique

ABC : ATP binding cassette

ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylate

ACO : ACC oxydase

ACS : ACC synthase

AG : acide gras

AH : adénosylhomocystéinase

AIA : acide indole 3-acétique (auxine)

Ala : alanine

ANOVA : analyse de variance

APK : APS kinase

APR : APS réductase

APS : adénosine 5'-phosphosulfate

APX : ascorbate peroxydase

Asn : asparagine

Asp : aspartate

ATP : adénosine triphosphate

ATPS : ATP sulfurylase

B

BSA : albumine de sérum bovin

C

CAT : catalase

CBL : cystathionine β-lyase

CETIOM : Centre technique interprofessionnel des oléagineux et du chanvre

CF_0 : sous-unité membranaire de l'ATP synthase

CF_1 : sous-unité catalytique de l'ATP synthase

CGS : cystathionine γ-synthase

CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanesulfonate

CITEPA : Centre interprofessionnel technique d'études de la pollution atmosphérique

CLT : transporteur de thiol

CoA : coenzyme A

CRG : coefficient of the rate of germination

Ct : cycle seuil

CV : taux de recouvrement

Cys : cystéine

Cyst : cystathionine

Cyt b_6f : complexe cytochrome b_6f

D

DHA : déshydroascorbate

DHAP : dihydroxyacétone phosphate

DHAR : DHA réductase

DM / DW : matière sèche / masse sèche

DMS : diméthylsulfide

DMSP : diméthylsulfopropianate

DTT : dithiothréitol

E

ESI : electrospray ionization

EST : marqueur de séquence exprimée

EUtA/NUtE : efficience d'utilisation du N

EUtS/SUtE : efficience d'utilisation du S

EVA : écophysiologie végétale, agronomie et nutrition N, C, S

F

F1,6bisP : fructose 1,6-bisphosphate

F6P : fructose 6-phosphate

FAD : acide gras désaturase

FAMEs : esters méthylés d'acides gras

FAS : acide gras synthétase

FNR : ferrédoxine–NADP réductase

Fru : fructose

FTR : ferrédoxine thiorédoxine réductase
FW : masse fraiche

G

G1P : glucose 1-phosphate
G6P : glucose 6-phosphate
GAs : gibbérelines
GABA : Acide γ-aminobutyrique
GAP : glycéraldéhyde-3-phosphate
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GC : chromatographie en phase gazeuse
GGT : γ-glutamyltransférase
Gln : glutamine
GLS : glucosinolates
Glu : glutamate
Gly : glycine
GPX : glutathion peroxydase
GR : glutathion réductase
GS : glutamine synthétase
GSH : glutathion réduit
GSHS : glutathion synthétase
GSSG : glutathion oxydé
GST : glutathion S-transférase
GS-X : glutathion conjugué
GUS : β-glucuronidase
γ-EC : γ-glutamylcystéine
γ-ECS : γ-EC synthétase

H

Hcy : homocystéine
His : histidine
HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance
HS : alimentation en S pléthorique ou high S

I

IEF : isoéléctrofocalisation
INRA : Institut national de recherche agronomique
IPG : gradient de pH immobilisé
IRMS : spectrométrie de masse isotopique

J

JA : acide jasmonique

L

LC-MS/MS : liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LEA : late embryogenesis abundant protein
Leu : leucine
LHC : light harvesting complex
LS : limitation en S ou low S

M

MBP : myrosinase binding protein
MDH : malate déshydrogénase
MDHA : monodéshydroascorbate
MDHAR : MDHA réductase
ME : enzyme malique
MESR : Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
Met : méthionine
Mr : poids moléculaire
MRP : Multidrug resistance-associated protein
MS : méthionine synthase
MTs : méthyl transférases

N

NHI : indice de récolte du N
NIRS : near infrared spectroscopy
NR : nitrate réductase

O

OAA : oxaloacétate
OAS : *O*-acétylsérine
OAS-TL : OAS thiol-lyase
OPH : *O*-phosphohomosérine

P

PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PAP : plastid-lipid associated protein

PAPS : phosphoadénosine 5'-phosphosulfate

PC : plastocyanine

PCR : polymerase chain reaction

PEP : phosphoénolpyruvate

PEPCase : PEP carboxylase

Phe : phénylalanine

p*I* : point isoélectrique

PQ : plastoquinone

PMG : poids de mille graines

PROLEA : filière française des huiles et protéines végétales

PRX : peroxyrédoxine

PVPP : poly(vinylpolypyrrolidone)

Q

Q-PCR : PCR quantitative

QSR : quantité de S remobilisé

R

R : accepteur de méthyl

Rib5P : ribose 5-phosphate

R–OH : précurseur hydroxylé

ROS : espèces réactives de l'oxygène

RT : reverse transcription

Ru5P : ribulose 5-phosphate

S

Sac6P : saccharose 6-phosphate

SAH : *S*-adénosylhomocystéine

SAM : *S*-adénosylméthionine

SAMS : SAM synthétase

SAT : sérine acétyltransférase

SDS : sodium dodécyl sulfate

SE : erreur standard

Ser : sérine

SHI : indice de récolte du S

Sir : sulfite réductase

SMM : *S*-méthylméthionine

SOD : superoxyde dismutase

SOT : sulfotransférases

SRE : efficience de remobilisation du S

SSP : seed storage protein

STAS : sulfate transporter and anti-sigma antagonist

Sultr : transporteur de sulfate

T

T'50 : temps nécessaire pour atteindre 50 % du taux de germination finale

T50 : temps nécessaire pour atteindre un taux de germination de 50 %

TAG : triacylglycéride

TAIR : The Arabidopsis Information Resource

TCA : acide trichloroacétique

TEMED : N, N, N', N'-tétraméthyléthylène diamine

THI : thiazole biosynthetic enzyme

Thr : thréonine

Tm : température de fusion

TR : thiorédoxine réductase

TS : thréonine synthase

Tyr : tyrosine

U

UCBN : Université de Caen Basse-Normandie

UDP-Glc : UDP-glucose

UMR : unité mixte de recherche

V

Val : valine

W

WAF : weeks after flowering ou semaines après floraison

WSCP : water soluble chlorophyll binding protein

X

X–CysGly : cystéinylglycine conjuguée

Xu5P : xylulose 5-phosphate

Chapitre I

Introduction générale

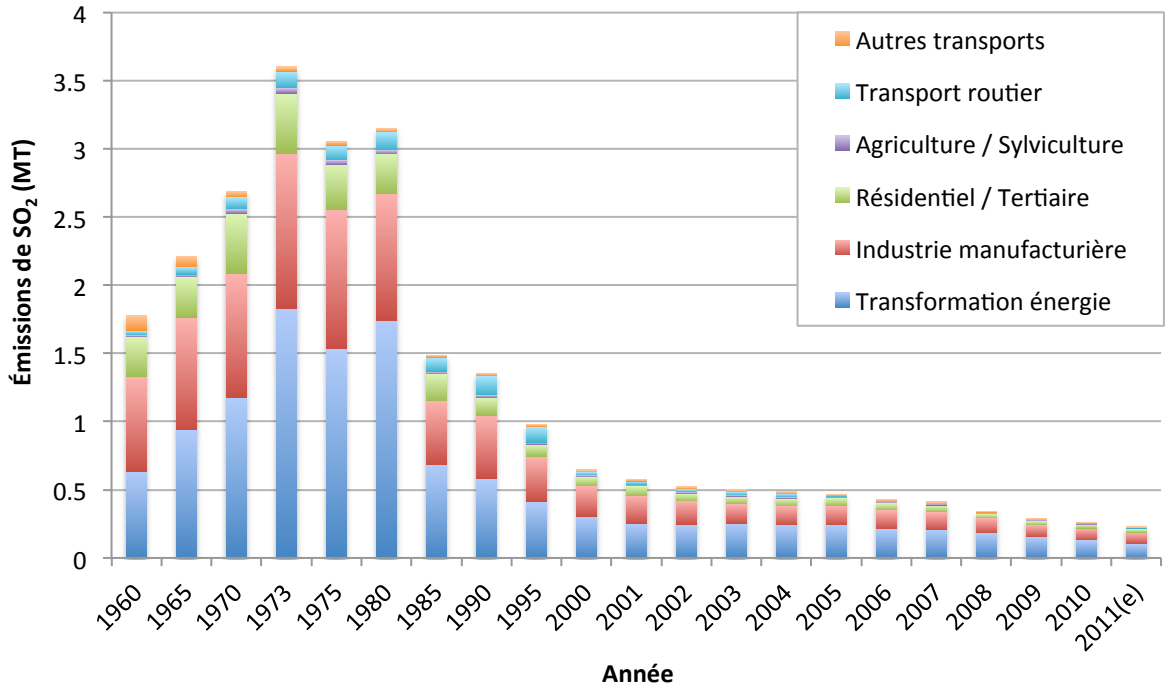


Figure I.1 Évolution des émissions de dioxyde de soufre dans l'atmosphère de France métropolitaine entre 1960 et 2011 selon les secteurs d'activités.
(e) : estimation préliminaire. Source : CITEPA (www.citepa.org).

Table I.1 Principaux engrais soufrés utilisés.

Engrais	Concentration de SO_3	Apport minimal en kg pour 75 unités de SO_3/ha en kg	Elément associé au soufre
Sulfate d'ammoniaque	60 %	125	21 % N
Sulfonitrate d'ammoniaque 26	32,5 %	230	26 % N
Ammonitrate soufré 26 13	13 %	580	26 % N
Solution azotée soufrée 26 14	11 %*	860	20,6 %* N
Superphosphate simple ou normal 18	30 %	250	18 % P_2O_5
Superphosphate concentré 25	20 %	375	25 % P_2O_5
Sulfate de potassium	45 %	170	50 % K_2O
Kiesérite granulé(sulfate de magnésium)	50 %	150	25 % MgO
Engrais composés avec SO_3 déclaré	variable	à calculer	

*Rapport masse/volume en %. Source : CETIOM (www.cetiom.fr)

Chapitre I : Introduction générale

A Contexte général

Bien qu'il ait permis l'amélioration de la qualité de vie d'une partie de l'humanité, le développement des sociétés industrialisées modernes a provoqué de profonds changements environnementaux. Par l'augmentation des rejets atmosphériques dont il est responsable (oxydes de carbone, de soufre et d'azote, composés organiques volatiles), ce développement s'est notamment accompagné d'une dégradation importante de la qualité de l'air. Alors que l'augmentation des émissions de gaz à effet de serre (dioxyde et monoxyde de carbone) constitue une des causes du réchauffement climatique, l'accroissement des émissions de dioxyde de soufre (SO_2), principalement lié à l'utilisation de combustibles fossiles soufrés (charbon, lignite, fioul, gazole), fut à l'origine d'une augmentation de la fréquence des pluies acides, ayant provoqué la dégradation de nombreux écosystèmes (Schindler, 1988; Likens *et al.*, 1996). Depuis les années 80, les politiques de réduction des rejets industriels (Convention sur la pollution atmosphérique transfrontière à longue distance de 1979, Protocole d'Oslo en 1994; Protocole de Kyoto en 1997) ont notamment permis une baisse des rejets soufrés atmosphériques, en particulier en Europe de l'Ouest (McNeill *et al.*, 2005). En France, les émissions de soufre (S) dans l'atmosphère ont chuté de 80 % entre 1980 et 2000 (Centre interprofessionnel technique d'études de la pollution atmosphérique[1] ; figure I.1).

Au cours du vingtième siècle, l'essor de l'agriculture intensive, favorisant les rendements des végétaux cultivés par l'utilisation accrue d'intrants, a permis de répondre aux besoins alimentaires d'une population mondiale en forte expansion par une augmentation importante de la production agricole. Ce mode d'exploitation nécessite néanmoins l'apport d'engrais azotés afin de garantir un bon rendement et une bonne qualité des produits récoltés. Riches en azote (N), les principaux fertilisants utilisés actuellement par les agriculteurs (de type amonitrate ou superphosphate concentré) ne contiennent que peu de S (Tableau I.1). Selon une enquête du Centre technique interprofessionnel des oléagineux

[1] CITEPA, http://www.citepa.org

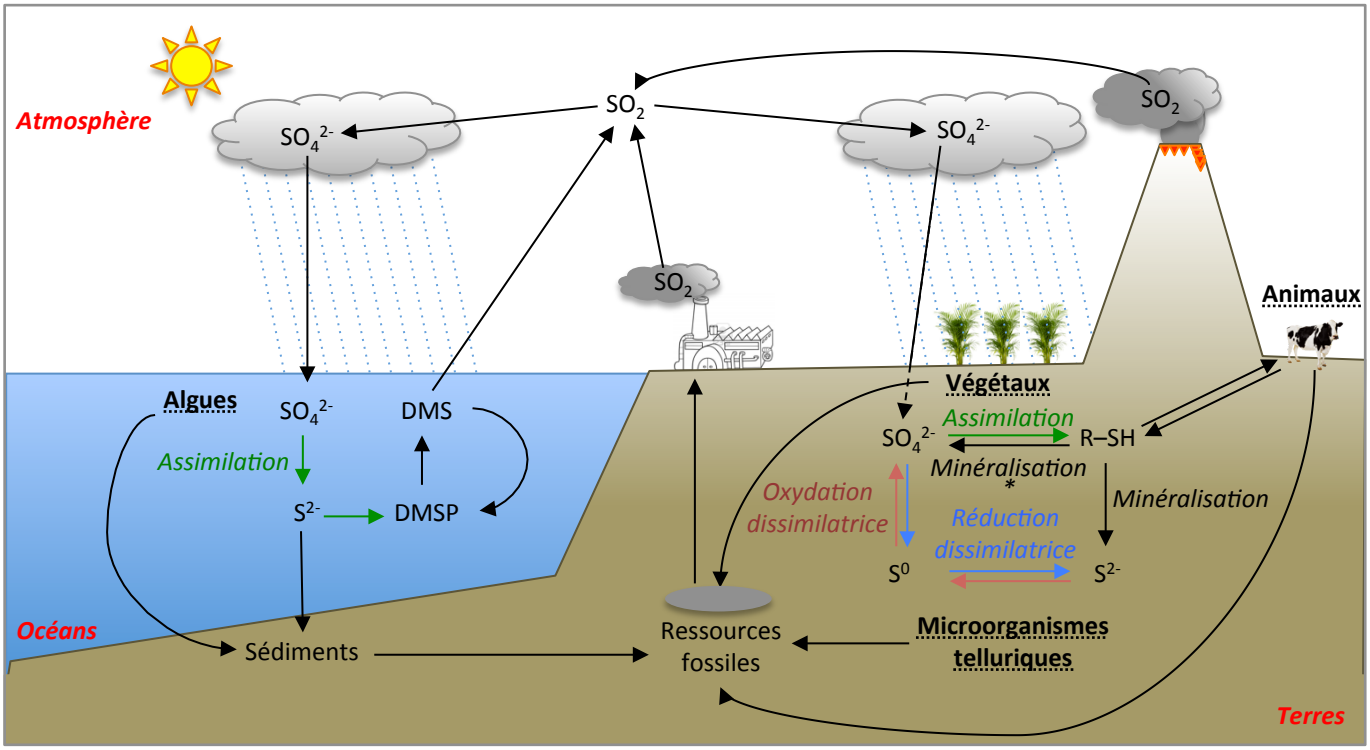


Figure I.2 Cycle biogéochimique du S.
Le sulfate est assimilé par les végétaux terrestres et par les algues (flèches vertes). Les microorganismes du sol utilisent le S dans des réactions dissimilatrices (flèches rouges et bleues) et minéralisent le S organique en sulfate (*activité arylsulfatase). Les animaux dépendent de source de S organique. Le S peut être libéré dans l'atmosphère sous forme de composés volatiles par les océans, les volcans, et *via* l'activité anthropique, qui seront oxydés au niveau atmosphérique. DMS, dimethylsulfide ; DMSP, dimethylsulfopropianate. Modifié d'après Takahashi *et al.* (2011b).

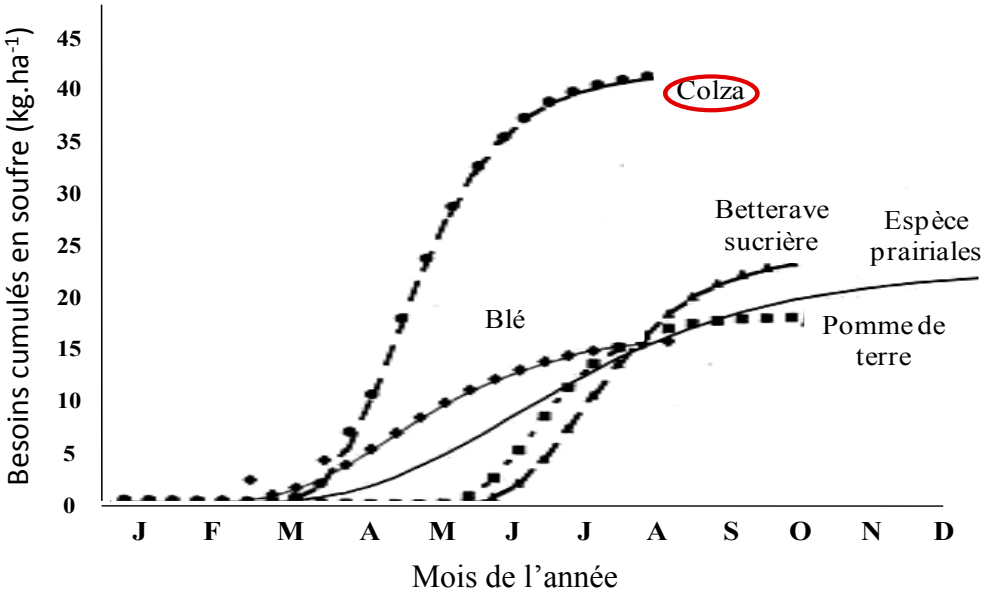


Figure I.3 Besoins annuels cumulés en soufre de différentes espèces végétales de janvier à décembre.
(Oenema & Postma, 2003).

et du chanvre[2] réalisée en 2008, près d'un tiers des agriculteurs néglige l'apport de S à leurs cultures.

Le S est néanmoins un macroélément essentiel pour tous les organismes vivants. Les végétaux, les champignons et les bactéries ont la capacité d'absorber le S minéral et de l'assimiler, tandis que les animaux dépendent exclusivement du S organique apporté par l'alimentation. L'incorporation du S dans la chaine trophique est en grande partie assurée par les végétaux, qui jouent ainsi un rôle majeur dans le cycle biogéochimique du S (Figure I.2 ; Takahashi *et al.*, 2011b). Cependant, la réduction des apports de S par voie atmosphérique associée à la forte demande en S des végétaux cultivés entrainent un appauvrissement des sols en cet élément, ce qui peut se traduire, pour les cultures particulièrement sensibles à la limitation en S, par une diminution des rendements et/ou de la qualité des produits récoltés (Scherer, 2001).

Parmi les espèces de grande culture, le colza (*Brassica napus* L.) présente des besoins en S très importants (40 $kg.ha^{-1}$) en comparaison de céréales telles que le blé (15 à 25 $kg.ha^{-1}$; Oenema & Postma, 2003; figure I.3). En conditions non limitantes en S, les graines de colza contiennent un fort taux de protéines soufrées (Zhao *et al.*, 1997) conférant au tourteau de colza une bonne qualité nutritionnelle. De par ses forts besoins en S, le colza est très sensible à une oligotrophisation en cet élément : une carence en S peut se traduire par une diminution de rendement de 10 à 20 q/ha en situation extrême, selon le CETIOM. Cet organisme recommande ainsi aux agriculteurs d'apporter à leurs cultures de colza d'hiver 75 $kg.ha^{-1}$ de sulfate au stade GS51 (boutons accolés) et à leurs cultures de colza de printemps 40 à 50 $kg.ha^{-1}$ au semis afin de garantir une bonne récolte, en rendement comme en qualité.

Certaines études ont d'ores et déjà montré que la teneur en huile et en protéines des graines de colza d'hiver pouvait être réduite en cas de limitation en S (Dubousset *et al.*, 2010). La qualité grainière des Brassicacées peut également être affectée, par l'altération des contenus protéique et lipidique, comme observé respectivement chez *Arabidopsis thaliana* (Higashi *et al.*, 2006) et *Brassica rapa* (Ahmad & Abdin, 2000a).

[2] CETIOM, http://www.cetiom.fr

Dans ce contexte général, cette thèse, financée par une allocation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) et réalisée au sein de l'UMR INRA-UCBN 950 EVA s'est focalisée sur la caractérisation des impacts de limitations de l'apport de S sur la physiologie et le métabolisme au niveau d'organes puits pour le S à deux stades de développement différents : une feuille en croissance (organe majeur d'assimilation du S) au stade rosette; la graine (organe de stockage de réserves oléiques et protéiques) au stade reproducteur.

B Objectifs généraux et plan de thèse

L'objectif général de cette thèse consistait à caractériser les impacts de la limitation en S sur la physiologie et le métabolisme du colza.

Les effets de la restriction en S ont été abordés en premier lieu au niveau d'une jeune feuille apparue après application de la limitation, dont les besoins en S ne sont assurés que par la remobilisation des réserves S endogènes préalablement accumulées par la plante.

Dans un second temps, l'étude s'est focalisée sur les impacts de la limitation en S sur la graine, l'organe d'intérêt agronomique du colza, en traitant des effets observés sur sa qualité, son développement et sa germination.

Ce mémoire de thèse débute par une synthèse bibliographique (Chapitre II) résumant les atouts agronomiques et économiques associés à la culture de colza, l'importance du S dans son développement ainsi que la problématique associée à la limitation en S chez cette espèce. Les dispositifs expérimentaux et méthodes d'analyses employés pour répondre aux objectifs de ce travail de recherche sont décrits dans le chapitre « Matériels et méthodes » (Chapitre III). Les résultats sont ensuite présentés sous la forme de cinq publications scientifiques rédigées en anglais, réparties sur quatre chapitres (Chapitres IV à VII).

Les résultats majeurs sont repris et interprétés de manière plus globale au sein d'une « Discussion générale », suivie des principales « Conclusions et perspectives » à donner à ce travail de recherche doctorale.

Chapitre II

Synthèse bibliographique

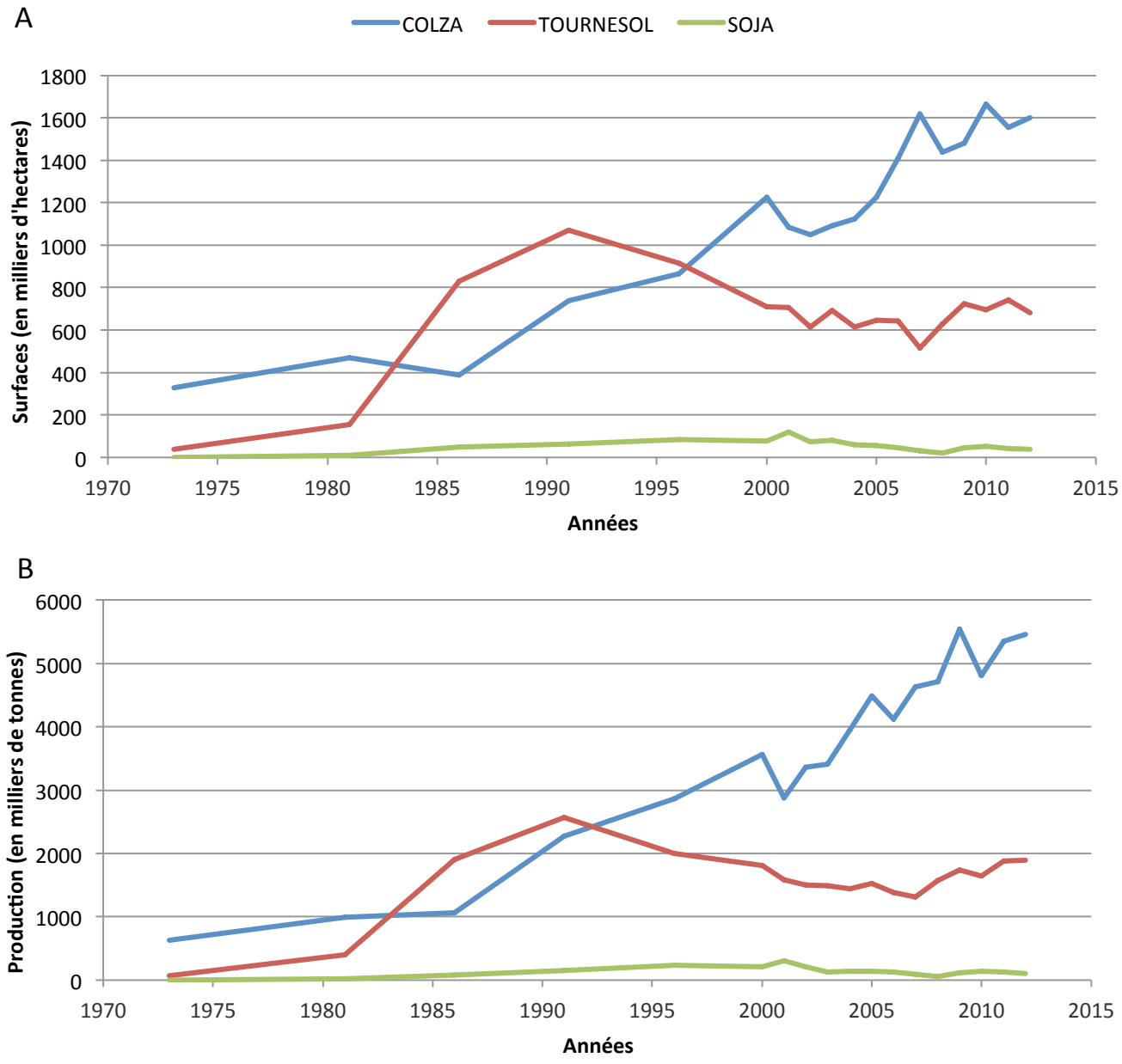


Figure II.1 Évolution des surfaces cultivées (A) et de la production (B) de graines oléagineuses en France métropolitaine de 1973 à 2012.
Source : PROLEA (http://www.prolea.com)

Chapitre II : Synthèse bibliographique

A Généralités sur le colza, enjeux économiques et contexte agro-environnnemental

A – 1 Place du colza dans la filière des oléoprotéagineux

La production mondiale de graines oléagineuses a progressé de manière régulière depuis les années 70 pour atteindre près de 329 millions de tonnes en 2012. Les graines de colza représentent actuellement près de 16 % de la production mondiale de graines d'oléagineux, occupant la seconde place du classement derrière le soja (72 % de la production mondiale de graines d'oléagineux ; filière française des huiles et protéines végétales[3]).

Conséquence de l'augmentation des rendements moyens et des surfaces exploitées pour sa culture, la production européenne d'oléagineux, et notamment de colza, a fortement augmenté au cours des dernières décennies. L'Union Européenne est actuellement le premier producteur mondial de colza, produisant près de 19,1 Mt de graines en 2012, soit plus de 35 % de la production mondiale (53,4 Mt). Elle est suivie par le Canada (14,5 Mt), la Chine (11,6 Mt), et l'Inde (5,8 Mt). En France, la production de colza ainsi que les surfaces allouées à son exploitation sont en constante augmentation depuis les années 70 et sont actuellement bien supérieures à celles des autres oléagineuses d'intérêt agronomique tel le tournesol et le soja (Figure II.1 ; PROLEA). Avec une production de près de 5,5 Mt de graines en 2012, la France est actuellement le premier producteur européen et le quatrième producteur mondial de colza devant l'Allemagne (PROLEA).

Développé en France à partir de la seconde moitié du vingtième siècle suite à la diminution des importations d'huile, le colza oléagineux est principalement cultivé pour la richesse en lipides de ses graines. Une fois récoltées, les graines de colza subissent le processus de trituration, permettant de dissocier l'huile brute du tourteau résiduel, riche en protéines. Les propriétés de l'huile extraite par ce processus, notamment sa richesse en ω3 (9 – 9,7 %) et en ω6 (19,6 – 22 %), des acides gras essentiels (*i.e.* non synthétisés par les

[3] PROLEA, http://www.prolea.com

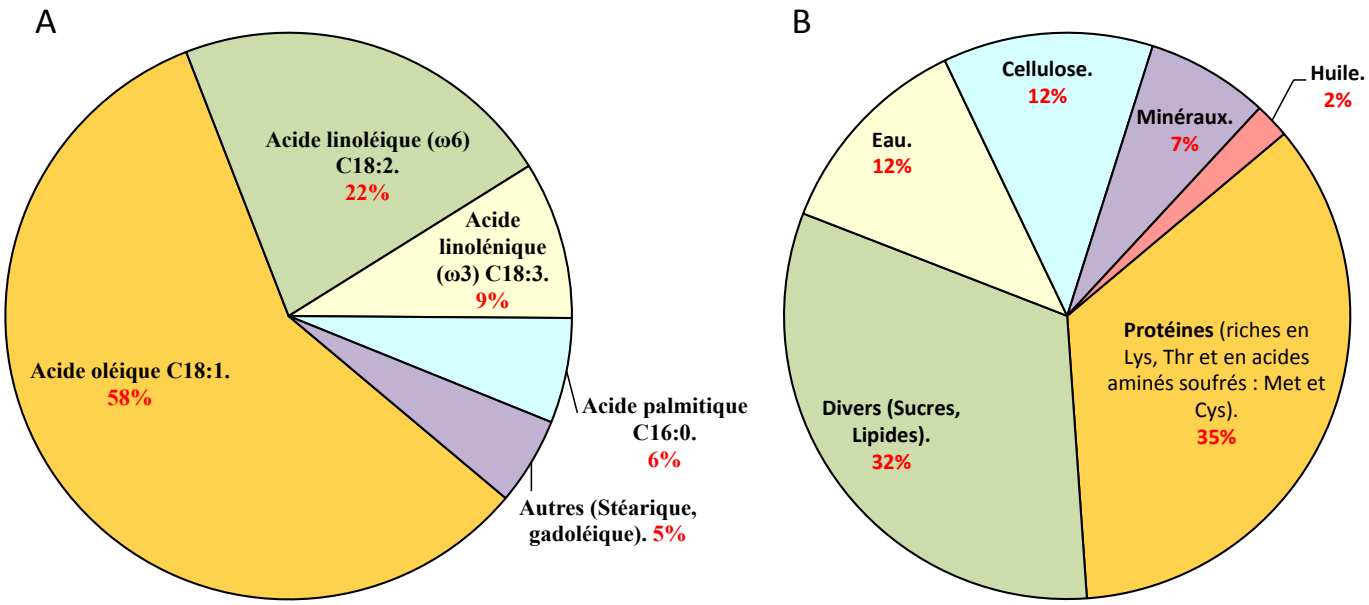


Figure II.2 Composition standard de l'huile (A) et du tourteau (B) de colza « 00 », caractérisés par de faibles teneurs en acide érucique et en glucosinolates.
Source : PROLEA (http://www.prolea.com).

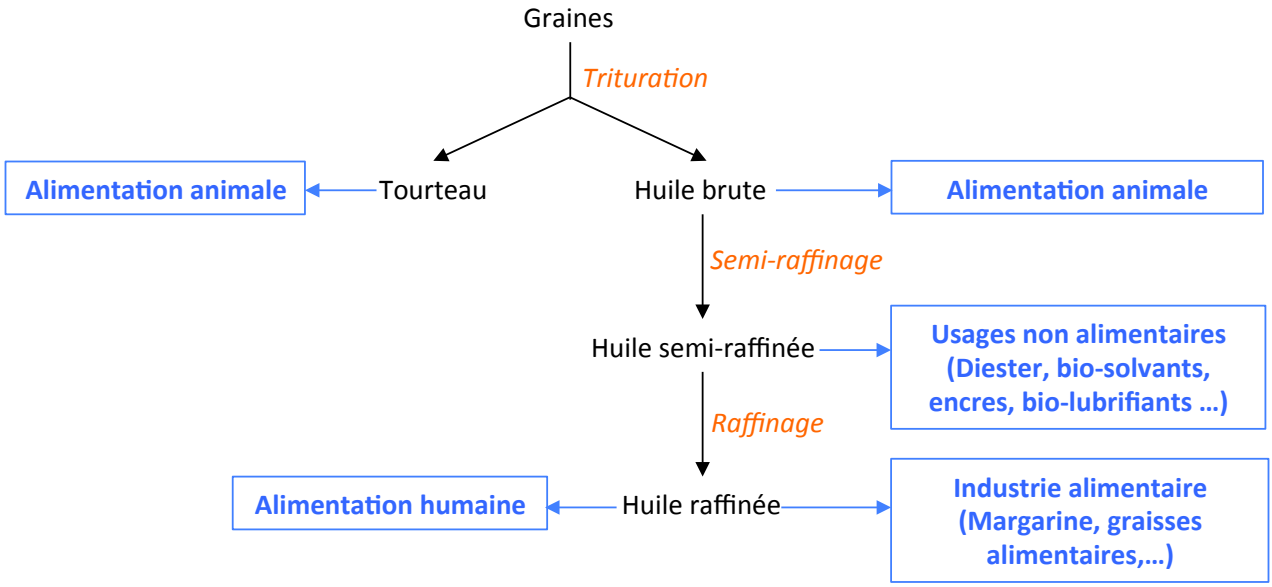
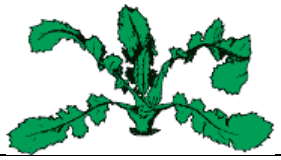
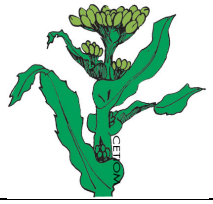
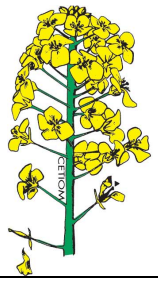


Figure II.3 Principales utilisations des graines de colza « 00 » dans l'industrie alimentaire et non alimentaire.
Le Diester est obtenu par estérification de l'huile semi-raffinée par du méthanol. Les esters d'huile de colza sont également utilisés pour la confection de solvants et d'encres. L'huile semi-raffinée peut directement être utilisée pour la confection de lubrifiants. La margarine produite à partir d'huile de colza résulte de l'émulsion entre l'huile raffinée et de l'eau et/ou du lait. Source : PROLEA (http://www.prolea.com).

animaux), son faible ratio ω6/ω3 (autour de 2), ainsi que sa forte teneur en vitamine E, en font une huile d'excellente qualité pour la consommation humaine en comparaison des autres huiles végétales (Covington, 2004; Foster *et al.*, 2009; figure II.2A). L'huile de colza peut également être utilisée pour la confection de produits cosmétiques, de détergents, d'agents protecteurs du bois ou encore d'agents anti-poussières. L'estérification de l'huile de colza par du méthanol permet également de produire des lubrifiants ou encore du Diester®, un biocarburant dont l'utilisation limite la production de gaz à effet de serre. Résidu de l'extraction de l'huile par le processus de trituration, le tourteau de colza, composé de protéines, glucides et lipides (Figure II.2B) est particulièrement riche en acides aminés essentiels (*i.e.* non synthétisés par les animaux), et notamment en lysine, thréonine et méthionine, mais aussi en cystéine, le second acide aminé soufré, essentiel pour certains animaux comme le mouton. Le tourteau de colza est principalement utilisé dans l'alimentation animale (porcs, ruminants, volailles, agneaux), notamment en complément voire en remplacement d'autres tourteaux comme celui du pois ou du soja (PROLEA). L'apport de tourteau de colza dans l'alimentation animale permet par exemple d'améliorer la qualité du lait de vache (Papas *et al.*, 1979), ou encore la qualité de la viande d'agneau (Solomon *et al.*, 1991). Ainsi, le colza possède de nombreux atouts justifiants l'intérêt suscité par sa culture.

Malgré ces débouchés alimentaires et industriels variés résumés par la figure II.3, la production de colza a connu de nombreuses difficultées, liés notamment à la qualité nutritionnelle des huiles destinées à l'alimentation humaine et des tourteaux destinés à l'alimentation animale. Les variétés traditionnelles de colza produisent en effet des graines contenant i) de l'acide érucique (C22:1), un acide gras dont la présence à dose importante dans l'huile est toxique pour les animaux (Hung *et al.*, 1977), et ii) des glucosinolates, molécules soufrées dont les produits de dégradation peuvent conférer au tourteau de colza une certaine inappétence pour les animaux (Mawson *et al.*, 1993), limiter la croissance (Mawson *et al.*, 1994a) et affecter la thyroïde, le foie et les reins, notamment chez les animaux monogastriques (Mawson *et al.*, 1994b; Walker & Booth, 2001). Pour s'affranchir de ces défauts, la sélection variétale a permis la production de variétés de colza « 00 » dites « double zéro » (en anglais « double low » pour « low erucic acid and low glucosinolate »), utilisées aujourd'hui pour l'alimentation et caractérisées par une teneur en acide érucique inférieure à 2 % de la fraction lipidique et une teneur en glucosinolates inférieure à 25 μmol

Tableau II.1 Principaux stades repères du cycle de développement du colza.

Stade A	**A- Stade cotylédonaire** • **Levée** : les jeunes plantes marquent la ligne. • **Stade A (10)** : stade cotylédonaire. Pas de feuilles "vraies''. Seuls les deux cotylédons sont visibles.
Stade B	**B- Formation de la rosette** • **Stade B** : apparition des feuilles. Pas d'entre-noeuds entre les pétioles. Absence de vraie tige. • **Stade B1 (11)** : 1 feuille vraie étalée ou déployée. • **Stade B2 (12)** : 2 feuilles vraies étalées ou déployées. • **Stade B3 (13)** : 3 feuilles vraies étalées ou déployées. • **Stade B4 (14)** : 4 feuilles vraies étalées ou déployées. • **Stade Bn (1n)** : n feuilles vraies étalées ou déployées.
Stade C 	**C- Montaison** • **Stade C1 (31)** : reprise de végétation. Apparition de jeunes feuilles. • **Stade C2 (32)** : entre-noeuds visibles. On voit un étranglement vert clair à la base des nouveaux pétioles. C'est la tige.
Stade D 	**D- Boutons accolés** • **Stade D1 (51)** : boutons accolés encore cachés par les feuilles terminales. • **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.
Stade E	**E- Boutons séparés** • **Stade E (59)** : les pédoncules floraux s'allongent en commençant par ceux de la périphérie.
Stade F	**F- Floraison** • **Stade F1 (60)** : premières fleurs ouvertes. • **Stade F2 (61)** : allongement de la hampe florale. Nombreuses fleurs ouvertes.
Stade G 	**G- Formation des siliques** • **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. • **Stade G2** : les 10 premières siliques ont une longueur comprise entre 2 et 4 cm. • **Stade G3** : les 10 premières siliques ont une longueur supérieure à 4 cm. • **Stade G4 (73)** : les 10 premières siliques sont bosselées. • **Stade G5 (81)** : grains colorés

La nomenclature anglo-saxonne est indiquée entre parenthèses. Un stade est atteint lorsque 50% des plantes sont à ce stade.
D'après documentation CETIOM (http://www.cetiom.fr).

par gramme de graines sèches (Hasan *et al.*, 2008; Nesi *et al.*, 2008). Les glucosinolates, consommés depuis des millénaires par l'homme – comme dans la moutarde, la roquette ou le brocoli – présentent cependant des effets bénéfiques, diminuant le risque d'apparition de cancers et de problèmes cardiovasculaires (Pour review, Traka & Mithen, 2008; Vig *et al.*, 2009).

A – 2 Cycle de développement du colza et bilan agro-environnemental

A – 2.a Cycle de développement du colza

Issu du croisement récent – datant de 2000 à 1500 ans avant Jésus-Christ selon des textes sanskrits (Groupement national interprofessionnel des semences et plants[4]) – entre deux espèces aux génomes différents, *Brassica rapa* (la navette) et *Brassica oleracea* (le chou), le colza (*Brassica napus* L.) est une espèce allotétraploïde doublée, possédant ainsi généralement de nombreuses copies d'un même gène (Nagaharu, 1935).

Espèce annuelle, le colza est une plante monoïque à racine pivotante, à tige rameuse et aux feuilles possédant des morphologies différentes selon leur position nodale et le stade de développement de la plante. Alors que les feuilles inférieures, se développant au stade rosette, sont pétiolées et découpées, les feuilles supérieures, se formant après vernalisation, sont lancéolées et entières.

Deux types principaux de colza oléagineux peuvent être distingués par la durée de leur cycle de développement : le colza d'hiver, semé en septembre et récolté en juillet, et le colza de printemps, semé en mars ou avril et récolté en août. Le colza de printemps, de par son cycle court permet un retour rapide sur investissement, mais les agriculteurs européens lui préfèrent généralement le colza d'hiver, plus productif et adapté aux conditions climatiques européennes (CETIOM).

Le cycle de développement du colza peut être décomposé en deux phases : une première phase de croissance végétative, au cours de laquelle le colza produit de nouvelles feuilles pétiolées, sans entre nœuds entre les rangs foliaires, et une seconde phase, reproductrice, initiée par la montaison (Tableau II.1). Tandis que la montaison et l'initiation florale du colza de printemps ne nécessitent pas de période de vernalisation, ces étapes sont

[4]GNIS, http://www.gnis.fr

conditionnées chez le colza d'hiver par les faibles températures hivernales (Merrien & Pouzet, 1988). Au cours de la phase reproductrice, les entre nœuds deviennent visibles, l'inflorescence principale se dégage et des ébauches d'inflorescence se forment aux apex caulinaires. La ramification de la tige survient alors que la montaison et la floraison se poursuivent. Les boutons floraux s'épanouissent du bas vers le haut de l'inflorescence. Survient alors la fécondation, par laquelle débute la formation des graines, qui peut s'étendre de mai à juillet chez le colza d'hiver. À maturité, la déhiscence des siliques et la dispersion des graines peuvent être provoquées par le moindre choc (Leterme, 1985).

A – 2.b Bilan agro-environnemental

Qualifié de « pompe à nitrate », le colza consomme de grandes quantités d'azote (N). Durant l'automne et l'hiver, le colza d'hiver peut ainsi prélever une grande part du N présent dans les sols et limiter son lessivage. Malgré une forte capacité d'absorption du nitrate, le colza possède une faible efficience d'utilisation de l'azote (EUtA), liée à la faible remobilisation des composés N retrouvés principalement sous forme organique au niveau des organes végétatifs et plus particulièrement des feuilles (Malagoli *et al.*, 2005). En effet, la part de l'azote absorbé au cours du cycle qui est valorisée et retrouvée dans les graines ne dépasse pas 50 % (Schjoerring *et al.*, 1995). De même, en condition d'alimentation pléthorique, l'efficience d'utilisation du soufre (EUtS) est faible chez le colza : la grande quantité de sulfate absorbé et stocké au niveau foliaire n'est pas efficacement remobilisée pour l'élaboration des graines (Parmar *et al.*, 2007; Dubousset *et al.*, 2010). Ainsi, l'indice de récolte soufré du colza (SHI pour « S Harvest Index », rapport entre la quantité de S retrouvé dans les graines et la quantité de S de la plante entière à la récolte) atteint seulement 20 % (McGrath & Zhao, 1996).

En l'absence de lessivage, l'azote organique issu des feuilles chutées de colza peut être minéralisé et participer ainsi à l'amendement de la culture suivante. Ce processus permet par exemple à un blé de colza d'atteindre un rendement supérieur à un blé de blé, tout en limitant les apports d'intrants azotés (CETIOM). De façon similaire, le S issu des feuilles chutées peut être valorisé par la culture suivante. L'utilisation des résidus de culture du colza, riches en glucosinolates, permet également de réduire l'emploi de pesticides et de fongicides. Dans un tissu végétal intact, les glucosinolates et les myrosinases (également appelées thioglucosidases) sont présents dans des cellules différentes. Au cours de la

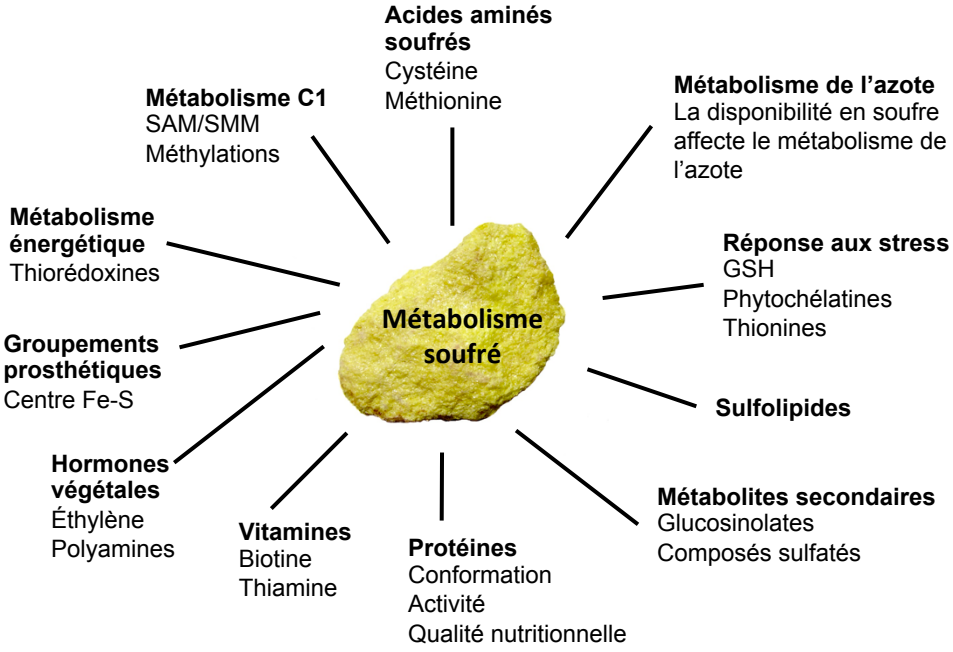


Figure II.4 Représentation schématique des fonctions physiologiques du soufre et de son implication dans la biosynthèse de divers métabolites végétaux.

GSH, glutathion réduit ; SAM, *S*-adénosylméthionine ; SMM, *S*-méthylméthionine. D'après Nikiforova *et al.* (2004).

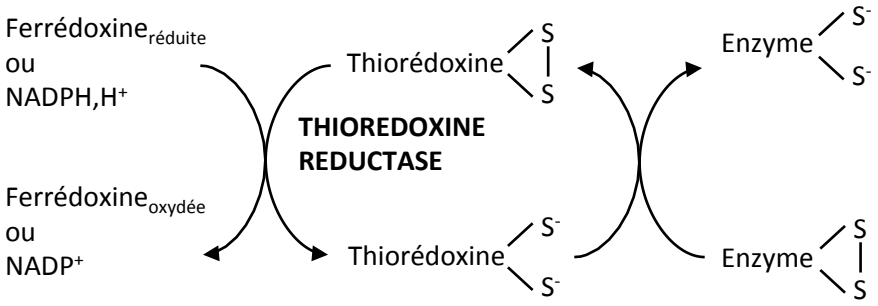


Figure II.5 Régulation du métabolisme par réduction des ponts disulfures.

Au niveau chloroplastidial, les électrons nécessaires à la réduction des thiorédoxines sont fournis par la ferrédoxine réduite par les réactions photochimiques de la photosynthèse. Les thiorédoxines sont également présentes au niveau du cytoplasme où le $NADPH,H^+$ fournit les électrons nécessaires à leur réduction. D'après Leustek & Saito (1999).

dégradation des tissus, la myrosinase entre en contact des glucosinolates et décompose ces molécules, entrainant la production de nombreux composés volatiles aux propriétés anti pathogéniques, tels les nitriles ou encore les isothiocyanates (Lambrix *et al.*, 2001; Wittstock & Halkier, 2002). Cette pratique culturale, appelée biofumigation, permet de limiter le développement de pathogènes et de ravageurs (Pour review, Gimsing & Kirkegaard, 2008).

De par son cycle de vie, l'intégration du colza d'hiver dans une rotation de cultures permet de freiner le développement des adventices se développant en hiver et au printemps. Dans une exploitation céréalière, la présence du colza d'hiver de septembre à juin permet également de créer une coupure dans le cycle de maladie des céréales (CETIOM).

B La nutrition soufrée chez les Brassicacées

B – 1 Les composés soufrés et leurs rôles chez les végétaux

Parmi les macroéléments constitutifs de la matière végétale (C, H, O, N, P, K, S, Mg, Ca), le soufre intervient dans la composition de molécules très diverses, possédant pour certaines des rôles majeurs dans le métabolisme des végétaux (Figure II.4).

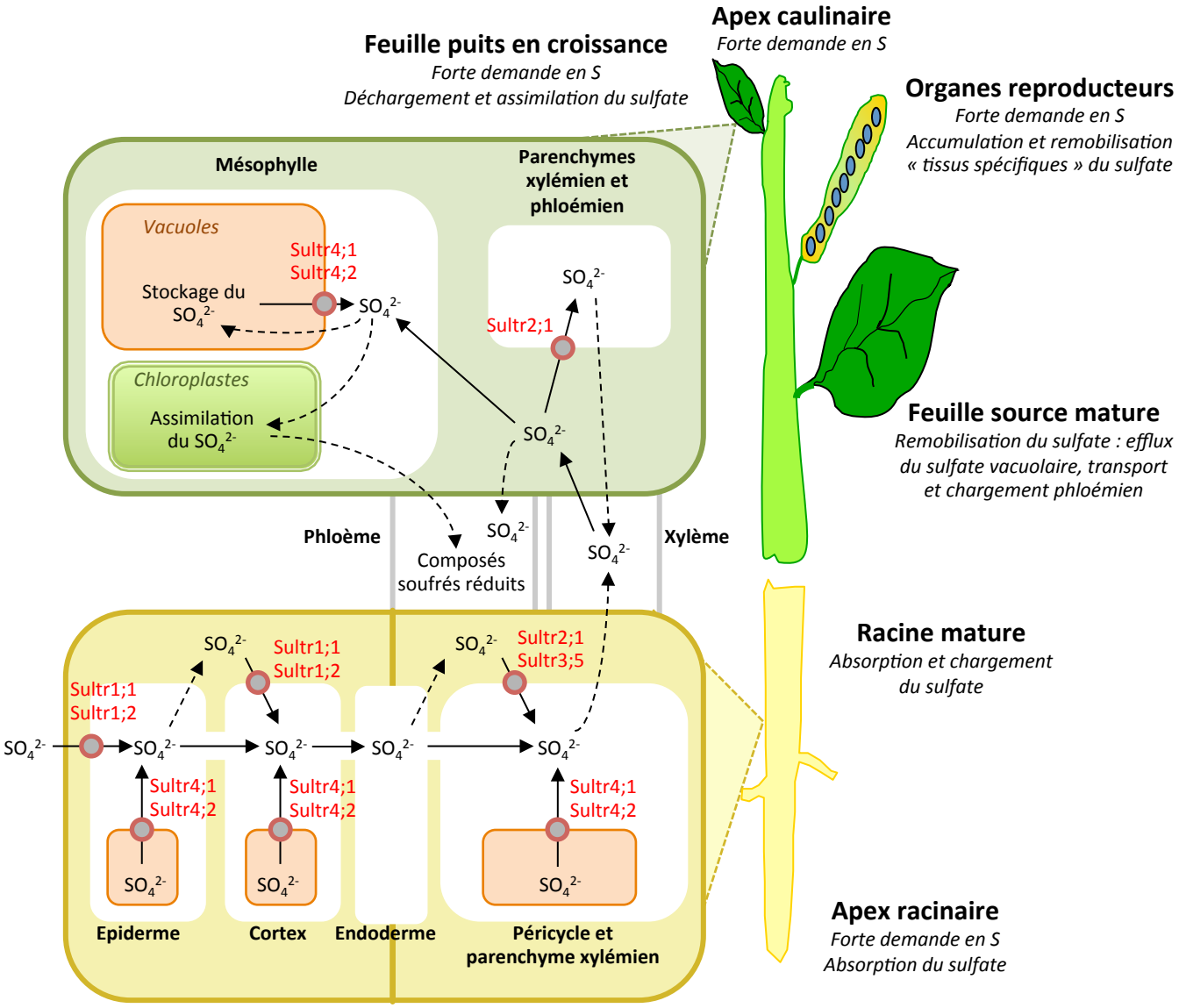
- La **cystéine**, acide aminé soufré précurseur de la méthionine et du glutathion est incorporée dans les protéines, où elle peut former des ponts disulfures (S-S) nécessaires à la stabilisation de la conformation de nombreuses protéines. La formation de ces ponts disulfures ainsi que leur réduction interviennent également dans la régulation de l'activité de certaines protéines aux rôles clés comme la thiorédoxine. Sous sa forme réduite, la thiorédoxine va réduire les ponts disulfures de nombreuses protéines et ainsi moduler leurs activités (Figure II.5 ; Leustek & Saito, 1999; Montrichard *et al.*, 2009). Parmi les protéines possédant des ponts disulfures, certaines sont impliquées dans les principales voies métaboliques fondamentales au développement de la plante, comme la photosynthèse et le cycle de Calvin, la synthèse d'amidon, l'assimilation d'azote, de soufre, la synthèse et la dégradation des protéines ou encore la réponse au stress oxydatif (Lindahl & Kieselbach, 2009). Indépendamment de son implication dans les ponts disulfures, le groupement thiol de la cystéine intervient dans la formation des centres fer-soufre au sein de protéines aux rôles majeurs, comme la nitrogénase indispensable à la

fixation de N_2 chez les légumineuses ou la NADH déshydrogénase et la succinate déshydrogénase impliquées dans la chaine de transfert d'électron mitochondriale.

- La **méthionine**, acide aminé soufré essentiel, est nécessaire à l'initiation de la traduction de chaque protéine. La méthionine est également le précurseur de la ***S*-adénosylméthionine** (SAM), une molécule donneuse de groupement méthyl intervenant dans la synthèse des chlorophylles, de certaines bases azotées, et de l'éthylène. La SAM peut aussi former la ***S*-méthylméthionine** (SMM) qui peut constituer une forme de stockage de la méthionine et une forme de transport du soufre dans le phloème (Bourgis *et al.*, 1999).

- La cystéine présente dans le **glutathion réduit (GSH)** confère à ce tripeptide des propriétés essentielles au maintien de l'homéostasie redox et à la régulation de nombreuses voies de signalisation. Selon certains auteurs, il agirait ainsi sur l'activité de transport et éventuellement sur l'assimilation du sulfate au niveau racinaire (Lappartient *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2000; Kopriva & Rennenberg, 2004), mais ce rôle a récemment été remis en cause (Rouached *et al.*, 2008). De par son action anti-oxydante, le GSH protège les cellules des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui s'accumulent en réponse à divers stress (Foyer & Rennenberg, 2000; Mullineaux & Rausch, 2005; Galvez-Valdivieso & Mullineaux, 2010). Par l'activité des glutathion S-transférases (GSTs), le GSH intervient également dans la détoxification des xénobiotiques (Dixon *et al.*, 2010). Chez les végétaux, le GSH est le précurseur de la synthèse des **phytochélatines**, responsables de la tolérance des plantes aux ions métalliques (Leustek & Saito, 1999). Issu de la (thio)alk(en)ylation de la cystéine dans la voie de biosynthèse du glutathion, le ***S*-methylcystéine sulfoxyde** (ou methiine) est un acide aminé qui occuperait, selon des observations récentes, une place centrale dans le métabolisme azoté et soufré du colza. Cette plante en accumule en effet de grandes quantités dans tous ses organes, tout au long de son cycle ontogénétique. Ce composé peut représenter 12 à 32 % des acides aminés totaux foliaires (Zachary Gaudin et Philippe Simier, communication personnelle).

- Le soufre intervient aussi dans de nombreuses autres molécules ayant des rôles indispensables à la plante. Certaines coenzymes contenant du S, comme le



<u>Figure II.6</u> Absorption et transport du sulfate (SO_4^{2-}) chez les Brassicacées.
Le SO_4^{2-} absorbé au niveau racinaire est 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 au niveau vacuolaire, soit assimilé par les voies d'assimilation réductrices et non réductrices (Figure II.8), principalement au niveau chloroplastidial. Les composés réduits susceptibles d'être véhiculés *via* le phloème sont le glutathion, les acides aminés soufrés et autres dérivés de la méthionine tels que la *S*-méthylméthionine (SMM). Les ronds rouges indiquent les transporteurs de sulfate (Sultr) permettant le transport du sulfate au travers de la membrane plasmique ou l'efflux de sulfate de la vacuole. Le transporteur Sultr2;1 exprimé au niveaux foliaire et racinaire, est également exprimé au niveau du funicule, où il serait responsable du transport de sulfate à la graine en développement. Les lignes pointillées indiquent des voies de transport putatives. Modifié d'après Buchner *et al.* (2004b) et Takahashi *et al.* (2011b).

coenzyme-A ou la **thiamine pyrophosphate** synthétisés à partir de cystéine, sont indispensables à l'activité de plusieurs enzymes (Takahashi *et al.*, 2011b).

- Les **sulfolipides** fluidifient les membranes thylakoïdiennes et participeraient ainsi au bon déroulement de la photosynthèse.

- Les composés volatils (nitriles, **thiocyanates et isothiocyanates**) aux propriétés anti pathogéniques issus de la décomposition des **glucosinolates** par les myrosinases confèrent aux Brassicacées comme le colza une forte capacité de résistance face aux stress biotiques et abiotiques (Lambrix *et al.*, 2001; Wittstock & Halkier, 2002).

B – 2 Acquisition, transport et assimilation du soufre

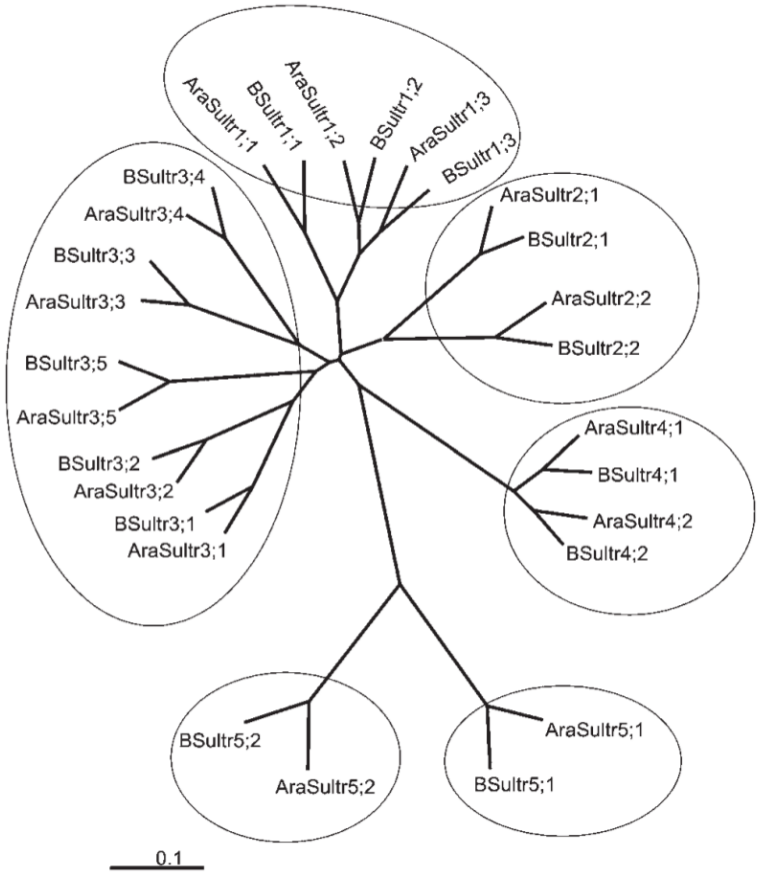
B – 2.a Absorption et transport du S chez les Brassicacées

Le soufre peut être absorbé **au niveau foliaire** sous différentes formes gazeuses atmosphériques : SO_2, H_2S, COS, CH_3-SH. Le composé S gazeux le plus abondant dans l'atmosphère est le dioxyde de S (SO_2), pouvant être prélevé de 3 manières au niveau foliaire : par les stomates, majoritairement, mais aussi à travers la cuticule, sous forme de dépôts humides ou secs. Néanmoins, ces différents types de prélèvements foliaires, non négligeables à proximité des zones industrielles où la pollution est importante, ne constituent qu'une part minoritaire de l'absorption du S chez les Brassicacées (Leustek & Saito, 1999).

Le soufre est en effet principalement absorbé de manière active, sous forme de sulfate (SO_4^{2-}), **au niveau racinaire**. Le sulfate ainsi prélevé peut être stocké au niveau vacuolaire et éventuellement assimilé dans les cellules racinaires. Cependant, le sulfate absorbé est rapidement distribué dans toute la plante pour y être assimilé ou stocké au niveau vacuolaire sous forme de sulfate, principalement au sein des feuilles (Figure II.6 ; Blake-Kalff *et al.*, 1998; Kataoka *et al.*, 2004b; Dubousset *et al.*, 2009). Ainsi, la teneur en sulfate augmente, les teneurs en glutathion et en glucosinolates baissent, tandis que la teneur en composés soufrés insolubles varie peu avec l'âge de la feuille (Blake-Kalff *et al.*, 1998). Ces différences traduisent un métabolisme du S différent selon l'âge de la feuille considérée.

L'absorption et le transport du sulfate sont permis par l'intervention de transporteurs de sulfate, au nombre de 14 chez *Arabidopsis thaliana* et *Brassica napus* et classés en 5 groupes sur la base de leurs homologies de séquences (Figure II.7A ; Hawkesford, 2003;

A



B

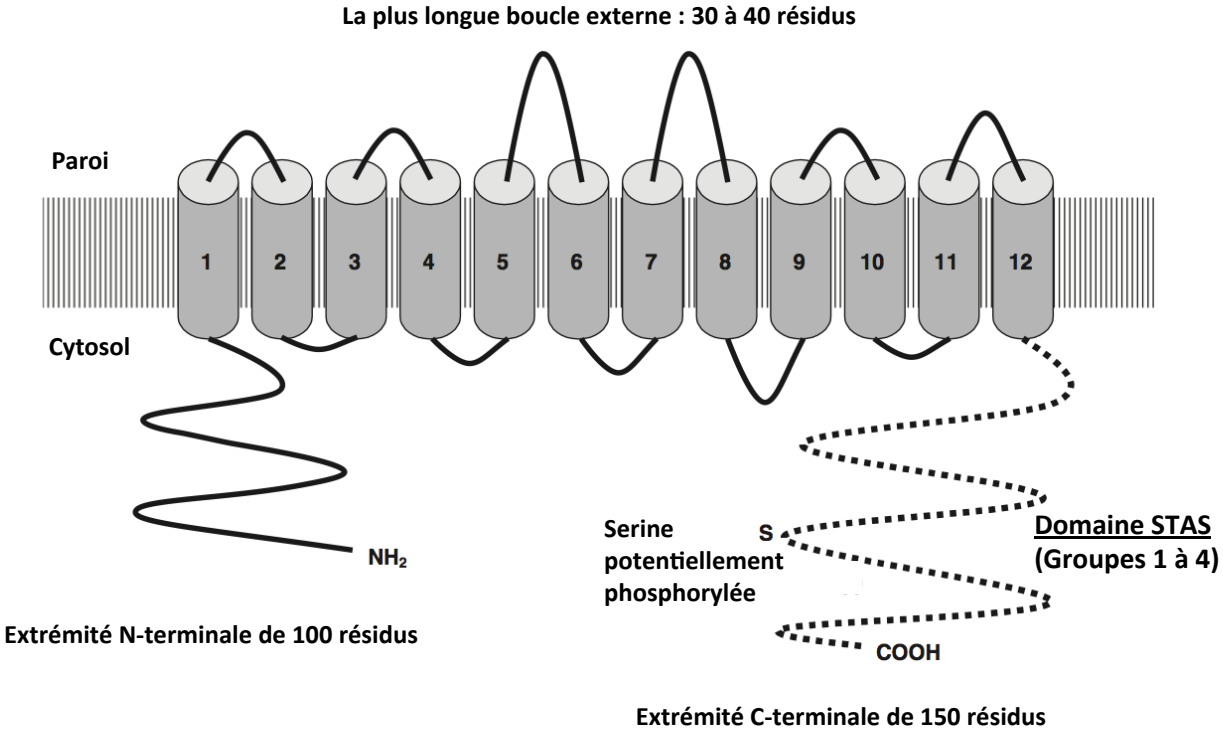


Figure II.7 Transporteurs de sulfate chez les Brassicacées.

A : Arbre phylogénétique des transporteurs de sulfate mis en évidence chez *Arabidopsis thaliana* et *Brassica napus*. D'après Parmar *et al.* (2007). B : Structure des transporteurs de sulfate suggérée par l'analyse des séquences des gènes correspondants. Le domaine STAS (« Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist »), présent au niveau de l'extrémité C-terminale des transporteurs des groupes 1 à 4, est absent des transporteurs du groupe 5. D'après Hawkesford (2003).

Buchner *et al.*, 2004b,a; Parmar *et al.*, 2007). Généralement constitués de 12 domaines transmembranaires, ces transporteurs, à l'exception des transporteurs du groupe 5, possèdent un domaine STAS (« Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist ») en C-terminal, qui semble indispensable à leur activité et pourrait avoir un rôle régulateur (Figure II.7B ; Hawkesford, 2000; Rouached *et al.*, 2005). Ces transporteurs fonctionnent comme des symports $3H^+/SO_4^{2-}$, le gradient de protons (H^+) fournissant l'énergie nécessaire au transport étant maintenu par une pompe H^+/ATPase. Ces transporteurs ont fait l'objet de nombreuses études fonctionnelles, en particulier chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* révélant l'existence d'expression, de localisation et d'activité variables entre ces différents groupes, associées à la fonction de chacun de ces transporteurs :

- Au niveau racinaire, l'absorption du sulfate implique les deux transporteurs du **groupe 1** (Sultr1;1 et Sultr1;2) de haute affinité pour le sulfate (Km de 3,6 ± 0,6 μM et 6,9 ± 1,0 μM respectivement), et exprimés préférentiellement au niveau des poils absorbants et des cellules racinaires épidermiques et corticales chez *Arabidopsis thaliana* (Figure II.6). Ces deux protéines ne sont pas régulées de la même manière et ne participent pas équitablement à l'absorption de sulfate au niveau racinaire, principalement assurée par le transporteur Sultr1;2 chez *Arabidopsis thaliana* (Yoshimoto *et al.*, 2002; Barberon *et al.*, 2008; Rouached *et al.*, 2008). L'expression racinaire des gènes *SULTR1;1* et *SULTR1;2* est réprimée lorsque le S est absorbé en quantité suffisante, et cette répression semble être permise par les cytokinines (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004a). Le transporteur Sultr1;2 est également exprimé dans la membrane plasmique des cellules de garde, mais son rôle au sein de ces cellules n'est pas encore connu (Takahashi *et al.*, 2000; Yoshimoto *et al.*, 2002; 2007). Le transporteur Sultr1;3, également de haute affinité pour le sulfate, est exprimé de façon spécifique dans les cellules compagnes du phloème, aux niveaux racinaire et foliaire et serait impliqué dans la distribution du S des organes sources aux organes puits (Yoshimoto *et al.*, 2003).

- Les transporteurs du groupe 2, de moindre affinité pour le sulfate (Km>100 μM) sont spécifiquement exprimés au niveau des tissus conducteurs. Dans les racines, le transporteur Sultr2;1 est exprimé au niveau des cellules du parenchyme xylémien et des cellules du péricycle, suggérant son rôle dans le transport de SO_4^{2-} des racines

vers les feuilles, tandis que le transporteur Sultr2;2 est exprimé au niveau phloémien, et semble donc impliqué dans sa réallocation. Le transporteur Sultr2;1 est également exprimé au niveau foliaire dans les cellules du parenchyme xylémien et du phloème, où il permettrait le transport du SO_4^{2-} entre l'apoplaste et les tissus conducteurs (Figure II.6 ; Takahashi *et al.*, 2000), ainsi qu'à la base de la silique et au niveau du funicule, organe connectant le péricarpe aux graines, lui conférant un rôle supposé dans le remplissage en S de la graine (Awazuhara *et al.*, 2005).

- La capacité de transport de sulfate n'a pas encore été clairement démontrée pour les transporteurs du groupe 3, chez *Arabidopsis thaliana* comme chez *Brassica napus*. De par leurs homologies de séquences, les 5 membres de ce groupe peuvent être répartis dans 3 sous-groupes. Le premier sous groupe est composé des transporteurs Sultr3;1 et 3;2, le second des transporteurs Sultr3;3 et 3;4 et le troisième du transporteur Sultr3;5 (Buchner *et al.*, 2004b,a). La localisation de l'expression des gènes codant les transporteurs de sulfate putatifs du groupe 3 est différente en fonction de l'espèce étudiée et du stade de développement de la plante. À titre d'exemple, le gène *SULTR3;1*, exprimé dans les racines et les tiges chez *Brassica oleracea* (Buchner *et al.*, 2004a), est exprimé préférentiellement dans les feuilles au stade végétatif ainsi qu'au niveau des tiges, des fleurs et des graines au stade reproducteur chez *Arabidopsis thaliana* (Takahashi *et al.*, 2000; Zuber *et al.*, 2010a). L'expression hétérologue du gène *SULTR3;5* d'*Arabidopsis thaliana* dans une souche de levure déficiente pour le transport de sulfate n'entraine pas d'absorption de sulfate par la levure, mais a un impact positif sur l'activité du transporteur Sultr2;1, suggérant un rôle potentiel du transporteur Sultr3;5 dans le transport du sulfate de la racine vers les parties aériennes (Kataoka *et al.*, 2004a). Les protéines Sultr3;4 et Sultr3;5, dont les gènes sont fortement exprimés dans la graine d'*Arabidopsis thaliana*, interviendraient dans le transport du sulfate entre les différents tissus de la graine au cours de son développement (Zuber *et al.*, 2010a). Contrairement aux transporteurs des groupes 1 et 2, les transporteurs du groupe 3 ne sont pas régulés par la disponibilité en S.

- Exprimés préférentiellement dans les cellules périvasculaires aux niveaux foliaire et racinaire chez *Arabidopsis thaliana*, les transporteurs Sultr4;1 et Sultr4;2, localisés

dans la membrane vacuolaire, sont responsables de l'efflux de sulfate du tonoplaste (Kataoka *et al.*, 2004b). L'analyse de doubles mutants *sultr4;1/sultr4;2* en comparaison de simples mutants *sultr4;1* et *sultr4;2* révèle que l'efflux de sulfate de la vacuole vers le cytosol est majoritairement permis par le transporteur Sultr4;1 dans les racines (Kataoka *et al.*, 2004b). Le gène *SULTR4;1* est également fortement exprimé dans la graine en développement d'*Arabidopsis thaliana*. La forte accumulation de sulfate dans les graines de mutants *sultr4;1* suggère l'implication de ce transporteur dans la gestion du sulfate par la graine en développement (Zuber *et al.*, 2010b). Cependant, la localisation vacuolaire de Sultr4;1 dans la graine n'a pas encore été prouvée.

- Les séquences protéiques des deux transporteurs du groupe 5 (Sultr5;1 et Sultr5;2) sont plus courtes que celles des transporteurs des autres groupes (environ 450 acides aminés contre 650 approximativement pour les groupes 1 à 4), suggérant un rôle et une régulation spécifiques de ces protéines. Aucune activité de transport de sulfate n'a encore été démontrée pour ces protéines à ce jour. La protéine Sultr5;2 est cependant impliquée dans le transport de molybdate (Tomatsu *et al.*, 2007).

Le soufre pourra être transporté entre les différents organes de la plante par le phloème, sous forme de sulfate par l'intervention des différents transporteurs de sulfate, (Hawkesford & De Kok, 2006), mais également une fois réduit sous forme de GSH (Foyer *et al.*, 2001), de méthionine (Balint & Rengel, 2011a), mais aussi de *S*-méthylméthionine (SMM; Bourgis *et al.*, 1999). Après vernalisation, la tige, les ramifications et les jeunes feuilles, puis les graines deviennent des organes puits pour le S provenant de l'absorption racinaire de sulfate, mais aussi de la remobilisation des réserves soufrées accumulées dans les feuilles préexistantes, devenues des organes sources pour le S. En conditions non limitantes, la remobilisation du S des feuilles au profit des graines est faible chez le colza, mais elle est induite par la limitation en S (Buchner *et al.*, 2004b; Parmar *et al.*, 2007; Dubousset *et al.*, 2010; § B – 3.a.i).

B – 2.b Assimilation du S chez les Brassicacées

Une fois absorbé et acheminé aux cellules foliaires, le sulfate peut être stocké au niveau vacuolaire, mais est avant tout transporté dans les plastes où il est activé en adénosine 5'-

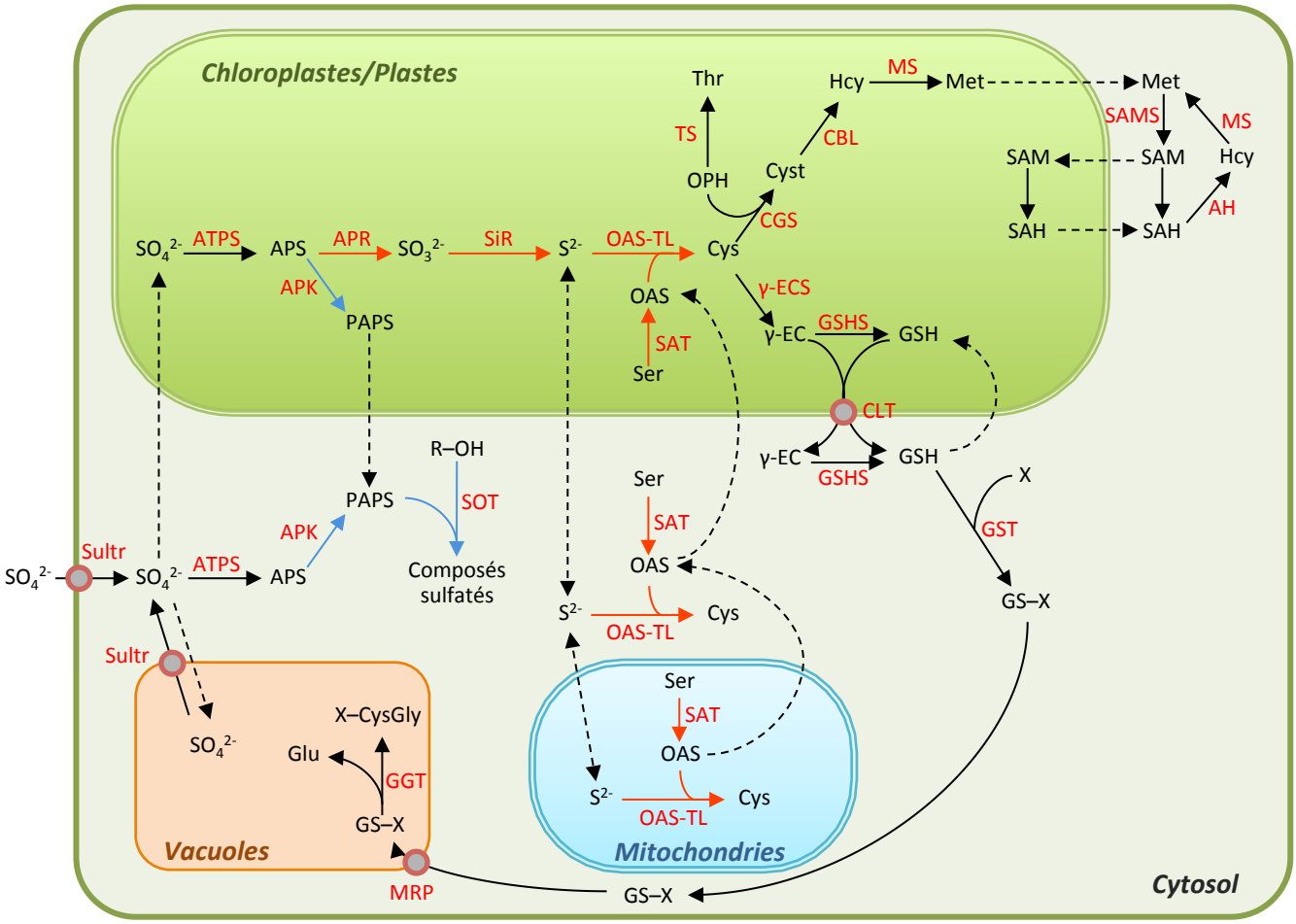


Figure II.8 Organisation cellulaire du métabolisme soufré chez les Brassicacées.

Les ions et les métabolites sont indiqués en noir, les enzymes et transporteurs en rouge. Les ronds rouges représentent les transporteurs permettant le transport de métabolites au travers d'une membrane. Les lignes pointillées indiquent des voies de transport putatives. La voie d'assimilation réductrice, indiquée par des flèches rouges, permet la synthèse de cystéine à partir du sulfate activé en APS par l'ATPS. La cystéine, précurseur de la synthèse de méthionine et du glutathion, sera également à l'origine d'autres composés soufrés tels que la thiamine ou encore le coenzyme A. La voie d'assimilation non réductrice, indiquée par des flèches bleues, permet la synthèse de PAPS à partir d'APS. Les glucosinolates constituent les principaux composés sulfatés synthétisés à partir du PAPS.

Abréviations utilisées pour les métabolites : APS, adénosine 5'-phosphosulfate ; Cys, cystéine ; Cyst, cystathionine ; Glu, glutamate ; GSH, glutathion réduit; GS-X, glutathion conjugué ; γ-EC, γ-glutamylcystéine ; Hcy, homocystéine ; Met, méthionine ; OAS, *O*-acétylsérine ; OPH, *O*-phosphohomosérine ; PAPS, 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate ; R–OH, précurseur hydroxylé ; SAH, *S*-adénosylhomocystéine ; SAM, *S*-adénosylméthionine ; Ser, sérine ; Thr, thréonine ; X–CysGly, cystéinylglycine conjuguée. Abréviations utilisées pour les enzymes et transporteurs : AH, adénosylhomocystéinase ; APK, APS kinase ; APR, APS réductase ; ATPS, ATP sulfurylase ; CBL, cystathionine β-lyase ; CGS, cystathionine γ-synthase ; CLT, transporteur de thiol ; GGT, γ-glutamyltransférase ; GSHS, glutathion synthétase ; GST, glutathion S-transférase ; γ-ECS, γ-EC synthétase ; MRP, multidrug resistance-associated protein ; MS, méthionine synthase ; OAS-TL, OAS thiol-lyase ; SAMS, SAM synthétase ; SAT, sérine acétyltransférase ; Sir, sulfite réductase ; SOT, sulfotransférases ; Sultr, transporteur de sulfate ; TS, thréonine synthase. Traduit de Takahashi *et al.* (2011b).

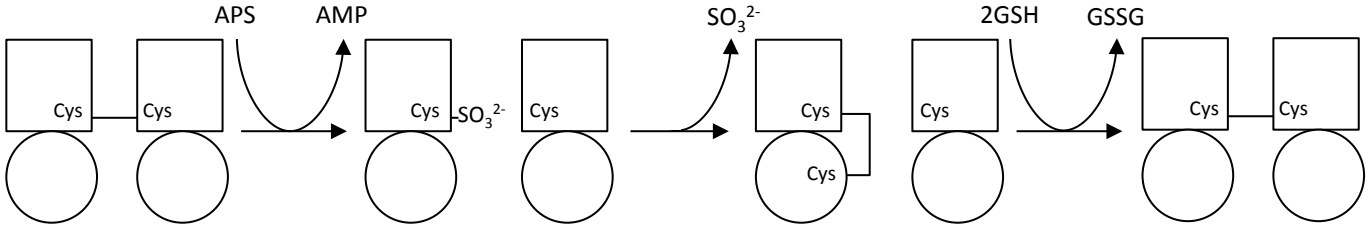


Figure II.9 Étapes de la réaction catalysée par l'APR.

L'APS réductase (APR) est active sous forme d'un dimère lié par un pont disulfure et catalyse une réaction pouvant être divisé en trois étapes indépendantes : le groupement sulfate de l'APS est transféré sur un résidu cystéine de l'APR, provoquant la dissociation du dimère, le sulfite est libéré par le domaine C-terminal, en formant probablement un pont disulfure intramoléculaire, et la néoformation du pont disulfure entre deux monomères d'APR, rétablissant l'activité enzymatique. Les carrés et les ronds représentent respectivement les domaines N- et C-terminaux de l'APR. APS, adénosine 5'-phosphosulfate ; Cys, cystéine ; GSH, glutathion réduit ; GSSG, glutathion oxydé. Adapté de Kopriva & Koprivova (2004).

phosphosulfate (APS) par l'ATP sulfurylase (ATPS), première enzyme impliquée dans l'assimilation du sulfate (Figure II.8). La réaction catalysée par l'ATPS se produit également au niveau cytosolique. L'APS, à l'origine des différents métabolites soufrés retrouvés chez les végétaux peut intégrer 2 voies métaboliques distinctes :

- *La voie de l'assimilation non réductrice (Figure II.8) :* Une part minoritaire de l'APS produit par l'ATP sulfurylase est phosphorylée en 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS) par une APS kinase, enzyme présente dans les compartiments cytosolique et plastidial. Le groupement sulfate du PAPS est ensuite conjugué à une molécule organique comprenant un groupement hydroxyle libre. Il s'agit de la réaction de sulfatation, catalysée par des sulfotransférases et permettant la synthèse des phytosulfokines, mais aussi, chez les Brassicacées, la synthèse des glucosinolates. Chez les végétaux, l'assimilation non réductrice est néanmoins un processus mineur : le sulfate absorbé est généralement réduit en cystéine au niveau foliaire par la voie d'assimilation dite « réductrice », décrite ci-dessous (Leustek & Saito, 1999).

- *La voie de l'assimilation réductrice (Figure II.8) :* L'APS produit au niveau plastidial est principalement réduit en sulfite (SO_3^{2-}) par une APS réductase (APR), enzyme clé de la voie d'assimilation réductrice (Kopriva & Koprivova, 2004). La réaction catalysée par l'APR – active sous forme d'un dimère lié par un pont disulfure – peut être divisée en trois étapes indépendantes : le transfert du groupement sulfate de l'APS à un résidu cystéine de l'APR, provoquant la dissociation du dimère, la libération du sulfite par le domaine C-terminal formant probablement un pont disulfure intramoléculaire et la néoformation du pont disulfure entre deux monomères d'APR, rétablissant l'activité enzymatique (Figure II.9). Pour cette dernière étape, le pouvoir réducteur est apporté par le glutathion sous forme réduite. Le sulfite formé par l'APR, pouvant être intégré dans les sulfolipides, est cependant majoritairement réduit en sulfide (S^{2-}) par une sulfite réductase. Une part du 3-phosphoglycérate issu de la glycolyse est transformée en sérine par un ensemble de réactions oxydatives ainsi qu'un transfert de groupement amine. La sérine est activée en *O*-acétylsérine (OAS) sous l'action de la sérine acétyltransferase (SAT), appartenant au complexe cystéine synthase. Le S^{2-} est conjugué à l'OAS, formant ainsi la cystéine, réaction catalysée par l'*O*-acétylsérine thiol-lyase (OAS-TL), enzyme appartenant également au complexe cystéine synthase

(Droux *et al.,* 1998). La cystéine, pouvant être incorporée au sein des protéines, est également le précurseur de la méthionine, du glutathion, mais aussi de vitamines et de coenzymes (Leustek & Saito, 1999; Kopriva *et al.*, 2009).

Toutes les enzymes impliquées dans l'assimilation du sulfate en cystéine, à l'exception de la sulfite réductase, sont présentes sous plusieurs isoformes chez *Arabidopsis thaliana* (Pour review, Kopriva *et al.*, 2009). À titre d'exemple, l'APR est retrouvée sous 3 isoformes codées à partir de 3 gènes distincts : *APR1*, *APR2* et *APR3*. La protéine APR2 est responsable de la majeur partie de l'activité APS réductase (Loudet *et al.*, 2007). Ces isoformes peuvent avoir des localisations subcellulaires différentes, comme pour le complexe cystéine synthase, présent au niveau plastidial, cytosolique et mitochondrial (Takahashi *et al.*, 2011b). De plus, tandis que les plastes sont responsables de la production de sulfide et que la majorité de l'OAS est produite par la SAT au niveau mitochondrial, le cytosol apparaît être le site majoritaire de production de cystéine (Haas *et al.*, 2008; Figure II.8). Au niveau cytosolique, la cystéine peut être dégradée en H_2S et pyruvate par l'action d'une cystéine désulfydrase (Álvarez *et al.,* 2010).

B – 3 Réponses des Brassicacées à la limitation en S

La compréhension des mécanismes physiologiques impliqués dans la réponse de *Brassica napus* à la limitation en S demeure encore largement méconnue. La majorité des études sur le sujet ont été réalisée chez *Arabidopsis thaliana*, plante modèle de la famille des Brassicacées dont la physiologie, la morphologie, ainsi que les besoins nutritionnels sont différents de ceux du colza. De plus, le génome du colza est de grande taille, estimé à 1130 Mpb (2n=4x=38 ; Johnston *et al.*, 2005), contre 125 Mpb pour *Arabidopsis thaliana* (2n=10 ; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), sélectionnée comme plante modèle pour son petit génome. *Arabidopsis thaliana*, également polyploïde, est issue d'un croisement bien plus ancien que *Brassica napus*, qui daterait d'environ 112 millions d'années (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Ces spécificités confèrent au colza une capacité d'adaptation non négligeable par rapport à *Arabidopsis thaliana*. Ainsi, les informations recueillies chez cette dernière permettent d'appréhender la physiologie et les effets de limitations nutritionnelles chez *Brassica napus*, mais sont parfois différentes des observations et mesures réalisées chez la plante de grande culture.

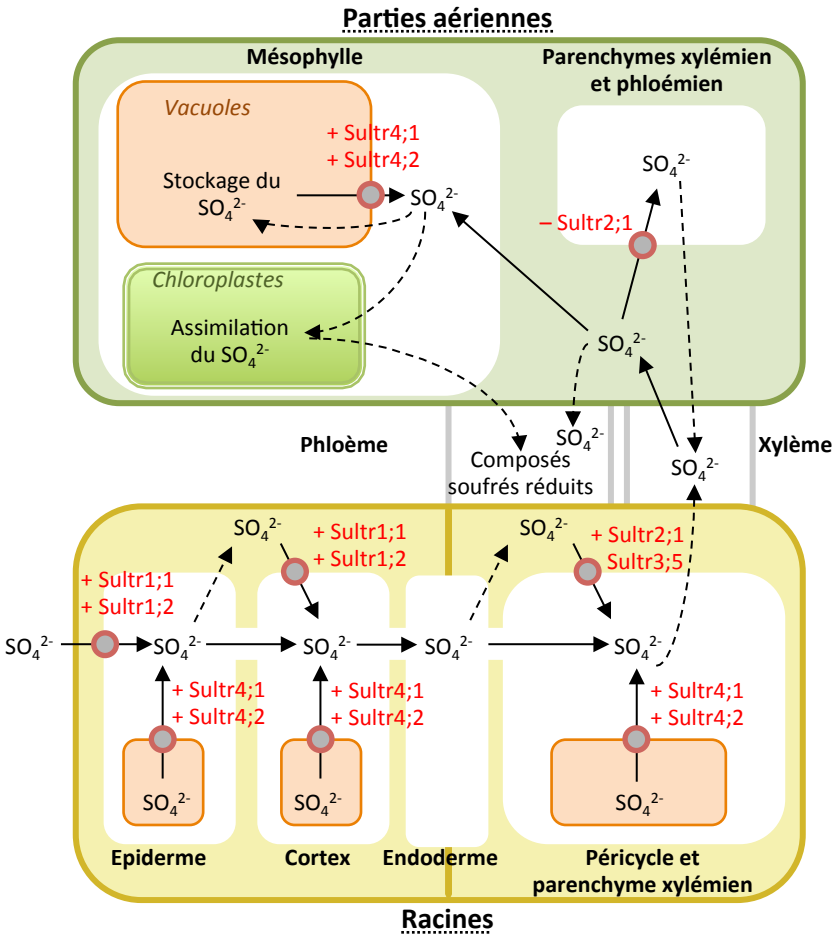


Figure II.10 Modifications de l'expression des transporteurs de sulfate au niveau racinaire et foliaire en réponse à une limitation en sulfate chez *Arabidopsis thaliana*.

Expression induite (+) ou réprimée (-).

Les différences de profils d'expression et de régulation des gènes impliqués dans la gestion du S en fonction de l'organe considéré reflètent la relative complexité du transport et de l'assimilation du S au sein de la plante entière. De plus, une déficience en S provoque chez le colza des effets variables selon le stade de développement auquel elle survient et l'importance des réserves soufrées préalablement accumulées par la plante, notamment sous forme de sulfate vacuolaire.

B – 3.a Réponses métaboliques et transcriptomiques

Selon une étude menée par Nikiforova et ses collaborateurs (2004), environ 825 gènes présentent une expression significativement modulée par la limitation en S chez *Arabidopsis thaliana*. Dans un premier temps, la plupart de ces gènes sont surexprimés, puis, en cas de limitation prolongée de l'apport de sulfate, l'expression de nombreux gènes est réprimée (Nikiforova *et al.*, 2004). L'ensemble des travaux réalisés chez *Arabidopsis thaliana* montre que la réponse transcriptomique se manifeste graduellement, tandis que le métabolome adopte rapidement un nouvel équilibre, traduisant la complexité de la réponse de la plante à la limitation en S. La perception de la déficience en S et la transduction de ce signal sont actuellement peu connues. Néanmoins, l'absorption, l'assimilation et le transport du S sont régulés par le statut soufré de la plante (Saito, 2004). De plus, en tant que composante du métabolisme primaire des végétaux, le métabolisme soufré est finement coordonné avec les métabolismes carbonés et azotés (Kopriva & Rennenberg, 2004; Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004b), rendant d'autant plus difficiles l'étude et la compréhension des voies impliquées dans la transduction de ce signal.

B - 3.a.i Au niveau du métabolisme soufré (Figures II.10 et II.11)

- *Modification du statut soufré.* Chez *Brassica napus* et *Arabidopsis thaliana*, une restriction en S provoque une baisse importante des teneurs de l'ensemble des composés soufrés dans les feuilles jeunes et matures. Les teneurs en sulfate de chaque organe baissent de manière importante (Blake-Kalff *et al.*, 1998). La teneur des métabolites dépendants directement de la fourniture en composés soufrés réduits, notamment le glutathion (au niveau des jeunes feuilles) et la cystéine, diminue également, alors que la teneur en méthionine est maintenue (Blake-Kalff *et al.*, 1998; Nikiforova *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 2007). La teneur en SAM, précurseur de la synthèse des chlorophylles, diminue. Des profilages métaboliques effectués

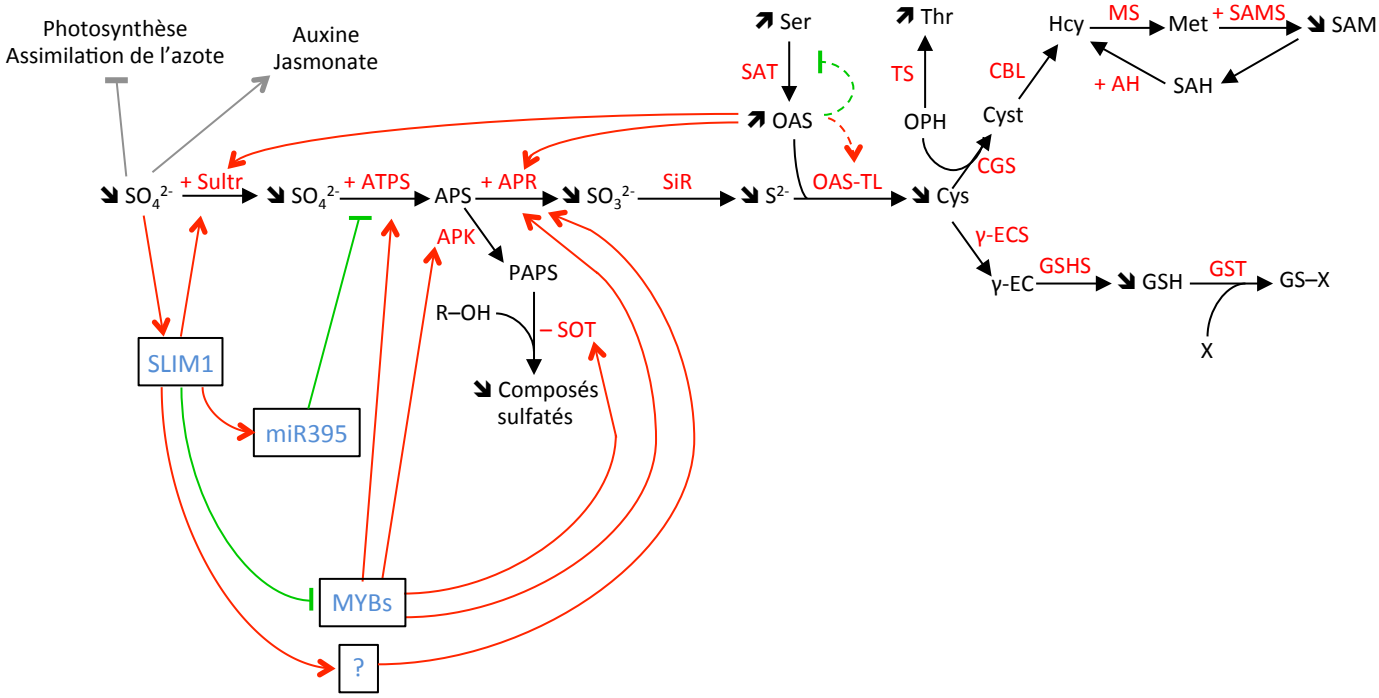


Figure II.11 Régulation du métabolisme soufré en réponse à une limitation en sulfate chez *Arabidopsis thaliana*.

Les ions et les métabolites sont indiqués en noir, les enzymes et transporteurs en rouge. Les lignes continues rouges et vertes représentent respectivement une induction et une répression de l'expression du ou des gènes correspondants. Les signes « + » et « - » indiquent respectivement une régulation positive et négative de l'expression génique. Les lignes pointillées rouges et vertes représentent respectivement une régulation post-traductionnelle positive et négative de l'activité de la protéine correspondante. Les lignes grises indiquent les autres voies métaboliques affectées par la limitation en sulfate. Les facteurs de transcriptions (SLIM1, MYBs) et le micro-ARN miR395, sont indiqués en bleu et encadrés. Abréviations utilisées pour les métabolites : APS, adénosine 5'-phosphosulfate ; Cys, cystéine ; Cyst, cystathionine ; GSH, glutathion réduit ; GS-X, glutathion conjugué ; γ-EC, γ-glutamylcystéine ; Hcy, homocystéine ; Met, méthionine ; OAS, *O*-acétylsérine ; OPH, *O*-phosphohomosérine ; PAPS, 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate ; R–OH, précurseur hydroxylé ; SAH, *S*-adénosylhomocystéine ; SAM, *S*-adénosylméthionine ; Ser, sérine ; Thr, thréonine. Abréviations utilisées pour les enzymes et transporteurs : AH, adénosylhomocystéinase ; APK, APS kinase ; APR, APS réductase ; ATPS, ATP sulfurylase ; CBL, cystathionine β-lyase ; CGS, cystathionine γ-synthase ; GSHS, glutathion synthétase ; GST, glutathion S-transférase ; γ-ECS, γ-EC synthétase ; MS, méthionine synthase ; OAS-TL, OAS thiol-lyase ; SAMS, SAM synthétase ; SAT, sérine acétyltransférase ; Sir, sulfite réductase ; SOT, sulfotransférases ; Sultr, transporteur de sulfate ; TS, thréonine synthase. D'après Nikiforova *et al.* (2004) et Takahashi *et al.* (2011b).

chez *Arabidopsis thaliana* révèlent également que les précurseurs des métabolites dépendants de la fourniture en S s'accumulent : c'est le cas de l'OAS, de la sérine, de la glycine, et de la putrescine (Nikiforova *et al.*, 2004). Les niveaux d'expression de certains transporteurs de sulfate et d'enzymes intervenant dans son assimilation sont dépendants du statut soufré de la plante, et plus précisément de l'organe considéré.

- *Régulation de l'absorption du sulfate et de la remobilisation des réserves vacuolaires (Figure II.10).* En réponse à une réduction de l'apport de S au niveau racinaire, une augmentation de l'expression de nombreux transporteurs de SO_4^{2-} est observée chez *Arabidopsis thaliana* (Rouached *et al.*, 2009) et *Brassica napus* (Parmar *et al.*, 2007). L'expression du transporteur Sultr1;1, et dans une moindre mesure celle de Sultr1;2, impliqués dans l'absorption de sulfate au niveau racinaire, sont augmentées au niveau transcriptionnel (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004b) et traductionnel (Yoshimoto *et al.*, 2007), permettant une augmentation des capacités d'absorption de cet élément (Figure II.10). En réponse à la restriction en sulfate, une augmentation de l'expression des gènes *SULTR4;1* et *SULTR4;2* au niveau foliaire et du gène *SULTR4;2* au niveau racinaire, permet une redistribution accrue du sulfate vacuolaire stocké au niveau des feuilles matures, des feuilles âgées et des racines au profit des organes en croissance (Figure II.10), chez *Arabidopsis thaliana* (Kataoka *et al.*, 2004b) et chez *Brassica napus* (Dubousset *et al.*, 2009). Dans les tissus vasculaires, l'expression des gènes *SULTR1;3* et *SULTR2;1* augmente également au niveau racinaire, favorisant le transfert de S vers les parties aériennes en réponse à la restriction en sulfate (Takahashi *et al.*, 2000; Yoshimoto *et al.*, 2003; figure II.10). *A contrario*, l'expression du transporteur Sultr2;1 est réduite au niveau foliaire, ce qui pourrait contribuer à limiter la remobilisation du S des feuilles âgées vers les jeunes feuilles, et n'est pas modulée au niveau de la silique en réponse à la limitation en S (Takahashi *et al.*, 2000; figure II.10).

- *Régulation des voies d'assimilation du S (Figure II.11).* Des travaux récents mettent en évidence que la régulation de l'expression des gènes codant l'APR joue un rôle clé dans le contrôle de l'assimilation du S au niveau foliaire. En effet, le niveau d'expression du gène *APR2* chez *Arabidopsis thaliana* est contrôlé par la disponibilité en sulfate et corrélé avec les flux de réduction du sulfate (Vauclare *et al.*, 2002). Le

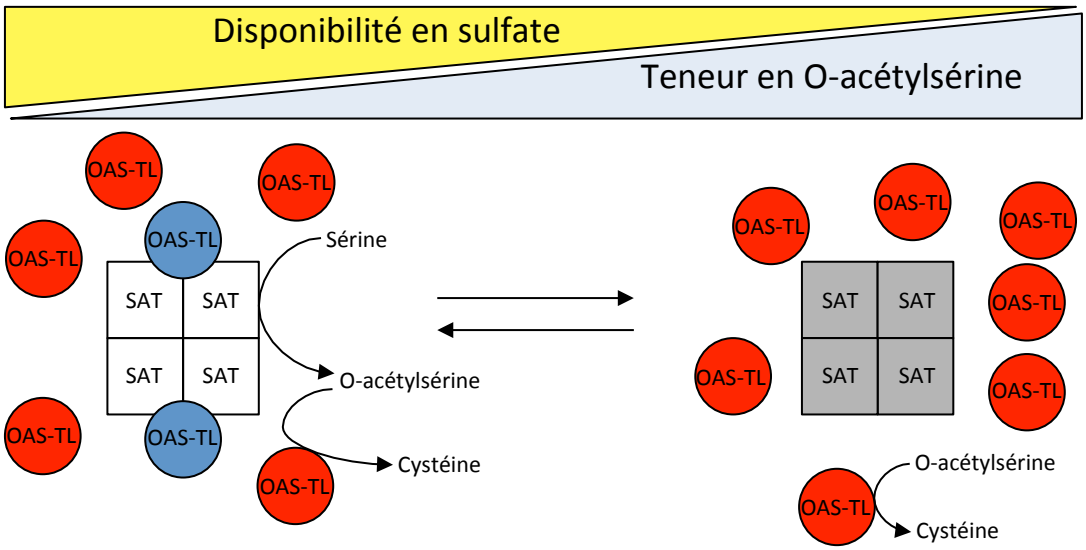


Figure II.12 Équilibre du complexe cystéine synthase (SAT/OAS-TL) en fonction de la disponibilité en sulfate.

Les carrés blancs et gris représentent la sérine acétyltransférase (SAT) active et inactive respectivement. Les cercles rouges et bleus représentent l'*O*-acétylsérine thiol-lyase (OAS-TL) active et inactive, respectivement. D'après Wirtz & Hell (2006).

niveau d'expression du gène *APS3* codant une ATPS est également augmenté dans les racines en réponse à la limitation en S (Lappartient *et al.*, 1999). Chez *Brassica oleracea*, outre l'augmentation de l'expression des gènes codant les transporteurs de sulfate, la restriction en S entraine également une augmentation de l'expression d'un gène codant une APR (Koralewska *et al.*, 2009). L'expression d'un gène codant une myrosinase putative, potentiellement impliquée dans la dégradation des glucosinolates, est également induite au niveau foliaire en cas de limitation en S chez *Arabidopsis thaliana*. La dégradation des glucosinolates pourrait ainsi, selon certains auteurs, constituer une source endogène de S en cas de restriction en sulfate (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003; Hirai *et al.*, 2004).

Généralement une bonne corrélation entre la régulation des niveaux d'expression des gènes codant les transporteurs de sulfate et les enzymes impliquées dans son assimilation et leurs activités est observée. Cependant, certaines protéines du métabolisme soufré, comme le complexe cystéine synthase constitué des enzymes SAT et OAS-TL, sont également contrôlés de manière post-traductionnelle, permettant à la plante de s'adapter rapidement à la disponibilité en S (Droux *et al.,* 1998). En condition d'alimentation S non limitante, une part du pool d'OAS-TL est recrutée au sein du complexe cystéine synthase, permettant l'activation de la SAT, la part libre d'OAS-TL demeurant active. L'accumulation d'OAS résultant d'une limitation de l'apport de S induit la dissociation du complexe, rendant la SAT inactive, tandis que l'ensemble des OAS-TL s'active (Droux *et al.,* 1998 ; Figure II.12). Les gènes codant 2 enzymes (la SAM synthétase et l'adénosylhomocystéinase) impliquées dans le recyclage de la SAM en méthionine sont induits par la restriction en S (Nikiforova *et al.*, 2004). Les gènes codant les enzymes des cycles glutathion-peroxydase et ascorbate-glutathion ont une expression plus forte en condition de limitation en S, ce qui permettrait de maintenir le glutathion sous sa forme réduite lui conférant ses propriétés de défense contre les stress. De même, une forte augmentation de l'expression du gène codant une isoflavonoïde réductase NAD(P)H dépendante, impliquée dans la défense contre les stress oxydatifs, est observée au niveau foliaire chez *Arabidopsis thaliana* (Nikiforova *et al.*, 2003).

- *Signaux impliqués dans la régulation du métabolisme S en réponse à la limitation en S (Figure II.11).* L'identification des signaux impliqués dans la régulation des gènes codant les protéines impliquées dans l'absorption, la remobilisation et l'assimilation du S en réponse à la limitation en S chez *Arabidopsis thaliana* a grandement progressé ces dernières années. L'expression de ces gènes est notamment régulée par les produits du métabolisme S et leurs précurseurs. Outre son rôle sur la régulation post-traductionnelle de l'activité du complexe cystéine synthase, l'accumulation d'OAS pourrait avoir un rôle dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes, tels que ceux codants des transporteurs de sulfate et des enzymes responsables de son assimilation (Koprivova *et al.*, 2000; Hirai & Saito, 2004; figure II.11). La diminution de la teneur en GSH, transporté par la sève phloémienne, influerait également sur l'expression racinaire des gènes codant l'ATP sulfurylase et les transporteurs de sulfate, augmentant les capacités de transport et d'assimilation du sulfate au niveau racinaire (Lappartient *et al.*, 1999). Mais les rôles régulateurs de l'OAS et du GSH sont actuellement fortement remis en question (Rouached *et al.*, 2008). Expérimentant un grand nombre de traitements, Rouached et ses collaborateurs n'ont en effet constaté aucune corrélation significative entre l'expression des gènes *SULTR1;1* et *SULTR1;2* et les niveaux d'accumulation d'OAS et de GSH au niveau racinaire. L'induction et la répression de l'expression de ces deux gènes ne sont observées que dans le cas d'application directe d'OAS et de GSH respectivement, ce qui ne constitue pas une preuve de leurs rôles régulateurs dans des conditions de croissance conventionnelles.

  Chez *Arabidopsis thaliana*, l'expression du gène *SULTR1;2*, est contrôlée en fonction de la disponibilité en sulfate par l'intermédiaire du facteur de transcription SLIM1. Ce facteur de transcription régule négativement la synthèse des glucosinolates en condition d'alimentation soufrée limitante, réprimant l'expression de facteurs de transcription spécifiques de la famille des MYB (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2006) et favorisant ainsi la voie d'assimilation réductrice du sulfate (Figure II.10). En cas de limitation de l'apport de S, SLIM1 induit l'expression du micro-ARN miR395 dans les parties aériennes et racinaires. Ce micro-ARN, exprimé spécifiquement dans les cellules compagnes du phloème, cible les transcrits du gène *SULTR2;1* et de trois gènes codant l'ATP sulfurylase, *APS1*, *APS3* et *APS4*, ce qui conduit à leur dégradation

post-transcriptionnelle (Kawashima *et al.*, 2009; 2011). L'expression cellulaire spécifique de miR395 suggère que les sites réels de dégradation de ces transcrits sont relativement limités et explique la répression spécifique de l'expression de *SULTR2;1* dans les parties aériennes. Ainsi, la régulation de l'expression de *SULTR2;1* ne peut pas toujours être expliquée par l'accumulation de miR395, comme c'est le cas au niveau racinaire, où une induction de l'expression de ce gène est observée en réponse à la limitation en S (Takahashi *et al.*, 2000; Yoshimoto *et al.*, 2003). Le signal responsable de la régulation de l'expression des gènes codant l'APR en réponse à la limitation en S demeure inconnu à ce jour (Figure II.11).

B - 3.a.ii Au niveau du métabolisme azoté

Chez *Arabidopsis thaliana*, la faible synthèse d'acides aminés soufrés survenant suite à la limitation en S entraine l'accumulation d'acides aminés non soufrés comme la sérine – précurseur azoté de l'OAS et donc précurseur de la cystéine (Figure II.11) – la glycine, la glutamine, l'asparagine ou encore le tryptophane (Nikiforova *et al.*, 2004; 2005b). L'accumulation de ces acides aminés entraine une inhibition des voies d'absorption et d'assimilation du nitrate, *via* une baisse des activités nitrate réductase (NR) et glutamine synthétase (GS) (Kopriva & Rennenberg, 2004), et une répression de la transcription des gènes correspondants (Hirai *et al.*, 2004; 2005). En cas de limitation sévère ou prolongée de l'apport de S, les importantes modifications des voies de biosynthèse des acides aminés conduisent à une répression de la synthèse protéique.

B - 3.a.iii Au niveau du métabolisme carboné

Alors qu'une limitation en S de courte durée (6 à 13 jours) appliquée sur des plantules d'*Arabidopsis thaliana* entraine une accumulation de glycéraldéhyde-3-phosphate et de 3-phosphoglycérate (Nikiforova *et al.*, 2005b; 2006), une limitation en S de 17 jours appliquée au stade végétatif provoque une perturbation du ratio citrate/PEP et donc du cycle de Krebs au niveau foliaire, sans observer de variations de l'expression des gènes associés à ce cycle (Hirai *et al.*, 2004). Les différences constatées entre ces études pourraient s'expliquer par les différences de stade de développement des plantes sur lesquelles elles sont réalisées. Une autre explication pourrait être liée à la composition du milieu gélosé sur lesquels poussent les plantules de Nikiforova et ses collaborateurs (2005b; 2006) qui pourrait affecter la réponse à la limitation en S comme observé dans le cadre d'études sur la limitation en phosphate (Jain *et al.*, 2009). Chez la moutarde (*Brassica juncea*) et la navette (*Brassica*

rapa), une baisse des teneurs en chlorophylles et protéines solubles est observée au niveau foliaire, et ce, quel que soit le stade de développement (Ahmad & Abdin, 2000b).

En cas de limitation en S prolongée, Nikiforova et ses collaborateurs (2003) observent chez *Arabidopsis thaliana* une diminution de la teneur en sulfolipides, associée à la faible disponibilité en S et à la répression du gène *SQD2* responsable de leur biosynthèse. Cette modification de la composition lipidique limiterait le transfert d'énergie au sein des membranes thylakoïdiennes, ce qui entrainerait une réduction de la capacité de la plante à absorber les radiations photosynthétiquement actives. Dans cette étude, les gènes associés au métabolisme énergétique tels ceux codants des protéines membranaires impliquées dans la conservation de l'énergie et des protéines accessoires du transport des électrons sont sous-exprimés suite à la limitation. Selon ces auteurs, de nombreuses altérations des centres Fe-S des protéines du photosystème I (PSI) pourraient également intervenir dans la réduction des capacités photosynthétiques observée (Nikiforova *et al.*, 2003). La baisse des teneurs en SAM, intervenant dans les premières étapes de la synthèse des chlorophylles, pourrait également expliquer en partie le phénomène de chlorose observé au niveau des jeunes feuilles, contribuant également à altérer les capacités photosynthétiques des feuilles de plantes carencées en S. Ces auteurs n'ont cependant pas clairement démontré que ces dysfonctionnements putatifs de l'appareil photosynthétique conduisaient à une réelle chute de l'activité photosynthétique en réponse à une limitation en S. L'augmentation des teneurs en anthocyanes, pigments impliqués dans une voie alternative de protection contre le stress oxydatif lié aux forts éclairements semble néanmoins conforter ces interprétations (Nikiforova *et al.*, 2003; 2004).

B - 3.a.iv Autres métabolismes affectés par la limitation en S

Chez *Arabidopsis thaliana,* la limitation en S entraine une induction rapide de certains gènes impliqués dans la synthèse d'acide jasmonique (JA), comme *OPR1* ou le gène codant l'allène oxyde synthase (Nikiforova *et al.*, 2003). L'acide jasmonique pourrait avoir un effet positif sur le métabolisme soufré en cas de limitation en S, induisant l'expression de nombreux gènes, comme suggéré par les travaux de Jost et ses collaborateurs (2005). L'accumulation d'OAS consécutive à une déficience en soufre serait à l'origine de l'induction de l'expression d'une isoforme particulière de la nitrilase, enzyme catalysant la dernière étape de biosynthèse de l'auxine (AIA) à partir du tryptophane, métabolite accumulé en cas de limitation en S. D'autres gènes impliqués dans la synthèse d'AIA, comme celui codant une

A B

Figure II.13 Symptômes de carence en S observés chez le colza d'hiver au stade végétatif (A) et reproducteur (B).
HGCA Knowledge Centre (http://www.hgca.com)

A

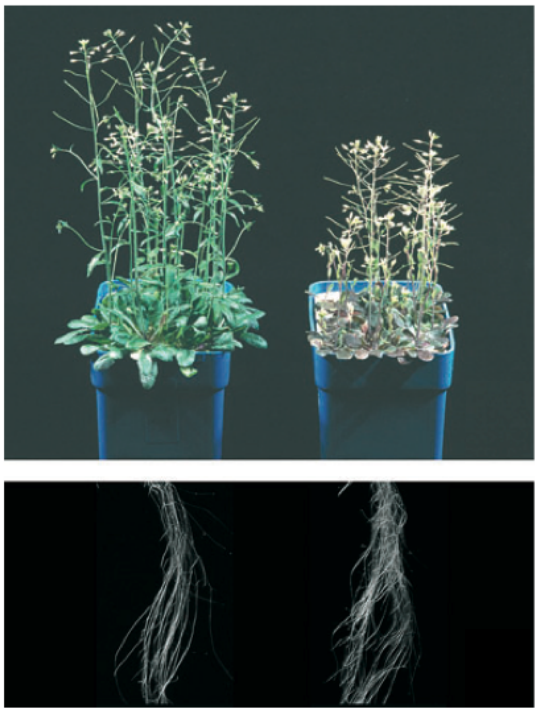


Figure II.14 Impact d'une restriction de l'apport de S sur la croissance des parties aériennes (A) et racinaires (B) d'*Arabidopsis thaliana*.
(Nikiforova *et al.,* 2004).

anthranilate synthase, sont induits en cas de déficience en S (Nikiforova *et al.*, 2003). L'AIA, régulant l'expression de nombreux gènes, pourrait intervenir en augmentant la croissance racinaire. Cependant, ces interprétations sont remises en cause par les travaux de Dan et ses collaborateurs (2007), qui suggèrent une réduction de l'accumulation d'auxine et/ou de la sensibilité à cette phytohormone en réponse à la limitation en S.

En plus des 825 gènes impliqués spécifiquement dans la réponse à la limitation en S, les gènes impliqués dans la plupart des stress abiotiques sont généralement induits (Nikiforova *et al.*, 2004).

B – 3.b Réponses physiologiques et symptômes de déficience en S

Lorsqu'une restriction en S survient chez des colzas auparavant bien alimentés, les mécanismes d'adaptation du métabolisme soufré permettent à la plante de supporter la limitation en S durant une période relativement longue en favorisant les processus d'absorption, de redistribution et d'assimilation du sulfate disponible. Chez le colza, contrairement à une limitation en nitrate, une limitation en S provoque une entrée en sénescence plus tardive des feuilles âgées, permettant ainsi une remobilisation plus importante du S présent au sein de ces organes au profit des organes en croissance (Dubousset *et al.*, 2009; 2010).

Chez des colzas ayant peu de réserves soufrées en comparaison de leurs besoins, la remobilisation du S endogène n'est pas/plus suffisante pour permettre au colza de résister à une restriction en sulfate. Les métabolismes azotés et carbonés vont alors se trouver davantage affectés et des symptômes de déficience vont se manifester. Ainsi, en cas de restriction sévère ou prolongée de l'apport de S au stade végétatif, des signes de chlorose se manifestent au niveau des jeunes feuilles de colza (Figure II.13A). La croissance de ces jeunes feuilles est affectée, ce qui se traduit par une diminution du rapport des biomasses des parties aériennes sur les biomasses des parties racinaires (Blake-Kalff *et al.*, 1998; Parmar *et al.*, 2007). Au stade reproducteur, une déficience en S se traduit par une coloration jaune pâle des pétales (Figure II.13B). Chez *Arabidopsis thaliana*, une limitation en S minéral entraîne un plus fort développement du système racinaire, une diminution du nombre et de la surface des feuilles, ainsi que des phénomènes de chlorose (Nikiforova *et al.*, 2004; figure II.14).

Les résultats rapportés par Dubuis et ses collaborateurs (2005) suggèrent une baisse de la capacité de résistance du colza aux attaques microbiennes en cas de déficience sévère en S, notamment liée à une modification du contenu en glucosinolates.

Ainsi, malgré une augmentation de la proportion de S de la plante retrouvée dans les graines matures (SHI pour « S Harvest Index »), lorsqu'une limitation en S survient relativement tôt dans le cycle de développement du colza et/ou que la remobilisation des réserves stockées n'est pas suffisante pour assurer le bon remplissage de la graine, le rendement ainsi que la qualité des graines seront affectés (Dubousset *et al.*, 2010).

Les conséquences agronomiques d'une limitation de l'apport de S et les modifications métaboliques et physiologiques de la graine associées sont traitées dans le § D – 4, après un rappel succinct des connaissances actuelles i) du processus de développement de la graine de colza, ii) de la constitution de ses réserves lipidiques et protéiques iii) de sa germination, et iv) de l'implication du S dans ces processus.

C La graine de colza : développement, remplissage et germination

Favorisant sa survie dans des conditions où l'eau n'est pas continuellement présente, l'émergence de la graine au cours de l'évolution a permis au règne végétal de coloniser le milieu terrestre (Steeves, 1983). La structure de la graine permet en effet la protection de l'embryon dans l'attente de conditions favorables à la germination. En tant qu'unité de dispersion de l'espèce, la graine occupe une place fondamentale dans le cycle de développement d'une plante. Au cours de sa formation, des réserves s'accumulent en son sein (phase de remplissage) et seront utilisées par l'embryon lors de la germination.

C – 1 Développement de la graine

Trois tissus principaux composent la graine en développement : le tégument, l'albumen et l'embryon. Alors que le tégument (2n) est d'origine maternelle, la double fécondation intervenant au niveau du sac embryonnaire est à l'origine de l'embryon (2n) – issu de la fécondation de l'oosphère – et de l'albumen (3n) – issu de la fécondation de la cellule centrale. L'expression ainsi que l'activité de nombreuses protéines doivent être finement régulées afin de garantir le bon déroulement des différentes phases du développement de la graine. En effet, Yu et ses collaborateurs (2010) ont mis en évidence des modifications de l'expression de nombreux gènes au cours du développement de la graine de colza, parmi

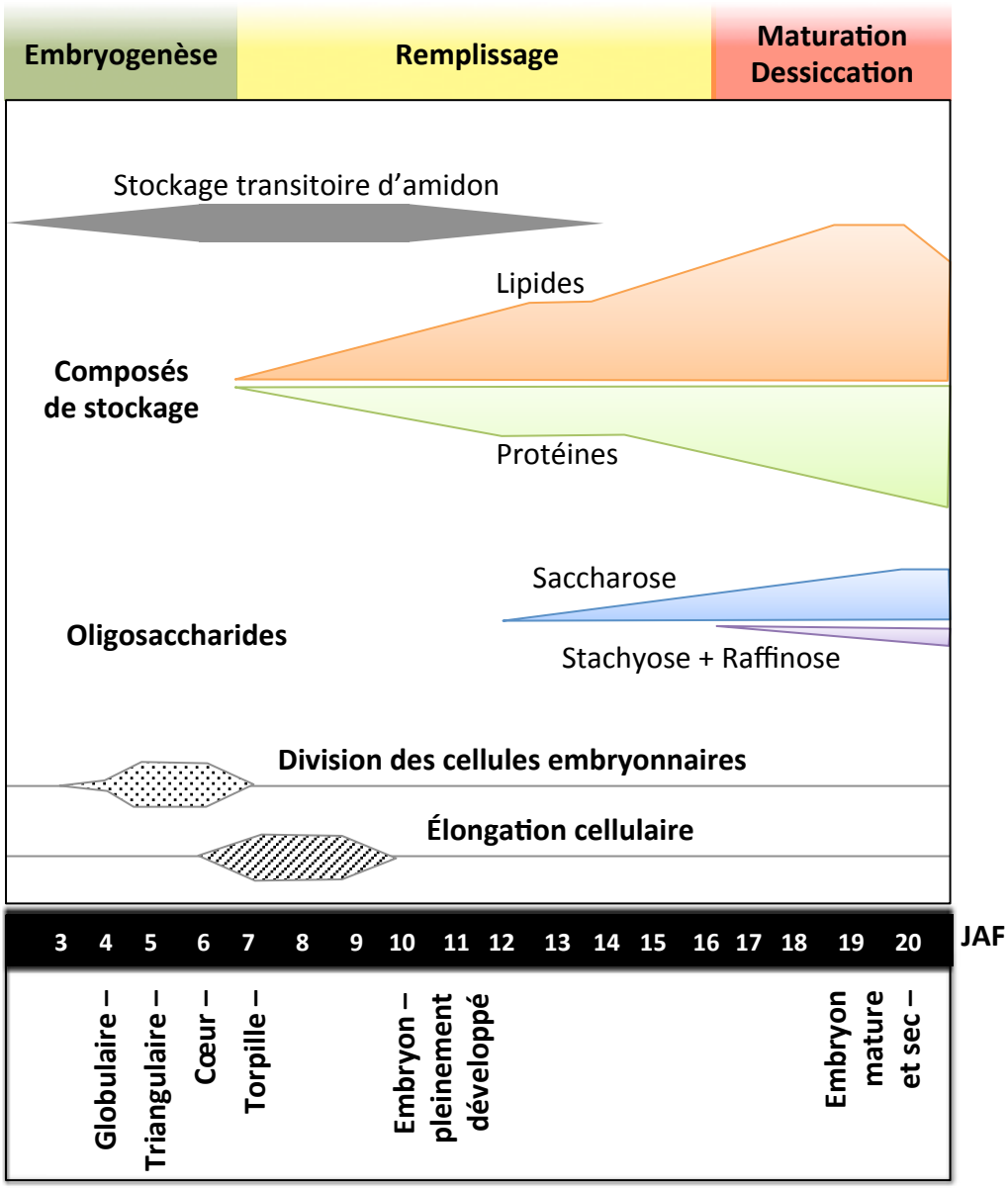


Figure II.15 Évènements physiologiques et métaboliques majeurs intervenant au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis thaliana*.

JAF, jours après floraison. Traduit de Baud *et al.* (2002).

lesquels des gènes codants des facteurs de transcription. De plus, plusieurs protéines de la graine possèdent des sites de phosphorylations et ont des profils d'expression dépendants de son stade de développement. Nombre de ces protéines interviennent au niveau du métabolisme central (pyruvate décarboxylase, OAS-TL…) et du métabolisme énergétique (sous-unité β de l'ATP synthase, phosphoglycérate kinase…), suggérant l'importance du processus de phosphorylation dans la régulation de la synthèse des composés de réserve (Agrawal & Thelen, 2006).

Amplement étudié chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, le développement de la graine peut être divisé en trois phases, l'embryogénèse, la phase de remplissage et la maturation / dessiccation (Figure II.15) :

- *L'embryogénèse* correspond aux premiers stades de développement de l'embryon, de la fécondation jusqu'à sa formation. Durant cette phase, les cellules diploïdes issues de la fécondation de l'oosphère se divisent activement et se différencient. Chez *Arabidopsis thaliana*, la masse sèche de la graine ainsi que sa teneur en lipides restent faible durant l'embryogenèse, cependant, une accumulation transitoire d'amidon est observée principalement au sein du tégument, mais aussi au niveau embryonnaire (Baud *et al.*, 2002). Au cours de cette phase, l'albumen se résorbe au profit de l'embryon (Ohto *et al.*, 2007). Cet albumen est constitué d'une monocouche de cellules dans la graine mature d'*Arabidopsis thaliana* mais n'est plus présent dans la graine mature de colza (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

- *Le remplissage* se caractérise par une accumulation de lipides et de protéines de réserve au niveau de l'embryon et par une élongation des cellules embryonnaires (Figure II.15). La masse sèche des graines augmente ainsi rapidement au cours de cette phase. L'amidon accumulé au niveau du tégument au cours de l'embryogénèse est hydrolysé, tandis que du sucrose, du stachyose et du raffinose s'accumulent (Baud *et al.*, 2002).

- *La maturation et la dessiccation :* En fin de développement, l'embryon rentre en quiescence métabolique, ce qui lui permet de tolérer la dessiccation. La synthèse de protéines et de lipides de stockage prend fin tandis que la graine se

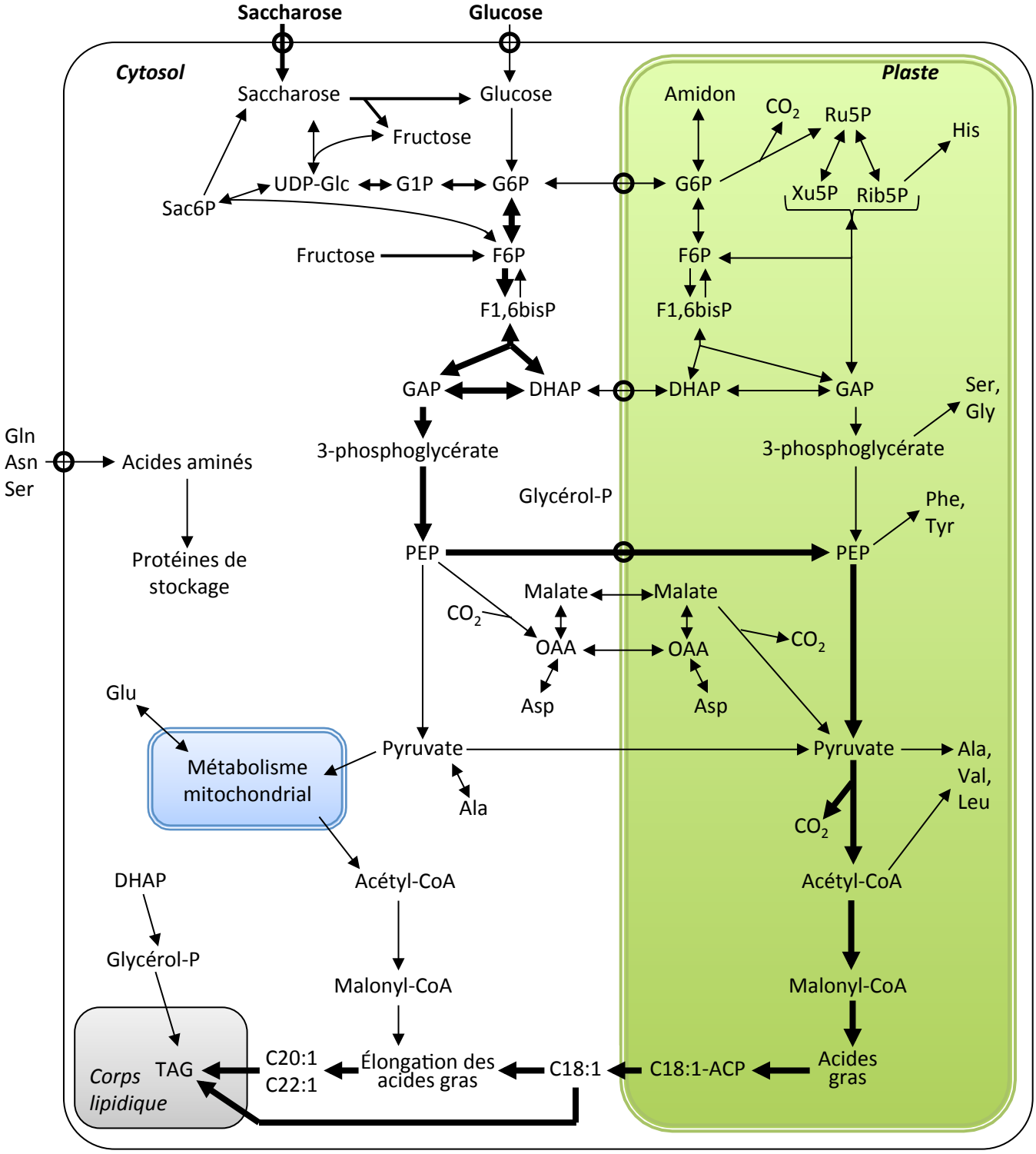
déshydrate fortement. Elle acquiert ainsi la capacité de survivre dans l'attente de conditions favorables à la germination (Baud *et al.*, 2002). Au terme de cette phase, une réduction de la teneur en lipides est observée de 28 % et 10 % respectivement chez *Arabidopsis thaliana* (Baud *et al.*, 2002) et *Brassica napus* (Eastmond & Rawsthorne, 2000). Eastmond et Graham (2001) observent que la β-oxydation, le cycle du glyoxylate ainsi que la néoglucogenèse sont actifs durant cette étape ultime du développement de la graine de colza.

C – 2 Réserves lipidiques et protéiques

Chez les dicotylédones, les réserves de la graine mature sont contenues dans l'embryon, occupant la majorité du volume de la graine, et sont principalement de nature lipidique chez les Brassicacées comme le colza (Purkrtova *et al.*, 2008). Offrant de multiples débouchés (§ A – 1), l'huile extraite des graines de colza est caractérisée par des teneurs élevées en ω3 et en ω6 et un faible ratio ω6/ω3, conférant à l'huile de colza une bonne qualité nutritionnelle pour l'alimentation humaine. Le résidu de trituration, riche en protéines ayant une teneur élevée en acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) fournit un tourteau de qualité pour l'alimentation animale. Les connaissances actuelles sur les processus de synthèse et d'accumulation de ces réserves lipidiques et protéiques sont résumées ci-après.

C – 2.a Les lipides de réserve

Les lipides représentent approximativement 40 % du poids de la graine mature de colza et constituent ainsi une source d'énergie et de carbone indispensable à sa germination et à la croissance de la plantule, jusqu'au retour à l'autotrophie et la mise en place des processus photosynthétiques (Murphy, 1996). Bien que phylogénétiquement très proches, la composition et la localisation des réserves lipidiques dans les graines de colza et d'*Arabidopsis thaliana* sont différentes. Chez le colza, 90 % des acides gras de la graine sont contenus dans les cotylédons de l'embryon, contre 60 % pour Arabidopsis. De plus, depuis la seconde moitié du 20ème siècle, les variétés de colza sont sélectionnées pour leur faible accumulation d'acide érucique (C22:1), lipide dont la présence à dose importante est toxique pour les animaux comme pour l'homme (Hung *et al.*, 1977). Les lipides sont pour la plupart présents dans la graine sous forme de triacylglycérides (TAGs), molécules constituées de trois acides gras, chacun estérifié sur un groupement hydroxyle libre d'une molécule de glycérol.

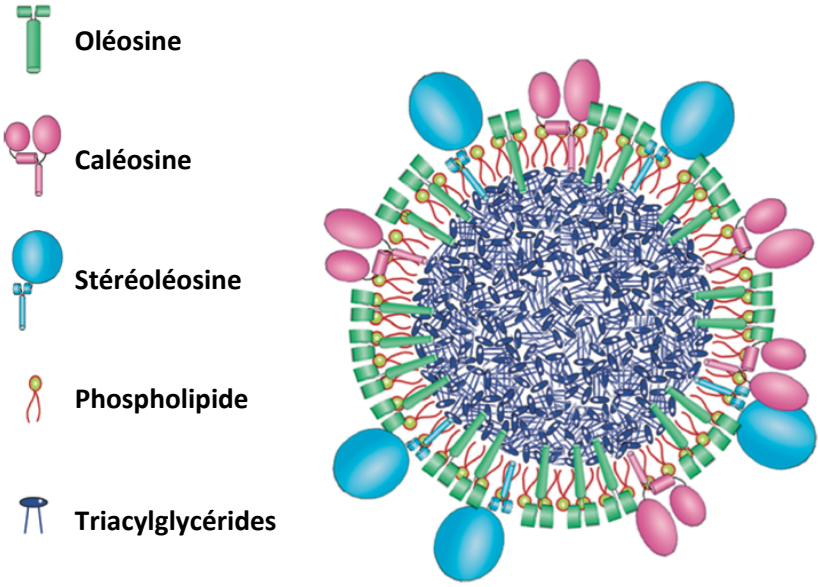


<u>Figure II.16</u> Organisation cellulaire du métabolisme carboné central au cours de l'accumulation de lipides dans l'embryon de colza en développement.

Les principaux flux de carbone, indiquées par des flèches épaisses, sont basées sur des données biochimiques et trancriptomiques obtenues pour des graines d'*Arabidopsis thaliana* en développement. Les acides aminés transportés jusqu'à la graine sont incorporés par l'embryon mais également synthétisés à partir d'intermédiaires du métabolisme carboné. Les ronds noirs indiquent la présence de transporteurs. Abréviations pour les composés carbonés : DHAP, dihydroxyacétone phosphate; F1,6bisP, fructose 1,6-bisphosphate ; F6P, fructose 6-phosphate ; Fru, fructose ; G1P, glucose 1-phosphate ; G6P, glucose 6-phosphate ; GAP, glycéraldéhyde 3-phosphate ; OAA, oxaloacétate ; PEP, phosphoénolpyruvate ; Rib5P, ribose 5-phosphate ; Ru5P, ribulose 5-phosphate ; Sac6P, saccharose 6-phosphate ; TAG, triacylglycéride ; UDP-Glc, UDP-glucose ; Xu5P, xylulose 5-phosphate. Abréviations pour les acides aminés : Ala, alanine ; Asp, aspartate ; Asn, asparagine ; Gln, glutamine ; Glu, glutamate ; Gly, glycine ; His, histidine ; Leu, leucine ; Phe, phénylalanine ; Ser, sérine ; Tyr, tyrosine ; Val, valine. Traduit de Schwender *et al.* (2003).

La synthèse des TAGs implique plusieurs compartiments subcellulaires (Figure II.16). Du saccharose produit au niveau des feuilles est importé dans l'embryon, puits pour le carbone. Chez les Brassicacées, l'embryon possède également au cours de son développement une activité photosynthétique propre, lui permettant de produire du saccharose (Eastmond *et al.*, 1996). Par l'intervention d'enzymes glycolytiques, le saccharose est converti en glycéraldéhyde-3-phosphate, précurseur du glycérol-3-phosphate, mais également en phosphoénolpyruvate (PEP ; Figure II.16). Au cours du développement de la graine, le PEP est principalement transporté dans les plastes où il sera déphosphorylé en pyruvate par la pyruvate kinase (Schwender *et al.*, 2003). Le saccharose peut également être converti en pyruvate au niveau plastidial par la voie des pentoses phosphates. Dans le cytosol, le PEP peut également conduire à la formation de pyruvate sous l'action de la pyruvate kinase, ou d'un système faisant intervenir la PEP carboxylase (PEPCase), la malate déshydrogénase (MDH), et l'enzyme malique (ME) plastidiale. Ce dernier système, permettant également d'importer le carbone au niveau plastidial (Figure II.16), pourrait être important dans les graines de *Brassica napus* en développement car elles possèdent une forte activité PEPCase en comparaison de la plupart des tissus non-photosynthétiques (Plaxton, 1996).

Le complexe pyruvate déshydrogénase présent au niveau plastidial catalyse ensuite la conversion du pyruvate en acétyl-CoA, molécule soufrée précurseur de la synthèse des acides gras (Figure II.16 ; Eastmond & Rawsthorne, 2000). L'acétyl-CoA produit au niveau plastidial est utilisé pour la formation d'acides gras (AGs) à chaines courtes (≤ 18 atomes de carbone), synthétisés sous forme d'acyl-CoA sous l'action de l'acide gras synthétase (FAS). Le pyruvate produit au niveau cytosolique pourra également être transporté dans la mitochondrie où il sera principalement converti en citrate. Dans les embryons de *Brassica napus* en développement, le métabolisme mitochondrial contribue faiblement à la production d'énergie, le flux de carbone étant pratiquement absent au niveau du cycle de Krebs (Schwender & Shachar-Hill, 2006). En effet, le métabolisme mitochondrial est dans ce cas principalement dévoué à l'élongation cytosolique des acides gras, le citrate formé par le cycle de Krebs étant exporté dans le cytosol et utilisé pour la production d'acétyl-CoA par l'ATP citrate lyase (Baud & Lepiniec, 2010). Ainsi, les AGs à chaines courtes synthétisés sous forme d'acyl-CoA au niveau plastidial, en partie désaturés par l'action d'acides gras désaturases (FAD) sont ensuite transportés dans le cytosol *via* le réticulum endoplasmique



<u>Figure II.17</u> Représentation schématique de la structure d'un corps lipidique ou oléasome.

Les triacylglycérides (lipides de réserves) synthétisés sont séquestrés au sein de ces corps lipidiques, entourés par une monocouche de phospholipides dans laquelle sont incluses des protéines, les oléosines, caléosines et stéréoléosines (Shimada & Hara-Nishimura, 2010).

lisse où ils pourront éventuellement subir une élongation avant d'être estérifiés sur le glycérol.

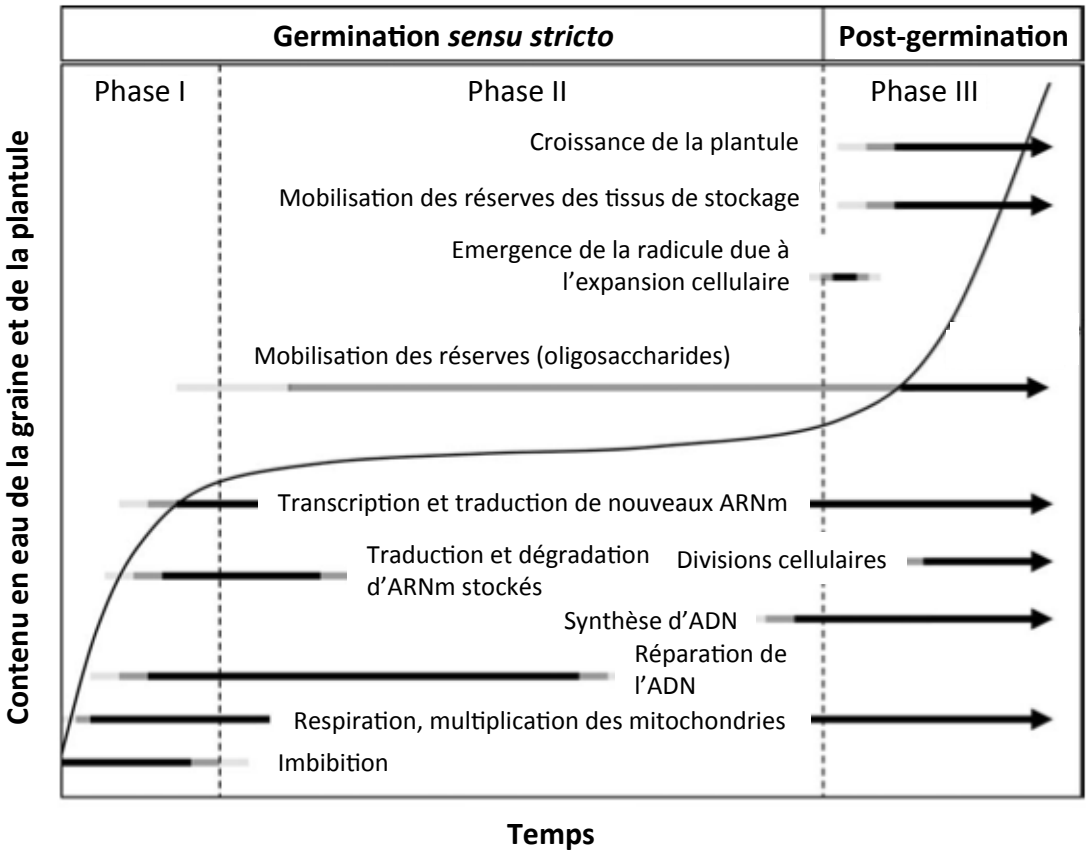
Les TAGs ainsi formés sont alors transférés et accumulés au sein de corps lipidiques appelés oléasomes (Figure II.17), entourés par une monocouche de phospholipides dans laquelle sont inclues des protéines (Shimada & Hara-Nishimura, 2010; Baud & Lepiniec, 2010). Les oléosines et caléosines, protéines majoritaires des oléasomes, interviennent dans la stabilité de ces corps lipidiques et empêchent leur agrégation. D'autres protéines, comme des aquaporines ou encore des stéréoléosines (ou stérol déshydrogénases), ont été identifiées au sein de la monocouche phospholipidique et auraient, tout comme les oléosines et caléosines, des rôles cruciaux dans la dégradation des réserves lipidiques survenant suite à la germination (Purkrtova *et al.*, 2008; Baud & Lepiniec, 2010).

C – 2.b Les protéines de réserves séminales

Chez *Brassica napus* comme chez *Arabidopsis thaliana*, 80 % des protéines de la graine sont des protéines de réserve (SSPs ou Seed Storage Proteins). Synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique granuleux, les précurseurs des SSPs sont transportés *via* l'appareil de Golgi jusqu'aux vacuoles, où ils seront partiellement clivés par des protéases vacuolaires puis stockés. Deux types de SSPs sont principalement accumulées au niveau des graines de colza : les cruciférines (globulines 12S représentant la moitié des protéines totales de la graine) et la napine (albumine 2S pouvant représenter jusqu'à 20 % des protéines totales de la graine ; Bewley & Black, 1994). Les globulines 12S, codées par quatre gènes chez *Arabidopsis thaliana*, sont produites sous la forme de précurseurs d'environ 50-60 kDa puis clivées durant la maturation de la graine au niveau d'un site hautement conservé en sous-unités acides et basiques (respectivement α et β), liées par un pont disulfure (Gallardo *et al.*, 2001; 2002a; Higashi *et al.*, 2006). Ces sous-unités subissent ensuite une protéolyse limitée en C-terminal en fin de maturation (Higashi *et al.*, 2006). Les protéines de réserve seront utilisées lors de la germination et la croissance de la plantule comme source de carbone, d'azote et de soufre (Bewley & Black, 1994).

C – 3 Germination et croissance de la plantule

La germination *sensu stricto* débute par l'absorption d'eau par la graine quiescente et se termine par l'élongation de l'axe embryonnaire, provoquant la percée du tégument par la radicule. Les évènements suivants, incluant la mobilisation des composés de réserve, sont



<u>Figure II.18</u> Évolution temporelle des évènements physiologiques et métaboliques majeurs survenant au cours de la germination (Phases I et II) et des premières étapes du développement de la plantule (Phase III).

Le temps nécessaire à la mise en place de ces processus varie en fonction des espèces et est influencé par les conditions de germination. Traduit de Nonogaki *et al.* (2010).

associés à la croissance de la plantule. Au cours de la germination et des évènements post-germinatifs, l'absorption d'eau par la graine suit une évolution spécifique, semblable à la consommation d'O_2 par la graine, et permettant de distinguer les différentes phases de ce processus complexe (Figure II.18 ; Bewley, 1997; Nonogaki *et al.*, 2010).

C – 3.a Germination sensu stricto

La germination *sensu stricto* d'une graine mature peut être décomposée en 2 phases (Figure II.18 ; Bewley, 1997; Nonogaki *et al.*, 2010) :

- Durant *la phase I*, correspondant à l'imbibition, la différence de potentiel hydrique entre la graine et le milieu extérieur entraine une absorption rapide d'eau par la graine. Les perturbations membranaires accompagnant cette absorption d'eau entrainent une fuite rapide de solutés et de composés de faible masse moléculaire. Cette phase permet la reprise de l'activité métabolique de l'embryon, notamment *via* une reprise de l'activité respiratoire, de la glycolyse, mais également de la voie des pentoses phosphates. Après quelques minutes d'imbibition, les ribosomes isolés présents dans la graine mature sont recrutés au sein de polysomes, permettant ainsi une synthèse intense de protéines à partir d'ARNm préformés.

- *La phase II* se caractérise par un arrêt temporaire de l'absorption d'eau. Durant cette phase, de profondes modifications métaboliques interviennent rendant la germination irréversible. De nombreuses protéines sont alors produites à partir d'ARNm néoformés. Chez les oléagineuses comme le colza, de nouvelles mitochondries sont produites. Cette seconde phase se solde par la percée du tégument par la radicule, la germination *sensu stricto* est alors terminée.

C – 3.b Evènements post-germinatifs

Une fois la radicule émergée, l'absorption d'eau par l'embryon reprend (Figure II.18, phase III). Les réserves stockées au cours du développement de la graine sont alors dégradées, permettant, de par la génération de leurs produits de dégradation, un abaissement du potentiel osmotique des cellules de la radicule, favorable à l'absorption d'eau et donc à la croissance.

Chez *Arabidopsis*, les TAGs hydrolysés au cours des évènements post-germinatifs fournissent le substrat nécessaire à la respiration mitochondriale, mais peuvent également

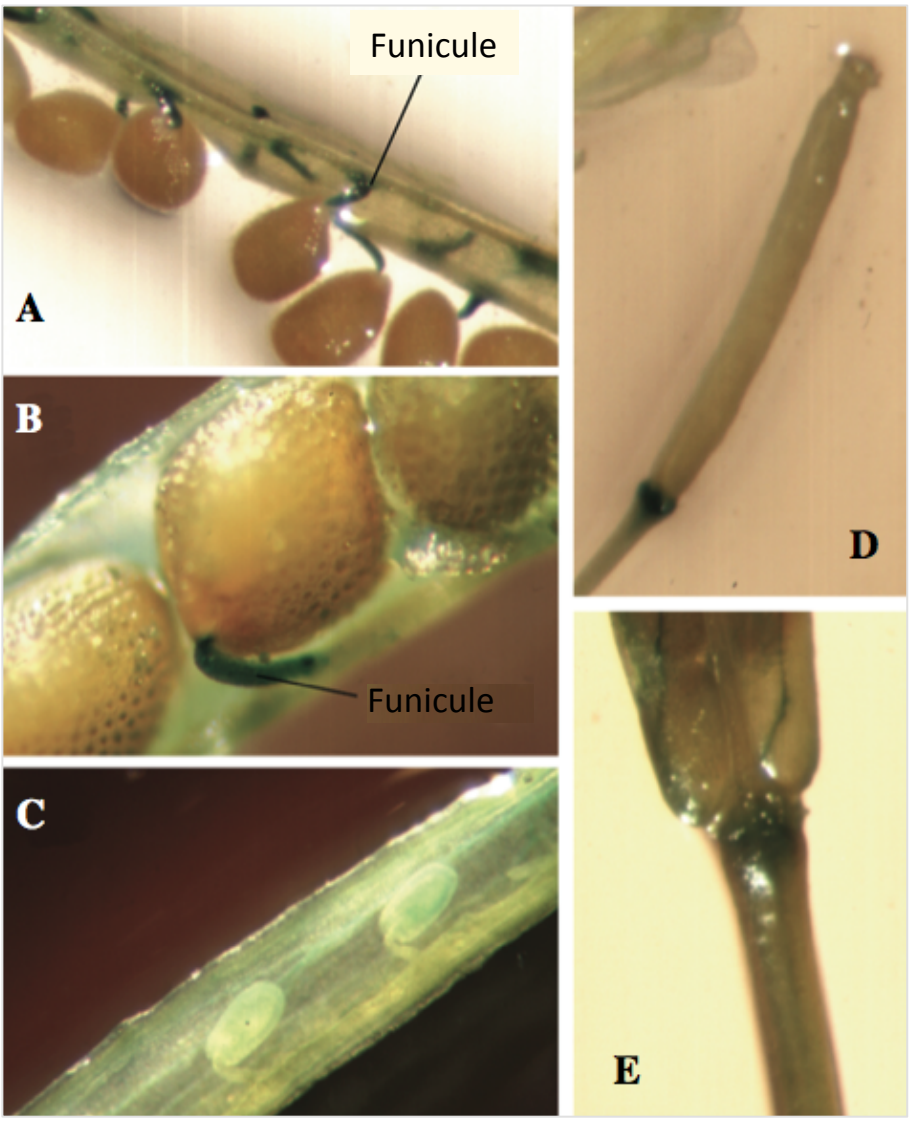


Figure II.19 Localisation histochimique de la protéine GUS dans des siliques de mutant d'*Arabidopsis thaliana* exprimant le gène *GUS* fusionné au promoteur du gène *SULTR2;1*.

Les siliques ont été récoltées sur les plantes transgéniques cultivées en hydroponie pendant 5 ou 6 semaines en condition d'alimentation soufrée pléthorique (1,5 mM SO_4^{2-}), et colorées avec du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronate pour permettre la détection de l'activité GUS. A, B : coloration du funicule dans les siliques âgées. C : observation de siliques immatures ouvertes. D : coloration de la base d'une silique immature. E : coloration des nervures dans le péricarpe de siliques âgées. (Awazuhara *et al.,* 2005).

servir à la synthèse de sucres, indispensables à l'alimentation de l'embryon (Penfield *et al.*, 2007). Cette dégradation des TAGs fait intervenir différents compartiments subcellulaires. En premier lieu, les TAGs sont hydrolysés par la lipase au niveau cytosolique, permettant la libération d'acides gras (AGs) libres. Les AGs libres à chaines courtes sont ensuite importés dans les peroxysomes où ils seront activés en acyl-CoA par l'action de l'acyl-CoA synthétase, tandis que les AGs à chaines longues sont activés dans le cytosol avant d'être importés dans le peroxysome *via* les transporteurs ABC (ATP binding cassette).

Au sein du peroxysome, les acyl-CoA sont oxydés en acétyl-CoA (β-oxydation). L'acétyl-CoA ainsi produit rentre dans le cycle du glyoxylate, permettant d'alimenter le cycle de Krebs en acides organiques. Ces acides organiques seront à l'origine, *via* le cycle de Krebs, de la formation d'ATP et de CO_2, mais permettront également d'alimenter la néoglucogenèse, produisant du saccharose et des hexoses pouvant intervenir dans l'alimentation de l'embryon (Kornberg & Beevers, 1957; Eastmond *et al.*, 2000). Ainsi, les cellules de l'embryon se divisent activement. Cette troisième phase, dite de « post germination », est terminée une fois la plantule devenue autotrophe *i.e.* lorsqu'elle devient capable de réaliser la photosynthèse et l'absorption d'éléments minéraux nécessaires à sa croissance. Pritchard et ses collaborateurs (2002) ont démontré que la germination *sensu stricto* et la mobilisation des réserves constituent des évènements régulés indépendamment chez *Arabidopsis thaliana*, le premier étant inhibé par l'acide abscissique (ABA), contrairement au second.

D La graine et le métabolisme soufré

D – 1 Transport du S dans la graine en développement

Chez les Brassicacées, le S est principalement transporté sous forme de sulfate (Hawkesford & De Kok, 2006; Davidian & Kopriva, 2010), mais également dans une moindre mesure sous forme de méthionine (Balint & Rengel, 2011a), de GSH (Foyer *et al.*, 2001) et de SMM (Bourgis *et al.*, 1999).

- Chez *Arabidopsis thaliana*, le gène *SULTR2;1* est précisément exprimé à la base des siliques ainsi qu'au niveau des funicules, organe connectant le péricarpe aux graines (Figure II.19). La suppression de l'expression de ce gène par ARN antisens provoque une baisse de la teneur en sulfate, cystéine et glutathion des graines, mettant en évidence le rôle de ce transporteur dans l'apport de sulfate aux graines en

développement (Awazuhara *et al.*, 2005), et suggérant également la présence de la voie d'assimilation réductrice du sulfate au niveau des graines d'*Arabidopsis thaliana.*

- Les transporteurs du groupe 3 sont tous exprimés dans la graine au cours de sa formation, mais de manière spécifique en fonction du stade de développement considéré. Les gènes *SULTR3;1* et *SULTR3;2 d'Arabidopsis thaliana* sont exprimés de manière relativement constante au cours du développement. Le gène *SULTR3;4* s'exprime spécifiquement durant l'embryogénèse et le début du remplissage, et les gènes *SULTR3;3* et *SULTR3;5* s'expriment exclusivement en fin de développement de la graine. Il est particulièrement intéressant de noter que les gènes *SULTR3;4* et *SULTR3;5* sont exprimés plus fortement dans la graine que dans les autres tissus de la plante (Zuber *et al.*, 2010a). L'analyse de mutants ADN-T pour ces transporteurs de sulfate du groupe 3 suggère un rôle spécifique de ces transporteurs dans la translocation du sulfate entre les différents compartiments de la graine chez *Arabidopsis thaliana*. En effet, tandis que le rendement grainier et le contenu en S total des graines matures ne diffèrent pas entre les mutants et les plantes témoins, les graines des mutants *sultr3;2*, *sultr3;3*, *sultr3;4* et *sultr3;5*, possèdent un contenu en sulfate significativement supérieur aux graines de plantes sauvages, associé spécifiquement à une accumulation de sulfate dans les enveloppes entourant l'embryon (Zuber *et al.*, 2010a). L'analyse protéomique de ces graines révèle une réduction la protéolyse limitée des globulines 12S, survenant en fin de maturation. En plus de ces SSPs, l'expression de nombreuses protéines est modulée dans les graines de plantes mutantes, notamment celle des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique (induction de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, GAPDH), le métabolisme des protéines (induction d'une protéine disulfide isomérase), des lipides ou encore dans les processus de défense (Zuber *et al.*, 2010a).

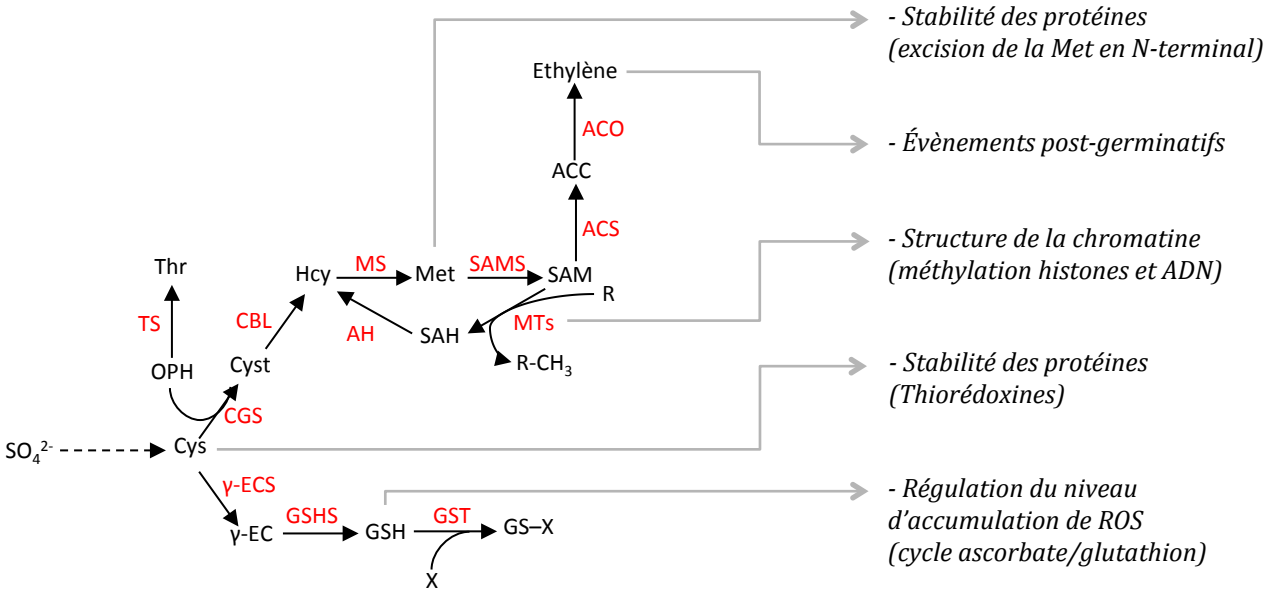
- Alors que *SULTR4;2* est exprimé de manière constante durant la formation de la graine d'*Arabidopsis thaliana*, le gène *SULTR4;1* est préférentiellement exprimé dans la graine pendant la transition entre l'embryogenèse et le remplissage. L'inactivation de ce gène entraine une accumulation de sulfate dans la graine mature, la teneur en S total restant inchangée. Malgré l'absence de preuves de la localisation

tonoplastique des transporteurs du groupe 4 au niveau de la graine, ceci suggère une réduction de l'assimilation du sulfate stocké au niveau vacuolaire dans la graine des mutants *sultr4;1* et démontre l'importance de la mobilisation de ce pool de sulfate au cours de son développement. L'accumulation de quelques SSPs est affectée dans les graines matures des mutants *sultr4 ;1* : 2 isoformes de globulines 12S (At12S1 et At12S4), pauvres en acides aminés S (2,4 et 2,8 % respectivement) s'accumulent, alors qu'une autre isoforme (At12S3), plus riche en acides aminés soufrés (4,3 %) devient moins abondante. Des accumulations de protéines impliquées au niveau métabolique (enoyl-ACP-réductase, méthionine synthase, GS, β-glucosidase…), énergétique (GAPDH et grande sous unité de la rubisco…) sont également observées. L'induction de la superoxyde dismutase (SOD) et de la glutathion S-transférase, impliquées dans les processus de détoxification, semble refléter une augmentation de la production de ROS au cours du développement des graines de mutant *sultr4;1* (Zuber *et al.*, 2010b). L'inactivation de ce gène pourrait également avoir un impact sur la germination des graines d'*Arabidopsis thaliana*, le sulfate potentiellement stocké au niveau vacuolaire étant partiellement inaccessible aux enzymes impliquées dans l'assimilation du S.

D – 2 Métabolisme du S dans la graine en développement

Chez *Brassica napus* et *Arabidopsis thaliana*, les feuilles sont considérées comme les sites majeurs de l'assimilation du S (Leustek & Saito, 1999). Cependant, chez de nombreuses espèces, divers travaux ont montré que le sulfate était également réduit et assimilé au niveau des graines (soja : Sexton & Shibles, 1999; lupin : Tabe & Droux, 2001; blé : Fitzgerald *et al.*, 2001), ce qui n'a pas encore été prouvé chez les Brassicacées. Les gènes codant les protéines impliquées dans le métabolisme du S sont néanmoins bien exprimés dans la graine de *Brassica napus* en développement (Yu *et al.*, 2010). L'assimilation du S pourrait donc y être effective, les graines en développement possédant d'importants besoins en acides aminés soufrés nécessaires à la constitution des réserves protéiques qui seront utilisées lors de la germination.

La synthèse de GSH est quant à elle bien effective dans l'embryon d'*Arabidopsis thaliana*, et est indispensable à la maturation de la graine (Cairns *et al.*, 2006). Un défaut de synthèse de GSH (mutant *gsh1*) spécifiquement ciblé au niveau de la graine n'affecte pas le



<u>Figure II.20</u> Implications du métabolisme soufré dans la germination et les évènements post-germinatifs.

Les ions et les métabolites sont indiqués en noir, et les enzymes sont indiquées en rouge. Abréviations utilisées pour les métabolites : ACC, acide aminocyclopropane-1-carboxylique ; Cys, cystéine ; Cyst, cystathionine ; γ-EC, γ-glutamylcystéine ; GSH, glutathion réduit ; GS-X, glutathion conjugué ; Hcy, homocystéine ; Met, méthionine ; OPH, *O*-phosphohomosérine ; R, accepteur de méthyl ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; SAH, *S*-adénosylhomocystéine ; SAM, *S*-adénosylméthionine ; Thr, thréonine. Abréviations utilisées pour les enzymes et transporteurs : ACO, ACC oxydase ; ACS, ACC synthase ; AH, adénosylhomocystéinase ; CBL, cystathionine β-lyase ; CGS, cystathionine γ-synthase ; CLT, transporteur de thiol ; γ-ECS, γ-EC synthétase ; GGT, γ-glutamyltransférase ; GSHS, glutathion synthétase ; GST, glutathion S-transférase ; MS, méthionine synthase ; MTs, méthyl transférases ; SAMS, SAM synthétase ; TS, thréonine synthase. Modifié d'après Rajjou *et al.* (2012).

développement de l'embryon. Ces résultats suggèrent que l'apport de GSH par la plante mère est suffisant pour assurer son bon développement, mais a un impact négatif sur les phases de remplissage et de maturation (Cairns *et al.*, 2006). La réduction de la teneur en glutathion au niveau de la graine pourrait ainsi être néfaste pour le développement de la graine de colza en cas de limitation en S. Cette étude menée par Cairns et ses collaborateurs (2006) suggère également que le GSH est activement catabolisé au niveau de la graine, comme observé chez le blé (Fitzgerald *et al.*, 2001), et constituerait ainsi une source de cystéine pour la synthèse de SSPs.

D – 3 Régulation de la germination et implication du S dans les processus germinatifs et post-germinatifs

La germination *sensu stricto* et l'établissement de la jeune plantule sont des processus complexes soumis à des niveaux de régulation multiples et variables en fonction de l'espèce considérée (Pour review, Bewley & Black, 1994; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Nonogaki *et al.*, 2010; Rajjou *et al.*, 2012). Ainsi, certains niveaux de régulation de la germination de la graine d'*Arabidopsis thaliana* comme ceux permettant l'affaiblissement de l'albumen, ne peuvent être pris en compte dans le cas de la graine de colza, dépourvue d'albumen (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Une fois récoltée, la graine mature de colza ne présente pas de dormance primaire, mais peut entrer en dormance secondaire si les conditions environnementales ne sont pas favorables à la germination (López-Granados & Lutman, 1998). Ces conditions influencent la synthèse et la dégradation de l'acide abscissique (ABA) et des gibbérelines (GAs), ainsi que la sensibilité à ces hormones. Tandis qu'une modification de la balance hormonale ABA/GAs en faveur de l'ABA favorise l'entrée en dormance, une modification de cette balance en faveur des GAs favorise la germination (Pour review, Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

Le métabolisme soufré est impliqué à différents niveaux dans le contrôle des processus germinatifs et post-germinatifs de nombreuses espèces (Figure II.20 ; pour review, Rajjou *et al.*, 2012).

- Dès les premières heures suivant l'imbibition, la reprise d'activité métabolique de l'embryon se traduit par une respiration mitochondriale intense, entrainant une accumulation importante de ROS, notamment de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$). L'accumulation de ROS lors de ce « burst oxydatif » est

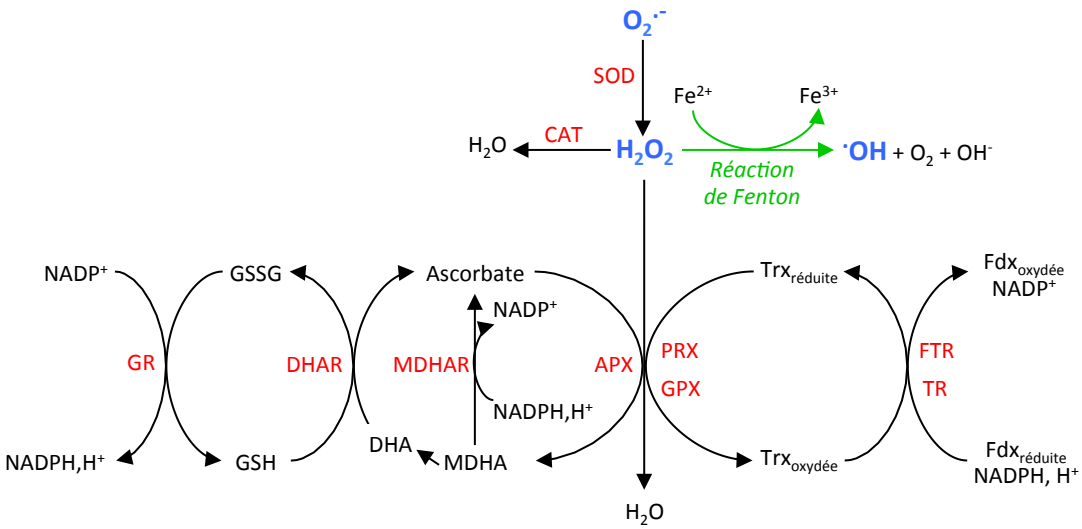


Figure II.21 Principaux systèmes de détoxification des ROS chez les végétaux.

Les principaux ROS ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2, $^{\cdot}OH$) sont indiqués en bleu, les autres métabolites sont indiqués en noir, et les enzymes sont indiquées en rouge. La réaction de Fenton, indiquée par des flèches vertes, est spontanée et consiste en l'oxydation du fer ferreux (Fe^{2+}) par l'H_2O_2, aboutissant à la formation du radical hydroxyle $^{\cdot}OH$. L'H_2O_2 peut être détoxifié en H_2O par la catalase, le cycle ascorbate-glutathion, ou par une voie dépendante de la thiorédoxine. La glutathion peroxydase (GPX) peut utiliser la thiorédoxine réduite ou le glutathion réduit comme agent réducteur. Abréviations utilisées pour les métabolites : DHA, déshydroascorbate ; GSH, glutathion réduit ; GSSG, glutathion oxydé; MDHA, monodéshydroascorbate. Abréviations utilisées pour les enzymes : APX, ascorbate peroxydase ; CAT, catalase ; DHAR, DHA réductase ; FTR, ferrédoxine thiorédoxine réductase ; GPX, glutathion peroxydase ; GR, glutathion réductase ; MDHAR, MDHA réductase ; PRX, peroxyrédoxine ; SOD, superoxyde dismutase ; TR, thiorédoxine réductase. D'après Bailly (2004) et Foyer & Shigeoka (2011).

nécessaire à la germination mais doit être finement contrôlée pour éviter une oxydation incontrôlée de sucres, de lipides et de protéines. Le contrôle de l'accumulation de ROS est majoritairement permis par un système faisant intervenir la SOD, catalysant la condensation de deux anions $O_2^{\cdot -}$ et de deux protons en O_2 et H_2O_2. L'H_2O_2 produit est ensuite dismuté en O_2 et H_2O sous l'action de la catalase. Le cycle ascorbate-glutathion peut également intervenir dans la détoxification de l'H_2O_2 si son accumulation est importante (Bailly, 2004; figure II.21).

- La formation et la réduction des ponts disulfures formés entre 2 cystéines par l'intervention des thiorédoxines au cours de la germination sont des processus fondamentaux qui modifient la structure et l'activité de nombreuses protéines (Pour review, Buchanan & Balmer, 2005). Chez l'orge, la réduction des hydrolases (α-amylases, protéases) par les thiorédoxines est nécessaire à l'activation de ces enzymes et donc à la dégradation des réserves de la graine. De plus, les thiorédoxines vont réduire les protéines de stockage ce qui favorise leur solubilisation et leur dégradation (Buchanan & Balmer, 2005).

- En tant que donneur de groupement méthyl mais également en tant que précurseur de la biotine et de l'éthylène, la SAM, formée à partir de méthionine par la SAM synthétase, intervient de diverses manières dans les processus de germination et d'établissement de la jeune plantule.
    - Au cours de la germination, la méthylation de l'ADN et des histones modifie la structure de la chromatine et régule ainsi l'expression de nombreux gènes (Nakabayashi *et al.*, 2005).
    - La biotine (molécule soufrée également nommée vitamine B8) est le cofacteur de nombreuses décarboxylases, parmi lesquelles l'acétyl-CoA carboxylase, enzyme clé de la synthèse lipidique ou encore la pyruvate carboxylase, notamment impliquée dans la néoglucogenèse (Alban *et al.*, 2000).
    - S'opposant à l'action de l'ABA, l'éthylène possède un rôle régulateur sur la germination des graines d'*Arabidopsis thaliana* en favorisant l'affaiblissement et la rupture de l'albumen entourant l'embryon mais aussi sur les évènements post-germinatifs, en interagissant avec les voies de signalisation de l'ABA, des

Tableau II.2 Impacts de restrictions de l'apport de sulfate appliquées aux stades GS70 (chute des premiers pétales ; LS70), GS53 (inflorescence principale dégagée ; LS53), et GS32 (début de montaison ; LS32) sur le rendement, la viabilité, la teneur en huile, en protéines, en S et en glucosinolates des graines produites.

Traitement	Rendement	Viabilité	Teneur en huile	Teneur en protéines	Teneur en S	Teneur en glucosinolates
LS70	→	→	→	→	↘	↘
LS53	→	→	↘	→	↘	↘
LS32	↘	↘	↘	↘	↘	↘

(Dubousset *et al.,* 2010).

ROS et des cytokinines (Subbiah & Reddy, 2010). L'éthylène favorise le bon déroulement des évènements post-germinatifs (*i.e.* l'établissement de la jeune plantule), mais inhibe la croissance des parties aériennes et racinaires des plantules d'*Arabidopsis thaliana* (Guzmán & Ecker, 1990; Gallardo *et al.*, 2002b; Achard *et al.*, 2003).

D – 4 Conséquences d'une oligotrophisation en S sur le rendement grainier, la qualité, la viabilité et le métabolisme soufré de la graine

Une déficience en S peut avoir un impact négatif sur le rendement et la qualité des graines du colza. Ces effets sont dépendants du stade de développement auquel survient la limitation en S et de l'importance des réserves soufrées préalablement accumulées au sein de la plante, notamment sous forme de sulfate vacuolaire (Tableau II.2 ; Dubousset *et al.*, 2010). Ainsi, une restriction de l'apport de S appliquée à partir du stade GS70 (chute des premiers pétales) n'a que peu d'impacts sur le rendement et la qualité des graines matures, leurs teneurs en huile et en protéines étant comparables à celles de graines issues de plantes non limitées en S. En revanche, une restriction de l'apport de S au stade GS53 (inflorescence principale dégagée) entraine une réduction de la teneur en lipides des graines (Tableau II.2). Lorsque la restriction de l'apport de S est appliquée au stade GS32 (début de montaison) une baisse du rendement (jusqu'à -45 %) et de la qualité des graines (teneurs en S, en N, en lipides et en protéines) est observée (Tableau II.2). Appliquée à ce stade précoce, une restriction de l'apport de S provoque une réduction de la remobilisation de l'N foliaire au profit des graines, nécessaire à la synthèse et l'accumulation de SSPs ainsi qu'une réduction de la viabilité des graines produites (Tableau II.2 ; Dubousset *et al.*, 2010). Quel que soit le stade de développement auquel elle est appliquée, une restriction de l'apport de sulfate entraine une réduction des teneurs en glucosinolates des graines (Tableau II.2), ce qui pourrait augmenter le caractère appétant du tourteau de colza. Chez *Brassica rapa*, plante parente du colza, une limitation de l'apport de S entraine une réduction de la teneur en lipides des graines, associée à une réduction de la teneur en acides gras dérivés des C16 et C18, en particulier de l'acide oléique (C18:1) constituant majoritaire des lipides des graines de Brassicacées. *A contrario*, la teneur en acide érucique (C22:1) des graines augmente en réponse à une limitation de l'apport de S chez cette espèce (Ahmad & Abdin, 2000a).

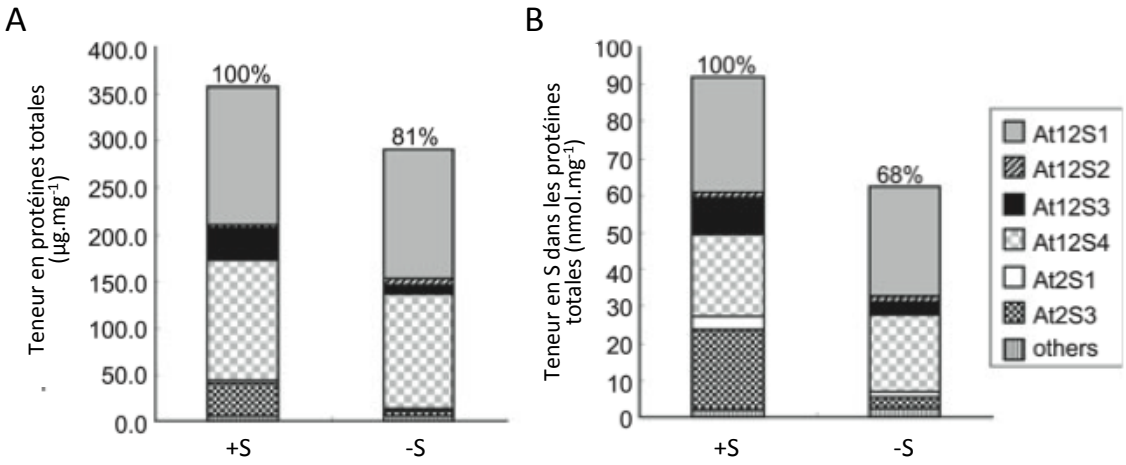


Figure II.22 Teneurs en protéines totales (a) et en S dans les protéines totales (b) de graines matures d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à une limitation de l'apport de S.

Ces résultats sont calculés à partir des données issues de l'analyse protéomique réalisée par électrophorèse bidimensionnelle de protéines totales de graines matures. La contribution de chaque protéine de stockage à la teneur en protéines totales a été calculée à partir de l'intensité relative des spots protéiques correspondants. La teneur en S dans les protéines totales a été estimée à partir des poids moléculaires calculés et du nombre de cystéine et méthionine déterminé à partir des séquences complètes ou des séquences des sous-unités de protéines de stockage (Higashi *et al.,* 2006).

L'impact d'une limitation en sulfate sur la qualité des protéines de réserve de la graine mature d'*Arabidopsis thaliana* a été mis en évidence par Higashi et ses collaborateurs (2006). Ces auteurs ont observé une réduction de l'accumulation des albumines 2S et d'une isoforme de globuline 12S (At12S3) particulièrement riche en acides aminés soufrés (4,3 %) en cas de réduction du niveau d'alimentation soufrée (Figure II.22). Ainsi, la proportion de protéines riches en S des graines diminue, permettant de garantir la présence de réserves azotées et carbonées nécessaires à la germination. Malgré cette compensation, la limitation en S peut entrainer une baisse importante de la teneur en protéines des graines (-19 % ; Higashi *et al.*, 2006). De plus, la protéolyse limitée des sous unités α des globulines 12S intervenant en fin de maturation des graines est réprimée par la limitation en S, ce qui pourrait limiter leur utilisation au cours de la germination et du développement de la plantule. Chez le colza, Zhao et ses collaborateurs (1997) ont observé une augmentation du ratio N/S des protéines de graines de colza en réponse à une limitation de l'apport de S, synonyme de réduction de la qualité protéique.

Dans la graine d'*Arabidopsis thaliana* en développement, la limitation en S induit l'expression de certains gènes impliqués dans le transport et l'assimilation du sulfate, comme le gène *SULTR1;2* ou encore deux gènes codant l'APR : *APR1* et *APR3* (Higashi *et al.*, 2006). L'expression d'autres gènes impliqués dans le métabolisme soufré de la graine, comme *SULTR2;1*, exprimé à la base des siliques ainsi qu'au niveau du funicule, n'est pas modulée par la limitation en S (Awazuhara *et al.*, 2005).

L'ensemble de ces résultats suggère que le transport de composés soufrés jusqu'à la graine, ainsi que leurs niveaux d'accumulation dans la graine, sont des facteurs clés du rendement et de la qualité grainière.

E Plan de recherche : Objectifs, hypothèses de travail et démarches associées

L'oligotrophisation des sols en S résultant notamment de la baisse importante des rejets atmosphériques soufrés peut entrainer une altération des rendements et de la qualité des graines de colza. Dans ce contexte, il est important d'identifier les acteurs physiologiques et moléculaires impliqués dans la réponse du colza à la limitation en S, préalable à l'amélioration de la gestion de la fertilisation soufrée et/ou à la sélection de variétés adaptées à une faible disponibilité en S. L'objectif général de cette thèse consistait donc à étudier l'incidence d'une fertilisation variable en S sur i) la physiologie de jeunes feuilles, ii) la gestion du S par la plante et son incidence sur le métabolisme soufré de la graine de colza en développement, iii) la qualité grainière et iv) la vigueur germinative des graines produites. Les résultats obtenus sont décrits sur 4 chapitres, ayant chacun des objectifs distincts :

E – 1 Identifier des processus métaboliques impliqués dans la réponse du colza à la limitation en S (Chapitre IV)

Contexte : Les feuilles représentent des organes clés de la croissance du colza et constituent les tissus majeurs d'assimilation du sulfate. Cependant, la majorité des études réalisées se focalise sur la remobilisation du sulfate à partir des feuilles âgées, et peu d'informations sont disponibles concernant les impacts de la limitation en S sur le métabolisme de jeunes feuilles. De plus, les études portant sur les impacts de la limitation en S chez les Brassicacées s'appuient principalement sur des approches métabolomiques et transcriptomiques, et ne traitent que très peu des modifications protéomiques associées à cette limitation. L'approche protéomique a cependant l'avantage d'intégrer la régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes et leurs éventuelles régulations post-transcriptionnelles.

Hypothèse : Une restriction de l'apport de S pourrait affecter le métabolisme et la physiologie des jeunes feuilles.

Objectifs : Les objectifs consistaient à i) Identifier les modifications physiologiques survenant en réponse à une limitation en S au stade rosette chez le colza d'hiver et ii) déterminer si des modulations de l'expression de protéines au niveau de ces jeunes feuilles pourraient être à l'origine des modifications physiologiques et métaboliques survenant en réponse à une restriction de l'apport de S.

Démarche expérimentale : Des colzas d'hiver (cv. Capitol) ont subit une restriction de l'apport de sulfate au stade rosette. Une étude en cinétique des paramètres physiologiques (activité photosynthétique, teneurs en chlorophylles et en anthocyanes…) a été réalisée au cours de la période de restriction en sulfate. L'analyse protéomique d'une jeune feuille a été effectuée par éléctrophorèse bidimensionnelle (2-DE) à une date correspondant à l'apparition des premiers impacts physiologiques.

Article publié dans *BMC Plant Biology* : Sulphur limitation provokes physiological and leaf proteome changes in oilseed rape that lead to perturbation of sulphur, carbon and oxidative metabolisms (D'Hooghe *et al.*, 2013b).

E – 2 Déterminer l'impact d'une restriction en S appliquée aux stades GS32, GS53 et GS70 sur la qualité de la graine de colza (Chapitre V)

Contexte : Une restriction en sulfate peut avoir une incidence négative sur l'accumulation d'huile et de protéines au sein de la graine de colza en fonction du stade de développement auquel elle survient (Dubousset *et al.*, 2010).

Hypothèses : La qualité lipidique et protéique des graines matures de colza est réduite en cas de restriction de l'apport de sulfate. Cette réduction de la qualité grainière est fonction du stade de développement auquel survient la restriction de l'apport de S.

Objectif : L'objectif était de caractériser l'incidence de restrictions en sulfate appliquées à différents stades du développement (GS32, GS53 et GS70) sur la qualité lipidique et protéique de la graine.

Démarche expérimentale : L'analyse du contenu lipidique et protéique des graines matures obtenues au cours de la thèse de Lucie Dubousset (Dubousset, 2009) ont été respectivement déterminés par Near InfraRed Spectroscopy (NIRS) et par 2-DE. Les principaux composés soufrés (sulfate, cystéine, glutathion, soufre protéique) ont été déterminés par des analyses biochimiques.

Article soumis à *Molecular & Cellular Proteomics* : Evidence for proteomic and metabolic adaptations associated to alterations of seed yield and quality in sulphur-limited *Brassica napus* L. (manuscrit n° MCP/2013/034215).

E – 3 Mettre en évidence la capacité d'assimilation du sulfate au niveau de la graine et du péricarpe et étudier l'impact de la limitation en S sur le développement de la graine et son métabolisme soufré (Chapitre VI)

Contexte : D'après les mesures réalisées sur la graine mature, la limitation en S entraine une adaptation du contenu protéique et du statut soufré de la graine : la proportion de S sous forme de sulfate diminue au profit du S protéique, et l'accumulation de protéines de stockage (SSPs) pauvres en S augmente au dépend de SSPs riches en S. Le rôle du péricarpe dans les processus de remplissage de la graine de colza « 00 » en composés soufrés demeure peu connu.

Hypothèses : La graine et le péricarpe sont capables d'assimiler le soufre à partir du sulfate pour synthétiser des acides aminés soufrés qui seront incorporés dans les protéines de la graine. La capacité d'assimilation du sulfate par la graine et le péricarpe pourrait être modulée par la disponibilité en S. Afin de garantir la présence de composés soufrés réduits, les processus d'assimilation du sulfate apporté aux siliques pourraient en effet être induits au sein du péricarpe et de la graine de colza, comme observé au niveau foliaire chez *Arabidopsis thaliana*. Malgré de telles adaptations métaboliques, la restriction en sulfate pourrait entrainer une réduction de l'accumulation de S sous forme protéique au niveau de la graine.

Objectifs : Un premier objectif consistait à mettre en évidence la capacité d'assimilation du sulfate au sein de péricarpes et de graines issus de plantes bien alimentées en sulfate et ayant subi une restriction en sulfate, prélevés au cours du remplissage des graines (Chapitre VIA). Un second objectif consistait à étudier, sur deux génotypes de colza d'hiver – Aviso et Capitol – et en relation avec les flux de S à l'échelle de la plante entière, l'effet de restrictions en sulfate sur le développement de la graine, sa composition (teneur en S, sulfate, protéines, soufre protéique, composés soufrés réduits), et l'activité de deux enzymes clés du métabolisme soufré, l'ATPS et l'APR (Chapitre VIB).

Démarche expérimentale : Dans un premier temps, du sulfate marqué au ^{34}S a été apporté pendant 24 heures à des graines et des péricarpes isolés prélevés au cours du développement de la graine (5 semaines après la floraison) sur des plantes du génotype Capitol bien alimentées et limitées en S à partir du stade GS53. Le marquage du sulfate et des protéines a ensuite été mesuré (Chapitre VIA). Dans un second temps, une étude comparative des flux de S en relation avec l'évolution des principaux composés soufrés et

des activités des enzymes ATPS et APR de la graine a été réalisée sur 2 génotypes de colza d'hiver, Aviso et Capitol, soumis à des restrictions de l'apport de sulfate aux stades GS53 (inflorescence principale dégagée) et GS70 (chute des premiers pétales ; chapitre VIB).

Article accepté pour publication dans *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (Chapitre VIA) : A specific method of ^{34}S labelling provides evidence that sulphate assimilation occurs in developing seeds and pod walls of *Brassica napus* L. (D'Hooghe *et al.*, 2013a, in press).

Article dont la soumission est prévue à *Plant physiology* (Chapitre VIB) : Sulphur management by *Brassica napus* seeds in connection with Sulphur flows at the whole plant level. A comparative study of two genotypes exhibiting different number of seeds produced per plant.

E – 4 Étudier l'impact de la limitation en S sur la capacité germinative et la viabilité des graines produites (Chapitre VII)

Contexte : Le métabolisme soufré est impliqué à différents niveaux dans le contrôle de la germination *sensu stricto* et des évènements post-germinatifs. Une restriction précoce de l'apport de S appliquée au génotype Capitol (*i.e.* au stade GS32, début de montaison) entraine une réduction de la viabilité des graines produites. La limitation en S est bien connue pour moduler la gestion du S chez les Brassicacées, augmentant les capacités d'absorption, d'assimilation et de remobilisation du sulfate. Toutefois, à notre connaissance, aucune étude ne traite des effets sur la germination *sensu stricto*, l'établissement des jeunes plantules et la gestion du S par les graines produites en condition de limitation en S.

Hypothèse : La réduction de la viabilité observée en réponse à une restriction précoce de l'apport de S (au stade GS32) est associée à des impacts sur la germination *sensu stricto*. La capacité d'absorption du sulfate est plus importante dans des plantules développées à partir de graines récoltées sur des plantes limitées en S.

Objectifs : Un premier objectif consistait à étudier la cinétique de germination et l'évolution des principaux composés soufrés lors de la germination de graines obtenues en conditions de limitation/restriction de l'apport de S. Un second objectif consistait à étudier la capacité d'absorption du sulfate dans des plantules développées à partir de graines récoltées sur des plantes limitées en S.

Démarche expérimentale : Les expérimentations ont été menées sur des graines de deux génotypes de colza (cv. Capitol et Yudal) récoltées sur des plantes soumises à une limitation ou une restriction de l'apport de S au cours de leur développement. Les indices de germination (vitesse de germination, temps nécessaire pour atteindre 50 % de graines germées, taux de germination cumulé, taux de plantules normales produites…) ont été déterminés pour les deux génotypes. Étant donnée la difficulté de produire suffisamment de graines dans des conditions contrôlées de limitation/restriction en S, les graines de colza d'hiver (cv. Capitol) ont été utilisées pour mettre en évidence la présence d'un métabolisme soufré actif au cours de leur germination, et étudier les impacts de restrictions en sulfate appliquées à la plante mère sur ce métabolisme pendant la germination. Les plantules développées à partir des graines récoltées sur les colzas de printemps (cv. Yudal) cultivés dans des conditions de limitations en S variables ont été utilisées afin d'évaluer leur capacité d'absorption du sulfate par un apport de sulfate marqué au ^{34}S.

Article dont la soumission est prévue, avec l'appui d'expérimentations complémentaires, à *BMC Plant Biology* : Germinative and post-germinative behaviours of *Brassica napus* seeds are impacted by the severity of S limitation applied to the mother plants.

Chapitre III

Matériels et méthodes

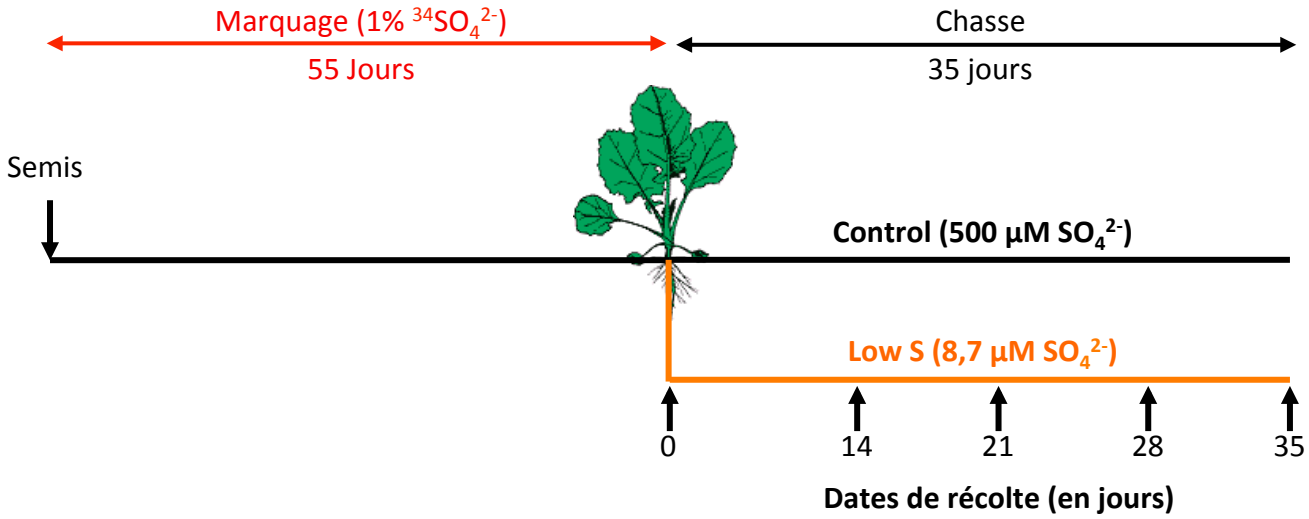


Figure III.1 Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour l'étude d'une restriction en sulfate appliquée au stade rosette sur la physiologie et le protéome d'une jeune feuille de colza d'hiver cv. Capitol.

Chapitre III : Matériels et méthodes

A Matériel végétal et conditions de cultures

A – 1 Dispositif expérimental mis en place pour l'étude d'une restriction en sulfate appliquée au stade rosette sur la physiologie et le protéome d'une jeune feuille de colza d'hiver

Le dispositif expérimental décrit dans cette partie a été mis en place afin d'étudier les modifications physiologiques du colza en réponse à une restriction en sulfate appliquée au stade rosette. Dans le cadre de cette étude, les mesures ont été réalisées sur des rangs foliaires aux états physiologiques différents et se sont particulièrement focalisées sur une feuille jeune, apparue après le début de l'application de la restriction en sulfate. Pour ce faire, les rangs foliaires ont été numérotés par ordre d'apparition, donc selon leur position nodale.

Les semences de colza de la variété Capitol ont été stérilisées à l'éthanol 80 % pendant 30 secondes, rincées à l'eau osmosée puis traitées à l'hypochlorite de sodium 1 % pendant 10 minutes sous agitation avant d'être nettoyées abondamment à l'eau déminéralisée. Les graines ont germé sur de la perlite imbibée de solution nutritive Hoagland ¼ (1,25 mM $Ca(NO_3)2,4H_2O$, 1,25 mM KNO_3, 0,5 mM $MgSO_4$, 0,25 mM KH_2PO_4, 0,2 mM Fe–Na EDTA, 14 µM H_3BO_3, 5 µM $MnSO_4$, 3 µM $ZnSO_4$, 0,7 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 0,7 µM $CuSO_4$, 0,1 µM $CoCl_2$), comportant du sulfate marqué au ^{34}S avec un excès isotopique de 1 atom% sous forme de K_2SO_4 comme précédemment décrit par Dubousset *et al.* (2009; Figure III.1). Cinquante-deux plantules âgées de 5 jours ont ensuite été transplantées dans un système hydroponique alimenté par 20 litres de solution nutritive Hoagland ¼ marquée au $^{34}SO_4^{2-}$, constamment aérée et renouvelée tous les 7 jours. Après 55 jours de croissance, les plantes ont été cultivées dans des bacs individuels contenant 4 litres de solution nutritive, et le marquage a été arrêté pour laisser place à une période de chasse de 35 jours durant laquelle deux niveaux d'alimentation soufrée ont été appliqués à 500 µM et 8,7µM de $MgSO_4$, respectivement pour les plantes témoins (Control) et limitées en S (Low S) (Figure III.1). Ces solutions nutritives ont été renouvelées tous les 7 jours. Quatre plantes de chaque traitement (Control et Low S) ont été récoltées après 0, 14, 21, 28 et 35 jours de traitement, et leurs différents organes ont été séparés. Durant toute la durée de l'expérience, les

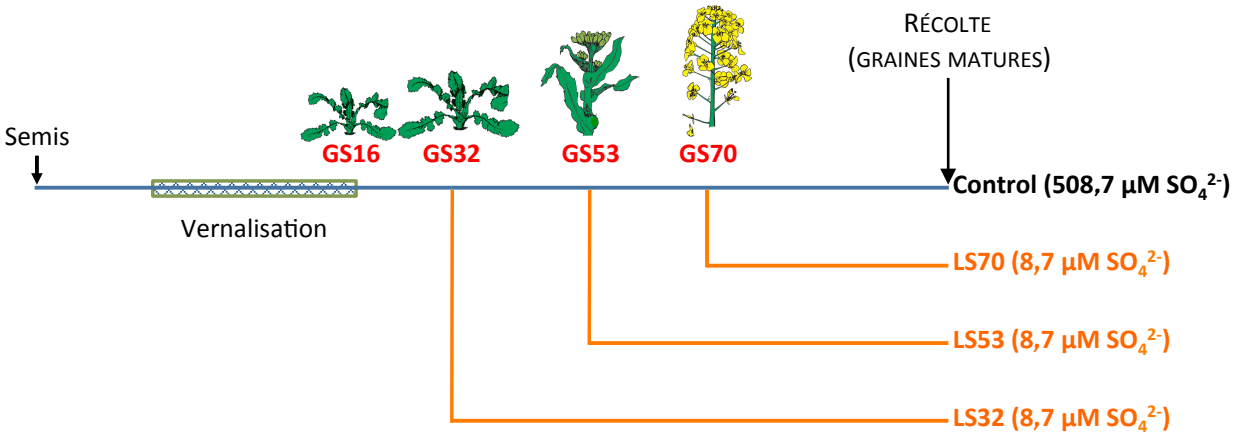


Figure III.2 Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour l'étude d'une restriction en sulfate (LS) appliquée au stade GS32 (début de montaison ; LS32), GS53 (inflorescence principale dégagée ; LS53) et GS70 (chute des premiers pétales ; LS70) sur le protéome de la graine mature de colza d'hiver cv. Capitol.

plantes ont été éclairées à la lumière naturelle, suppléée 16 h par jour par des lampes green power de Philips® (dispensant 400 µmol m^{-2} s^{-1} de radiations photosynthétiquement actives à la canopée). Les températures, diurnes et nocturnes, étaient respectivement de 20 et 15 °C.

A – 2 Dispositif expérimental mis en place pour l'étude de l'effet de restrictions en sulfate appliquées à différents stades du développement sur la qualité de la graine de colza d'hiver

Le dispositif expérimental décrit dans cette partie a été mis en place au cours de la thèse de Lucie Dubousset (2009) afin d'étudier les dynamiques d'utilisation du S à l'échelle de la plante et l'efficience de mobilisation du S foliaire, par une approche comparative entre des plantes soumises à une limitation en sulfate appliquée à différents stades clés du développement du colza (au début de la montaison, stade GS32 ; lorsque l'inflorescence principale est dégagée, stade GS53 ; et à la chute des premiers pétales, stade GS70). Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un article publié en 2010 dans *Journal of Experimental Botany* (Dubousset *et al.*, 2010). Les graines récoltées à maturité ont été utilisées dans le cadre de cette thèse afin d'étudier les conséquences de restrictions en sulfate appliquées à différents stades du développement sur la qualité oléique et protéique de la graine.

Les semences de colza (cv. Capitol) ont été stérilisées (selon la méthode décrite § A – 1) et mises à germer en présence d'eau ultra pure directement sur vermiculite (Figure III.2). Les plantes ont ensuite été transférées dans des bacs (à raison de 24 plantes par bac), contenant 20 litres de solution nutritive Hoagland ¼ (composition indiquée § A – 1) constamment aérée et renouvelée deux fois par semaine. Les plantes ont été cultivées en salle climatisée et ont reçu un éclairement artificiel similaire à celui décrit § A – 1. Trente-six jours après le semis, les plantes ont subi une période de vernalisation de 46 jours afin d'induire la montaison et la floraison (Figure III.2). Pour cela, les plantes ont été soumises à une température de 10 °C le jour et de 4 °C la nuit ainsi qu'à des héméropériodes de 10 h suivies de nyctipériodes de 14 h. Durant cette période, l'apport de la solution Hoagland ¼ est resté identique. Les plantes ont ensuite été repiquées en pot contenant un mélange de vermiculite (1/3) et de perlite (2/3) et placées en serre dans des conditions d'éclairage et de thermopériode similaires à celles appliquées avant vernalisation.

Comme indiqué dans la figure III.2, des restrictions de l'apport de sulfate à 8,7 µM ont été appliquées au début de la montaison (stade GS32), lorsque l'inflorescence principale est

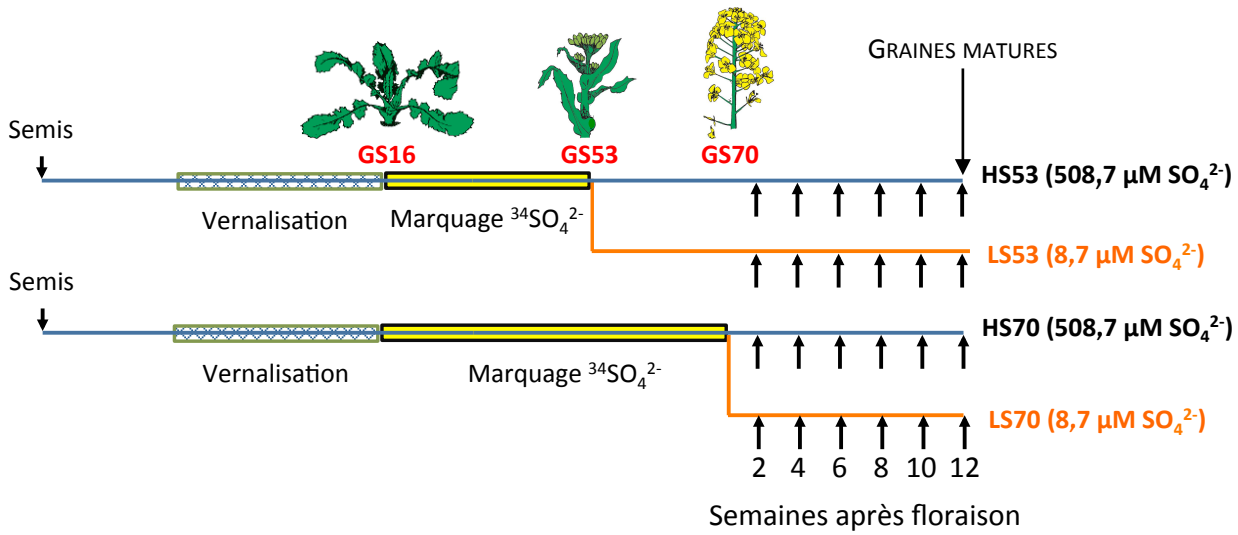


Figure III.3 Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour l'étude d'une restriction en sulfate (LS) appliquée au stade GS53 (inflorescence principale dégagée ; LS53) et GS70 (chute des premiers pétales ; LS70) sur le protéome de la graine mature de colza d'hiver cv. Capitol.

Les plantes ont été alimentées avec du $^{34}SO_4^{2-}$ (2 % d'excès isotopique) de la sortie de vernalisation (GS16) jusqu'à l'application du traitement (GS53 ou GS70) afin d'obtenir un marquage en ^{34}S homogène. Les colzas ont été récoltés à la fin du marquage (GS53 ou GS70) et 2, 4, 6, 8, 10 et 12 semaines après floraison.

dégagée (GS53) et à la chute des premiers pétales (GS70). Les plantes ayant subit ces traitements sont respectivement appelées LS32 (pour « Low S at GS32 »), LS53 et LS70 et ont été comparées à des plantes témoins (Control), alimentées à 508,7 µM de SO_4^{2-} pendant tout leur cycle de vie (Figure III.2). Afin d'adapter les apports hydriques au stade de développement des plantes, le volume de solutions nutritives apporté chaque jour par arrosage automatique a été adapté de la manière suivante : 90 mL/plante au début de la montaison, 120 mL/plante lorsque l'inflorescence principale est visible, 150 mL/plante à la floraison, 180 mL/plante pendant le remplissage des graines. Les graines récoltées à maturité ont été stockées sous vide à 12 °C dans un dessiccateur avant de procéder aux analyses de la qualité grainière.

A – 3 Dispositif expérimental mis en place pour l'étude de l'effet de restrictions en sulfate appliquées à deux génotypes de colza d'hiver sur la remobilisation du S, son métabolisme dans la graine en développement et sur les composantes du rendement

A – 3.a Conditions de culture

Le dispositif expérimental mis en place afin d'étudier la réponse de deux variétés de colza d'hiver à des restrictions de l'apport de sulfate à partir de différents stades de leur développement est décrit sur la figure III.3. Les flux de S pendant les périodes d'applications des traitements ont été suivis à l'aide de l'isotope stable ^{34}S, et la gestion du S par la graine en développement a été suivie par des analyses biochimiques et des mesures d'activités enzymatiques.

Des semences des variétés de colza d'hiver « 00 » Aviso et Capitol ont été stérilisées (selon la méthode décrite § A – 1) et mises à germer dans des pots de 0,5 litre contenant un mélange de vermiculite (1/3) et de perlite (2/3) et placées en serre. Les températures, diurnes et nocturnes, étaient respectivement de 20 et 15 °C. Les jeunes plantes, éclairées à la lumière naturelle suppléée 16 h par jour par des lampes green power de Philips® (400 µmol m^{-2} s^{-1} de radiations photosynthétiquement actives à la canopée) ont été cultivées sur une solution Hoagland ¼ pendant 60 jours. Une période de vernalisation de 69 jours est alors appliquée (8 °C/jour, 4 °C/nuit et héméropériode de 10 h), durant laquelle l'apport de la solution Hoagland ¼ est resté identique (Figure III.3). Après vernalisation, chaque plante a été transférée dans un pot de 4 litres contenant un mélange de vermiculite (1/3) / perlite (2/3), et placée en serre sans lumière artificielle dans des conditions de thermopériode similaires à celles appliquées avant vernalisation.

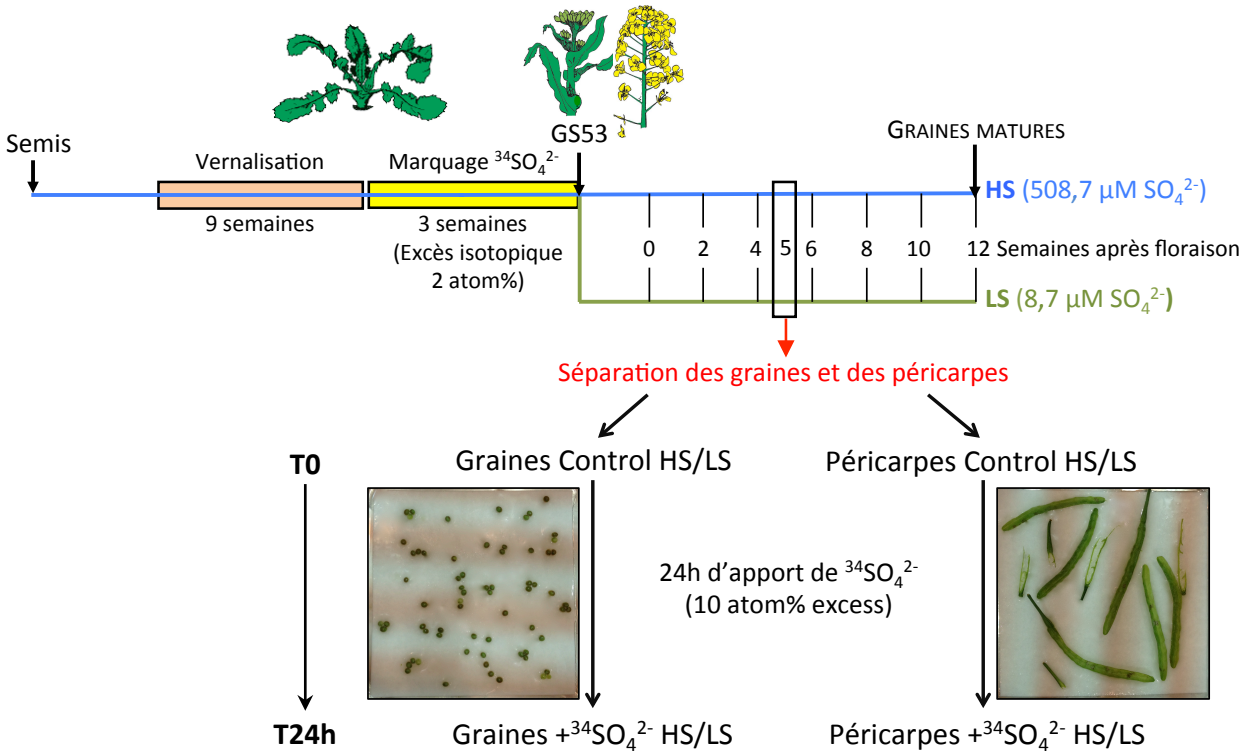


Figure III.4 Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour étudier l'impact d'une restriction en sulfate appliquée au stade GS53 (inflorescence principale dégagée) sur l'assimilation du sulfate par les graines et le péricarpe de colza d'hiver cv. Capitol.

Les plantes ont été alimentées avec du $^{34}SO_4^{2-}$ (2 % d'excès isotopique) de la sortie de vernalisation (GS16) jusqu'à l'application du traitement (GS53) afin d'obtenir un marquage en ^{34}S homogène. À 5 semaines après floraison, des siliques en développement ont été récoltées sur 3 plantes bien alimentées (HS) et 3 plantes limitées en S (LS). Une fois isolés, les graines et les péricarpes HS et LS ont été mis en présence d'une solution nutritive contenant 508,7 µM de sulfate enrichi au ^{34}S (10 % d'excès isotopique) pendant 24 heures.

Afin de déterminer la contribution des réserves soufrées accumulées au sein des organes végétatifs au remplissage de la graine en S, les plantes ont été marquées à l'isotope stable ^{34}S (excès isotopique de 2 atom%) de la sortie de vernalisation jusqu'aux différents stades d'applications d'une restriction en S, GS53 (inflorescence principale dégagée) ou GS70 (chute des premiers pétales). À l'arrêt du marquage, les colzas ont été soumis à une restriction de l'apport en sulfate à 8,7 µM jusqu'à la fin de leur cycle de vie (Figure III.3). Pour les deux génotypes, le développement de la graine a duré 12 semaines à partir de la chute des premiers pétales. Les plantes ont été récoltées à la fin de la période de marquage (GS53 ou GS70) ainsi qu'à 2, 4, 6, 8, 10 et 12 semaines après floraison (n = 4 ; Figure III.3). Les différents organes de la plante (racines, feuilles chutées, feuilles vertes, tige, fleurs, péricarpes, graines) ont été pesés, lyophilisés et broyés pour en analyser le contenu élémentaire (S, N) et isotopique (^{34}S). Les siliques supérieures à 6 cm ont été disséquées afin d'en extraire les graines, utilisées pour les analyses biochimiques et les mesures d'activités enzymatiques ultérieures.

A – 3.b Dispositif expérimental mis en place pour la mise en évidence et l'étude de l'assimilation du sulfate par la graine et le péricarpe en réponse à une restriction en sulfate appliquée au stade GS53 (inflorescence principale dégagée)

Le dispositif expérimental résumé au sein de la figure III.4 a été utilisé afin de mettre en évidence la capacité d'assimilation du sulfate par la graine et le péricarpe et d'étudier la réponse du métabolisme soufré de ces deux organes à une restriction de l'apport de S. Les graines et des péricarpes utilisés dans cette expérimentation ont été prélevés sur des colzas issus de la culture décrite § A – 3.a.

Des siliques produites par trois colzas de la variété Capitol ayant subi une restriction de l'apport de S à partir du stade GS53 (LS) et trois colzas bien alimentés en S (HS) ont été prélevées 5 semaines après floraison et disséquées afin de séparer les graines des péricarpes (Figure III.4). Ces graines et péricarpes fraichement disséqués, issus de trois répétitions biologiques par traitement, correspondent aux échantillons témoins (Control).

Les péricarpes et les graines fraichement récoltés et séparés ont été placés sur un papier Whatman (10 cm x 10 cm) imbibé de 10 mL de solution Hoagland ¼ contenant du $^{34}SO_4^{2-}$ (excès isotopique 10 atom%) pendant 24h à 20 °C et éclairés à 250 µmol m^{-2} s^{-1} de radiations photosynthétiquement actives (Figure III.4). Après cette période, les graines et les péricarpes ont été abondamment rincés pendant une minute avec de l'eau ultra pure. Les

teneurs en sulfate, en ^{34}S-sulfate ainsi que les teneurs en protéines, S-protéique et ^{34}S-protéique ont été déterminées sur les graines et les péricarpes prélevés sur les plantes HS et LS avant (Control) et après les 24h d'apport de $^{34}SO_4^{2-}$ (+$^{34}SO_4^{2-}$).

A – 4 Dispositif expérimental mis en place pour l'étude de l'effet de limitations et de restrictions en sulfate sur la germination des graines produites et la gestion du S au cours de la germination et des évènements post-germinatifs

A – 4.a Production de graines en condition de restrictions de l'apport de S à différents stades de développement (cv. Capitol)

Les conditions de culture utilisées pour obtenir les graines matures de la variété de colza d'hiver Capitol utilisées dans cette partie ont été décrites § A – 2 et par Dubousset *et al.* (2010). Les graines du lot Control ont été récoltées sur des plantes alimentées en SO_4^{2-} (508,7 µM) durant tout leur cycle de développement. Les graines des lots LS32, LS53 et LS70 ont été respectivement récoltées sur des plantes soumises à une restriction de l'apport de S (8,7 uM SO_4^{2-}) appliquée à partir du début de la montaison (GS32), lorsque l'inflorescence principale est dégagée (GS53) et à la chute des premiers pétales (GS70) jusqu'à maturité.

A – 4.b Production de graines sous différents niveaux de nutrition S (cv. Yudal)

Les graines matures de la variété de colza de printemps Yudal ont été récoltées sur des plantes cultivées en serre, alimentées avec 4 niveaux de nutrition S calculés en fonction des besoins en S des plantes Control de la variété d'hiver Capitol issus de l'étude menée par Dubousset *et al.* (2010). Les semences du lot S400% ont été récoltées sur des plantes dont les besoins en S ont été pleinement satisfaits (400 % des besoins en S apportés sous forme de sulfate). Les semences des lots S70%, S20% et S5% ont été récoltées sur des colzas ayant subi des limitations en sulfate durant tout le cycle de développement de la plante correspondant respectivement à 70 %, 20 % et 5 % des besoins en S satisfaits.

A – 4.c Tests de germination

Les graines matures des variétés Capitol et Yudal obtenues pour chaque traitement ont d'abord été calibrées à un diamètre supérieur ou égal à 1,6 mm (Pour chaque traitement, n = 4 pour Capitol et n = 3 pour Yudal). Cinquante graines par répétition biologique ont été semées sur du papier Whatman imbibé d'eau ultra pure dans des boîtes de Pétri (12 x 12 cm). Les boîtes de Pétri ont ensuite été fermées et placées à l'obscurité dans une chambre de croissance maintenue à 20 °C et 70 % d'humidité relative. À intervalles réguliers, les

graines pour lesquelles la radicule a percé le tégument, considérées comme germées (Bewley & Black, 1994), ont été comptées. Pour la variété Capitol, plusieurs répétitions techniques ont été réalisées afin de récolter les graines en cours de germination.

A – 4.d Dispositif expérimental mis en place pour étudier la capacité d'assimilation du sulfate par les plantules de la variété Yudal

Quatorze jours après semis sur perlite imbibée d'eau (d14), une solution nutritive contenant du sulfate marqué au ^{34}S a été apportée aux plantules des lots S400%, S70%, S20% et S5% de la variété Yudal afin d'étudier leur capacité d'absorption du sulfate. Les plantules viables ont été transférées pendant 24 h sur perlite imbibée de solution nutritive Hoagland ¼ contenant 508,7 µM de SO_4^{2-} marqué au ^{34}S (excès isotopique de 5 atom%, d15 $+^{34}SO_4^{2-}$) ou pauvre en S (8,7 uM SO_4^{2-}; d15-S) . Après cette période, les plantules ont été récoltées et abondamment rincées à l'eau osmosée pendant 1 min. Les teneurs en S, en sulfate, ainsi que les compositions isotopiques du S total et de la fraction sulfate ont été déterminées au niveau des parties aériennes et racinaires, 14 jours après le semis (d14), et 24 h après apport de la solution nutritive (d15) riche en sulfate marqué au ^{34}S ($+^{34}SO_4^{2-}$) ou pauvre en S (-S). Une aliquote de chaque échantillon récolté 14 jours après semis (d14) a été stockée à -80 °C pour déterminer le niveau d'expression relative des gènes *BnSultr1;1*, *BnSultr1;2* au niveau des racines.

B Mesures de l'état physiologique de la plante

B – 1 Mesure de l'activité photosynthétique, de la teneur en chlorophylles, en flavonols et en anthocyanes

Dans le cadre de la culture décrite § A – 1, les teneurs relatives en chlorophylles, en anthocyanes et en flavonols ont été mesurées sur chaque rang foliaire de plantes témoins (Control) et limitées en S (Low S) par un système Multiplex® (Force A) chaque semaine au cours de la période de restriction. Des mesures d'activité photosynthétique ont également été réalisées au cours des derniers jours d'application du traitement, entre 9h00 et 12h00, par un système de mesure d'échanges gazeux portatif LI-6400 (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA) sur les feuilles 7 (feuille mature en début de traitement), 11 (feuille jeune en début de traitement) et 16 (feuille jeune apparue en cours de traitement). La photosynthèse nette a été mesurée sur ces feuilles à 20 °C, sous approximativement 400 ppm de CO_2 et un flux de photons photosynthétiquement actifs de 1000 µmol.m^{-2}.s^{-1}. Ces mesures ont été réalisées

sur trois ou quatre plantes pour chaque traitement afin de permettre une analyse statistique des résultats. De plus, pour chaque répétition biologique, des répétitions techniques ont été effectuées.

B – 2 Détermination de la surface foliaire et de la biomasse des différents organes

À la récolte, les surfaces foliaires ont été mesurées par un planimètre LICOR 300 (LICOR). Les différents organes frais ont été pesés afin d'en déterminer la masse fraiche, puis rapidement découpés en petits morceaux pour en effectuer des aliquotes homogènes, destinées aux différentes analyses. Immédiatement après l'échantillonnage, les aliquotes sont congelées dans de l'azote liquide. Une aliquote de chaque organe de masse fraiche connue a ensuite été lyophilisée puis sa masse sèche a été déterminée. Les aliquotes de matière fraiche ou les poudres obtenues après broyage des aliquotes lyophilisées ont été utilisées pour les analyses biochimiques ultérieures.

C Détermination de la vigueur et de la capacité germinative

C – 1 Calcul des indices de germination

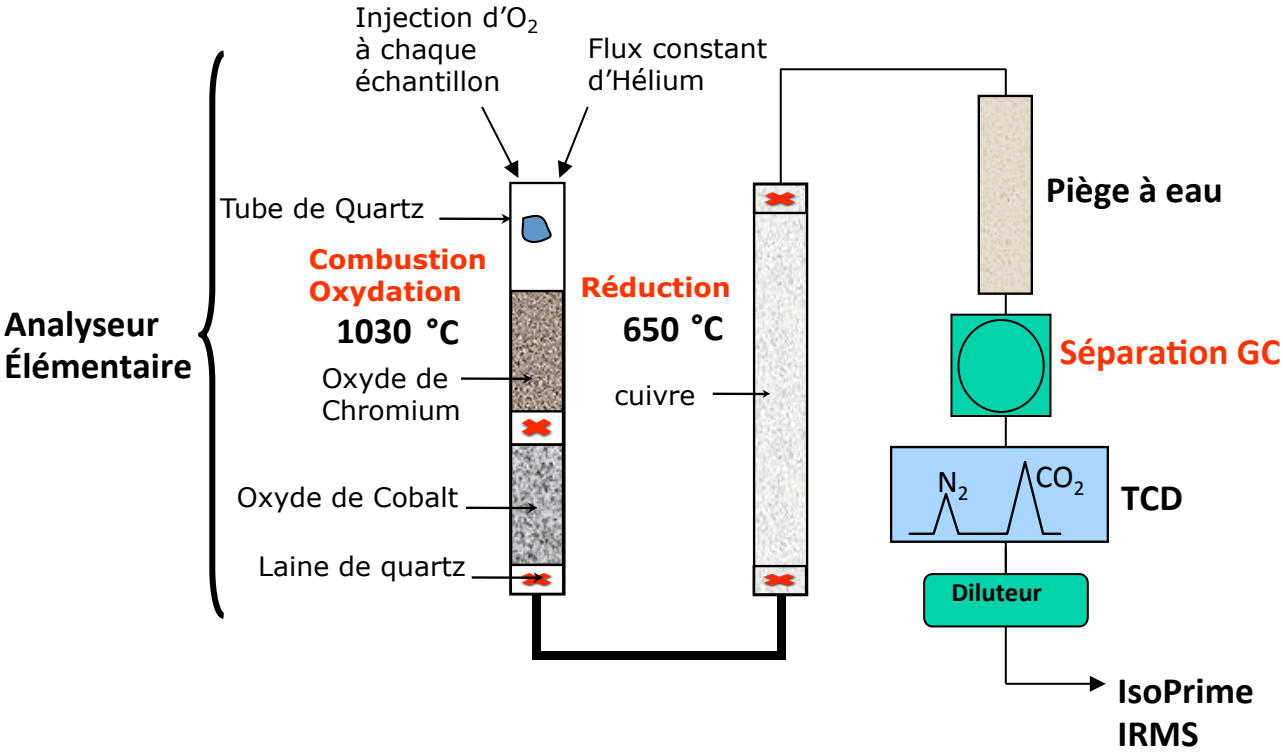
Les taux de germination cumulés des différents lots de graines ont été représentés en utilisant le modèle de régression non linéaire de Gompertz (Brown & Mayer, 1988). Cinq indices de germination ont été sélectionnés pour cette étude. Le taux de germination finale a été déterminé à 58 h pour les lots de graines de la variété Capitol et à 71 h pour les lots de la variété Yudal. Les temps nécessaires pour atteindre un taux de germination de 50 % (T50) et pour atteindre 50 % du taux de germination finale (T'50) ont été calculés à partir des équations de Gompertz. La vitesse de germination a été calculée selon Bradbeer (1988) en utilisant l'équation suivante:

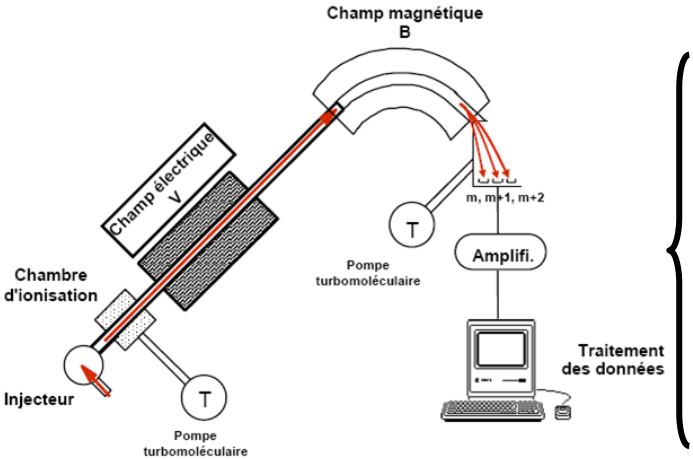
$$Vitesse\ de\ germination = \sum \frac{N_t - N_{t-1}}{t}$$

Où N_t : Proportion de graines germées (taux de germination cumulé) observée à t heures.

Le coefficient du taux de germination (CRG pour « Coefficient of the rate of germination) a été calculé en utilisant l'équation proposée par Bewley & Black (1994) :

$$CRG = 100 \times \frac{\sum Nt}{\sum (t \times Nt)}$$





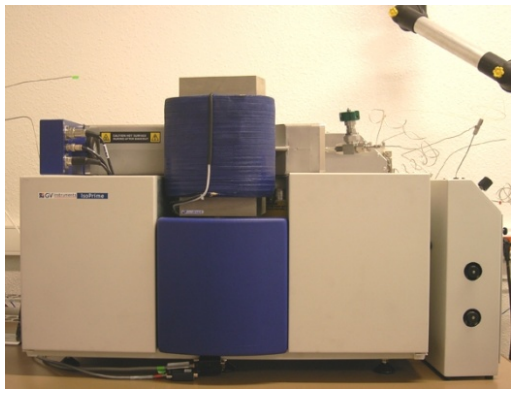


Figure III.5 Analyseur élémentaire C/N/S (EA3000, Eurovector, Milan, Italie) couplé à un spectromètre de masse de type IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometer de marque Isoprime, GV Instrument, Manchester, Royaume-Uni) utilisé pour déterminer les teneurs en N et S, et le niveau de marquage en ^{34}S dans les différents tissus végétaux.
La composition des colonnes de l'analyseur élémentaire présentée sur ce schéma correspond à une analyse des teneurs en N.

C – 2 Détermination du taux de plantules ayant un développement normal

Le taux de plantules ayant eu un développement normal a été déterminé 7 jours après le semis pour les colzas de la variété Capitol par Dubousset *et al.* (2010). Pour cette variété, 50 graines matures par répétition biologique (n = 6 pour le lot Control et n = 4 pour chaque lot LS) ont été mises à germer sur du papier Whatman imbibé de 10 mL eau ultra pure dans des boîtes de Pétri (12 x 12 cm) pendant 7 jours sous 400 µmol m^{-2} s^{-1} de radiations photosynthétiquement actives à la canopée 6 h par jour (25 °C jour/18 °C nuit). Trois répétitions techniques ont été effectuées pour chaque répétition biologique.

Le taux de plantules de la variété Yudal ayant eu un développement normal a été déterminé 14 jours après semis (d14) à partir de 150 graines matures par répétition biologique (n = 3), semées sur perlite imbibée d'eau et placés dans des conditions d'éclairement et de température similaires à celles appliquées au semis de la variété Capitol.

D Analyses biochimiques

D – 1 Détermination des teneurs en S et N totales et de la composition isotopique en ^{34}S

Le système utilisé pour la détermination des teneurs en S et N total et les analyses isotopiques est composé d'un analyseur élémentaire (EA3000, EuroVector, Milan, Italy), assurant la production de N_2 ou de SO_2 couplé à un spectromètre de masse de ratio isotopique (IRMS de marque IsoPrime, GV Instruments, Manchester, UK) (Figure III.5). Les échantillons secs finement broyés ont été pesés avec précision (± 1 µg) dans de fines nacelles en étain.

Les échantillons ont ensuite été disposés dans l'injecteur placé en tête de la colonne d'oxydation de l'analyseur élémentaire en présence d'un flux d'hélium en légère surpression, permettant d'éviter toute contamination par l'air. Pour la détermination de la quantité d'azote (N) de l'échantillon, 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 °C) grâce à une élévation de température (1600 °C) assurée par un apport d'oxygène. A la sortie de la colonne d'oxydation, l'échantillon, alors sous forme gazeuse, est réduit au cours du passage sur une colonne de cuivre métallique à 650 °C (colonne de réduction). Pour la détermination de la quantité de S et de ^{34}S de l'échantillon, 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 °C). Après piégeage des molécules d'H_2O et de

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 °C pour les analyses d'azote et 95 °C pour les analyses de S), les molécules azotées ou soufrées sont séparées du CO_2 avant d'être injectées dans le spectromètre de masse isotopique.

Le soufre ou l'azote gazeux injecté dans le spectromètre de masse est d'abord ionisé. Les ions moléculaires alors formés sont accélérés dans une chambre électrique, puis leurs trajectoires sont déviées 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 fonction de leur masse. Ainsi, par exemple, la déviation du N_2 de masse 28 ($^{14}N^{14}N$) sera plus grande que celle du N_2 de masse 29 ($^{14}N^{15}N$), elle-même plus grande que celle du N_2 de masse 30 ($^{15}N^{15}N$).

Les ions sont ensuite collectés au niveau de trois 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 $\delta^{15}N$ et de $\delta^{34}S$ prenant en compte les différents signaux comparés à des gaz de référence (N_2 ou SO_2) injectés entre les échantillons (GV Instrument), sont collectées.

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

$$A = 100 \times Rsample / (Rsample + 1)$$

Dans le cas du S, Rsample (ratio isotopique de l'échantillon) est déterminé d'après la formule suivante :

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

Où la valeur 0,04415206 correspond au ratio isotopique du Vienna Canyon Diablo Troilite (V-CDT), standard isotopique internationalement reconnu pour les analyses de S. Pour déterminer les quantités de ^{34}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.

D – 2 Méthode utilisée pour le calcul de flux de S remobilisé (provenant des réserves) et alloué (issu de l'absorption)

Les calculs de flux ont été réalisés sur l'expérimentation décrite en § A – 3.a suivant la méthode décrite par Avice (1996). Les quantités de ^{34}S présentes dans les différents organes,

pour une date déterminée, sont calculées à l'aide des excès isotopiques selon la méthode décrite précédemment (§ D – 1). Une normalisation des quantités de ^{34}S absorbées est effectuée à l'aide de la moyenne des quantités de ^{34}S relevées à l'échelle de la plante entière pour chaque date de récolte par le calcul suivant :

$$Q^{34}S_{\text{normalisée}} = \frac{Q^{34}S_{\text{organe}}(\text{t}) \times \overline{Q^{34}S_{\text{plante entière}}}}{Q^{34}S_{\text{plante entière}}(t)}$$

Où $Q^{34}S_{organe}(t)$ = quantité de ^{34}S présente dans l'organe à la date t

$Q^{34}S_{plante\ entière}(t)$ = quantité de ^{34}S présente dans la plante entière à la date t

Les longues périodes de marquage permettent une répartition uniforme du ^{34}S au sein des différents organes et des différentes fractions biochimiques contenant du S. Au cours de la période de chasse, nous pouvons distinguer deux types d'organes :

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

$$QSRs = \frac{QS_{t0} \times (Q^{34}S_{t0} - Q^{34}S_{t0+\Delta t})}{Q^{34}S_{t0}}$$

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

$Q^{34}St_{0+\Delta t}$ = quantité de ^{34}S présente dans l'organe source à t_0+Δt,

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

Δt = 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 Δt. Ainsi, entre t_0 (date de début de chasse) et t_0+Δt, la quantité de S issue de la remobilisation (QSRp) correspond à :

$$QSRp = \frac{Q^{34}St_{0+\Delta t} \times \sum_{t_0}^{t0+\Delta t} QSRs}{\sum_{t_0}^{t0+\Delta t} Q^{34}St_{0+\Delta t}}$$

Où $Q^{34}St_{0+\Delta t}$ = quantité de ^{34}S présente dans l'organe puits à t_0+Δt,

$\sum_{t_0}^{t0+\Delta t} QSRs$ = somme des quantités de S remobilisées depuis les organes sources entre t_0 et t_0+Δt,

$\sum_{t_0}^{t0+\Delta t} Q^{34}St_{0+\Delta t}$ = somme des quantités de ^{34}S accumulées dans les organes puits entre t_0 et $t_0+\Delta t$.

Les calculs de flux permettent le suivi des transferts de S endogènes (provenant des réserves) et exogènes (issus de l'absorption minérale) au sein des plantes. Ainsi les processus de mobilisation entre les plantes témoins et les plantes soumises à des traitements de limitation en S peuvent être comparés quantitativement.

D – 3 Extraction, dosage du sulfate et détermination de la composition isotopique en ^{34}S-sulfate

Les extractions de sulfate ont été réalisées à partir de 45 mg de matière sèche de tissus végétaux, lyophilisés et broyés, par deux incubations avec 2 mL d'éthanol 50 % à 40 °C pendant 1 heure puis deux incubations avec 2 mL d'eau ultra pure à 95 °C pendant 1 heure. Après chaque période d'incubation, les extraits ont été centrifugés pendant 20 minutes à 10 000 *g*, et les surnageants récupérés et conservés à 4 °C. Les quatre surnageants obtenus pour chaque échantillon ont été regroupés dans un même tube pour être concentrés par évaporation sous vide (concentrateur évaporateur RC10.22, Jouan, Saint-Herblain, France). Le résidu sec est alors remis en suspension dans 2 mL d'eau ultra pure.

La concentration en sulfate est déterminée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC, ICS3000, Dionex Corporation, 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_2CO_3 (1,8 mM) et de Na_2HCO_3 (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 $mg.L^{-1}$ de sulfate.

Pour la détermination de la composition en ^{34}S-sulfate, le sulfate a été purifié en utilisant une colonne Dowex 50W (H+) de 6 cm de haut et 1,6 cm de diamètre. Après élution des échantillons par 7,5 mL d'eau, la concentration en sulfate a été déterminée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC, ICS3000, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Pour chaque échantillon, le volume correspondant à 10 µg de S a été concentré sous vide et remis en suspension dans 50 µL d'eau ultra pure. Ces extraits ont ensuite été placés dans des capsules d'étain, évaporées sous vide à 45 °C

(Speedvac Concentrateur 5301), et le contenu en ^{34}S a été déterminé par IRMS comme décrit § D – 1.

D – 4 Détermination des teneurs en sulfite, cysteine, γ-glutamylcysteine (γ-EC), et glutathion total par HPLC

La détermination des teneurs en sulfite, en cystéine libre totale, en γ-EC et en glutathion total a été réalisée en collaboration avec le Dr. Stanislav Kopriva (John Ines Centre, Norwich, Grande-Bretagne). Les teneurs en sulfite, en cystéine libre totale, en γ-EC et en glutathion total ont été déterminées par HPLC en utilisant la méthode de dérivation par le monobromobimane telle que décrite par Koprivova *et al.* (2008). Le monobromobimane se conjugue avec les thiols de faibles poids moléculaires et devient ainsi fluorescent, ce qui permet la quantification par fluorimétrie des différents thiols après séparation par HPLC.

Les thiols ont été extraits par homogénéisation de 20 mg de matière fraiche ou 10 mg de matière sèche dans 200 µL d'HCl 0,1M. Après centrifugation (20 000 *g*, 10 min, 4 °C), 25 µL de surnageant ont été mélangés à 25 µL de NaOH 0,1 M et 1 µL de DTT 0,1M permettant la réduction des ponts disulfures. Les échantillons ont alors été incubés à l'obscurité pendant 15 minutes à 37 °C, puis mélangés à 10 µL de Tris HCl pH8, 35 µL d'eau, et 5 µL de monobromobimane 0,1M (Thiolyte® MB, Calbiochem) dilué dans de l'acétonitrile. Les échantillons ont alors été incubés à l'obscurité pendant 15 minutes à 37 °C. Après addition de 100 µL d'acide acétique 9 %, les échantillons ont été centrifugés (20 000 *g*, 15 min, 4 °C). Les surnageants ont été récupérés pour la séparation des thiols par HPLC (Spherisorb™ ODS2, 250 x 4.6 mm, 5 µm, Waters). Le protocole d'élution utilise un gradient linéaire de 96 à 82 % du solvant A (méthanol 10 % (v/v), acide acétique 0,25 % (v/v) ; pH 3,9) dans le solvant B (acide acétique 90 % (v/v), méthanol 0,25 % (v/v) ; pH 3,9) en moins de 20 minutes, avec un débit de 1 $mL.min^{-1}$. Les dérivés du monobromobimane sont détectés par fluorimétrie (détecteur 474, Waters) avec une excitation à 390 nm et une émission à 480 nm.

D – 5 Détermination de la teneur en H_2O_2

La teneur en H_2O_2 a été déterminée selon la méthode décrite par Lee *et al.* (2009). À environ 500 mg de matière fraiche de tissus végétaux broyés à l'azote liquide, sont ajoutés 1,5 mL de tampon phosphate 50 mM (pH 6,8). L'ensemble est mélangé au vortex avant d'être centrifugé à 6000 *g* pendant 25 minutes. Le surnageant a ensuite été mélangé avec 1

mL de solution de titanium chloride 0,1 % dans de l'acide sulfurique 20 % (v/v) avant d'être centrifugé à 6000 *g* pendant 15 minutes. L'absorbance du surnageant a immédiatement été lue à 410 nm et la concentration en H_2O_2 a été calculée en utilisant une gamme étalon de solutions d'H_2O_2 de 0 à 10 mM.

D – 6 Détermination de la composition en acides aminés

L'extraction des acides aminés a été effectuée à partir de 30 mg de matériel végétal lyophilisé et broyé par trois étapes d'incubation de 1 heure à 4 °C avec successivement 0,5 mL d'éthanol 80 %, 0,5 mL d'éthanol 50 % puis 0,5 mL d'eau. Après chaque période d'incubation, les extraits ont été centrifugés pendant 5 minutes à 20 800 *g*. Les trois surnageants obtenus pour chaque échantillon ont été regroupés dans un même tube pour être séchés à température ambiante sous vide (Speedvac Concentrateur 5301). Le résidu sec est alors remis en suspension dans 1 mL de tampon citrate (pH 2,98 ; P-21, 1st Lithium Citrate Buffer, JEOL Europe). La teneur de chaque acide aminé a été déterminée après séparation par chromatographie échangeuse d'ions par l'analyseur d'acides aminés AminoTac JLC-500/V selon les instructions du fabricant (JEOL Europe, Croissy sur Seine, France).

E Analyses du contenu et de la composition protéiques

E – 1 Extraction, dosage des protéines solubles et détermination de la composition en N, S, et ^{34}S

Pour la détermination de la teneur en S-protéique, les protéines solubles ont été extraites par broyage de 30 mg de matière fraiche de graines dans 0,5 mL de tampon d'extraction (citrate 20 mM, Na_2HPO_4 160 mM ; pH 6,8), puis centrifugation (12 000 *g*, 4 °C, 1 h). Le surnageant obtenu a été utilisé pour déterminer la concentration en protéines solubles par la méthode de Bradford (1976) en utilisant la BSA comme standard. Les protéines ont ensuite été précipitées par l'ajout de quatre volumes de TCA/acétone (10 % TCA dans l'acétone) pour un volume d'extrait. Après stockage une nuit à -20°C, l'extrait a été centrifugé (12 000 *g*, 4 °C, 20 min) et le culot obtenu a été lavé avec 1 mL d'acétone 80 %, puis centrifugé (16 000 *g*, 4 °C, 3 min) avant d'être lavé et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. L'acétone résiduelle a été évaporée sous vide à 45 °C (Speedvac Concentrator 5301, Eppendorf, France), et le culot résultant, remis en suspension dans 0,1 mL d'eau ultra-pure, a été déposé dans une capsule en étain. L'eau a ensuite été évaporée

sous vide à 45 °C et l'extrait sec de protéines a été analysé par IRMS comme décrit § D – 1 pour en déterminer le contenu en N, S et ^{34}S.

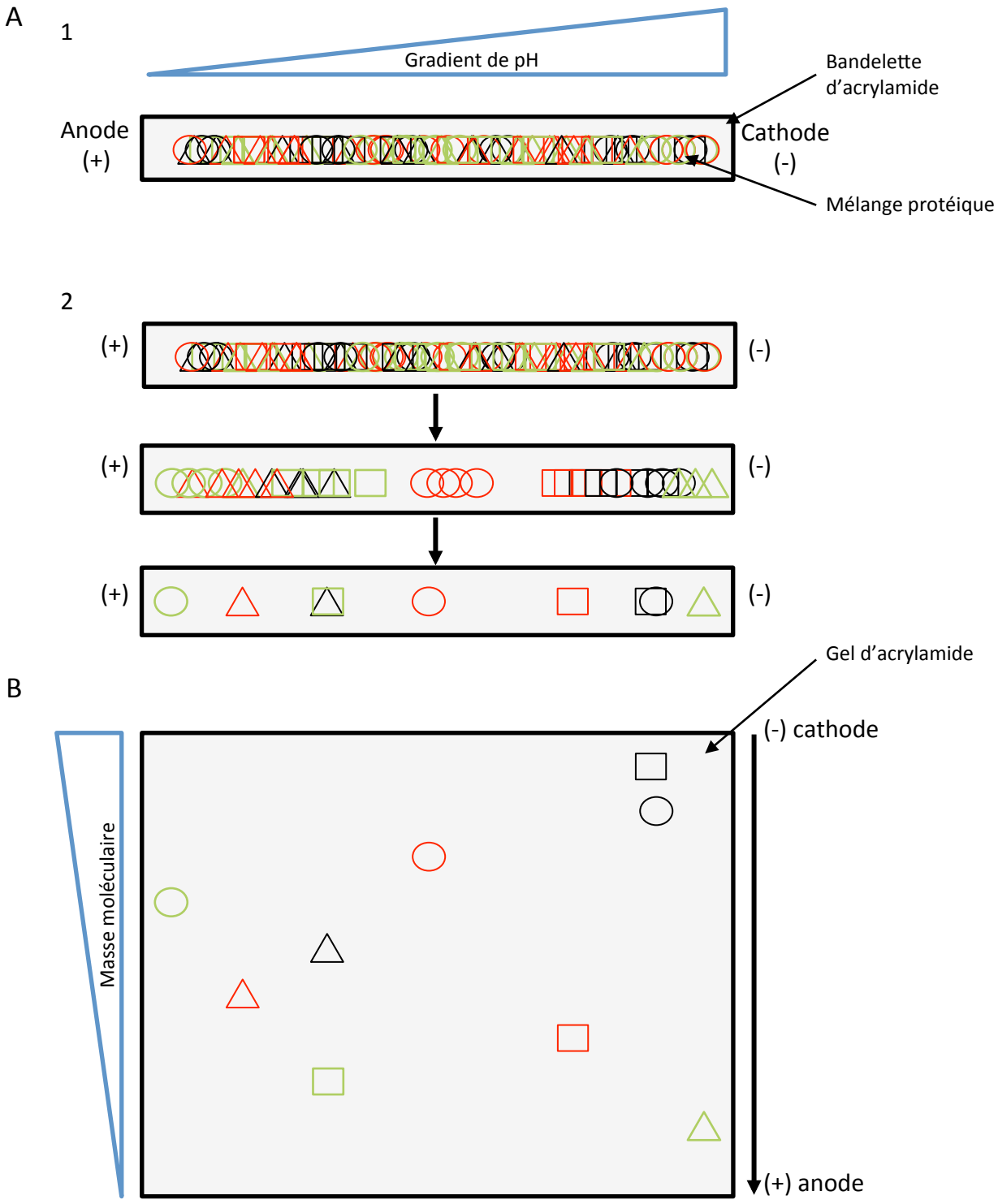
E – 2 Analyse du protéome de la jeune feuille en réponse à une restriction de l'apport de S au stade rosette

E – 2.a Extraction et dosage des protéines totales

Deux cent milligrammes de feuilles de colza ont été broyés au sortir de l'azote liquide en présence de 50 mg de poly(vinylpolypyrrolidone) (PVPP). L'addition de PVPP a permis de fixer les polyphénols végétaux pouvant notamment interférer lors du dosage colorimétrique des protéines.

Le broyat a été solubilisé dans 1,75 mL de TCA/acétone (acétone contenant 10 % (p/v) de TCA). Après centrifugation (3 min, 16000 *g*, 4 °C), le culot protéique a été purifié selon un protocole adapté de Wang *et al.* (2003). Le culot protéique obtenu a été repris dans 1,75 mL d'acétate d'ammonium 0,1M dissous dans du méthanol à 80 %. Après homogénéisation et centrifugation (16000 *g*, 3 min, 4 °C), le culot a été lavé avec 1,75 mL d'acétone à 80 % puis centrifugé à nouveau (16000 *g*, 3 min, 4 °C). Après élimination du surnageant, le culot a été séché sous vide (Speedvac concentrator 5301, Eppendorf, France) pendant 5 minutes à 50 °C puis repris dans 0,8 mL de phénol pH 7,9 et 0,8 mL de tampon SDS-Saccharose (Saccharose 30 %, SDS 2 %, Tris-HCl pH 8 0,1M, 2–mercaptoethanol 0,5 %). Après incubation 5 minutes à 4 °C et centrifugation (16000 *g*, 3 min, 4 °C), la phase phénolique, récupérée dans un nouveau tube, a été complétée avec 1,75 mL d'acétate d'ammonium 0,1M puis stockée à -20 °C pendant 12 heures. L'acétate d'ammonium précipite les protéines qui peuvent ainsi être recueillies par centrifugation (16000 *g*, 5 min, 4 °C). Le culot protéique a ensuite été lavé avec 1,75 mL de méthanol 100 % puis 1,75 mL d'acétone 80 %. Quelques minutes d'évaporation sous vide ont permis d'éliminer les résidus d'acétone.

Le culot protéique obtenu a alors été solubilisé dans 400 µL de tampon R2D2 [Urée 5 M, thiourée 2 M, CHAPS 2 %, N–decyl– N,N–dimethyl–3–ammonio–1–propanesulfonate 2 %, dithiothreitol (DTT) 20 mM, Tris (2–carboxy– ethyl) phosphine 5 mM, IPG buffer pH 4-7 0,5 % (GE Healthcare, Saclay, France) ; Méchin *et al.*, 2003]. La concentration en protéines totales a été déterminée par la méthode de Bradford (1976) en utilisant l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard.



<u>Figure III.6</u> Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE).
A : Isoéléctrofocalisation (IEF), ou 1ère dimension, permet la séparation des protéines selon leur charge. 1 : Une bandelette d'acrylamide (strip) possédant un gradient de pH est déposée sur l'extrait protéique dans la cuve du système IEF. 2 : Sous l'effet d'un courant électrique, les protéines vont se déplacer dans ce gel jusqu'à ce qu'elles atteignent leur point isoélectrique (i.e. le pH pour lequel leur charge propre sera nulle). La bandelette est ensuite équilibrée, une étape importante qui consiste à préparer les protéines pour la 2nde dimension en les chargeant négativement. B : La 2nde dimension ou SDS-PAGE, permet la séparation des protéines selon leur masse moléculaire. La bandeletteest déposée au sommet d'un gel d'acrylamide, placé ensuite dans le système de migration. Sous l'effet d'un courant électrique, les protéines, chargées négativement se déplacent dans le gel vers l'anode (pôle +). La vitesse de migration de chaque protéine est fonction de la masse moléculaire de la protéine considérée. Les protéines les plus légères se retrouvent ainsi dans le bas du gel, et les protéines les plus lourdes se retrouvent dans le haut du gel.

E – 2.b Electrophorèse bidimensionnelle (2-DE)

L'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) est une technique développée indépendamment par Joaquim Klose et par Patrick H. O'Farrell il y a près de 40 ans (Klose, 1975; O'Farrell, 1975). La 2-DE fait intervenir deux types d'électrophorèses : l'isoelectrofocalisation (IEF) permettant dans un premier temps la séparation des protéines selon leurs points isoélectriques, en les faisant migrer le long d'un gradient de pH, suivie d'une SDS-PAGE assurant la séparation des protéines en fonction de leurs poids moléculaires (Figure III.6).

Première dimension (IEF)

Les extraits protéiques, dilués de façon à obtenir 125 µg de protéines totales dans un volume de 330 µL de R2D2, ont été déposés sur le plateau du système PROTEAN IEF (Bio-Rad, Marne la Coquette, France). Le gel d'acrylamide IEF (bandelette de 18 cm, pH 4-7 ; GE Healthcare) a ensuite été mis au contact de l'extrait protéique pendant une heure afin de faciliter l'imprégnation des protéines sur le gel. L'ensemble a été recouvert d'huile minérale (environ 3 mL) afin d'éviter les phénomènes d'évaporation pendant l'IEF. L'étape de réhydratation active a été réalisée à 50 µA/gel pendant 16 heures et a été suivie de l'IEF au cours de laquelle les protéines dénaturées par l'urée contenue dans le tampon R2D2 ont migré en fonction de leurs points isoélectriques respectifs. L'IEF a été lancée pendant 15 minutes à 250 V, suivi de 2h à 500 V, puis à 10 000 V jusqu'à atteindre un voltage cumulé de 45 000 – 50 000 V.

Après lavage avec de l'eau ultra pure, les bandelettes ont été équilibrées avec un tampon contenant du SDS (Tris-HCl 75 mM, SDS 3 %, Tris base 300 mM) afin de charger négativement toutes les protéines. La première étape de l'équilibration, dite de **réduction** (15 min), a été réalisée en présence de dithiothreitol (DTT) à 65 mM dans le but de bloquer les fonctions thiols, empêchant ainsi la formation de ponts disulfures. La seconde étape de l'équilibration, dite d'**alkylation** (15 min) a été réalisée en présence d'iodoacétamide à 50 mM et de bleu de bromophénol à 0,5 %. L'iodoacétamide prévient la ré-oxydation des protéines au cours de l'électrophorèse et alkyle l'agent réducteur (DTT) en excès, minimisant ainsi les traces verticales en 2nde dimension. Le bleu de bromophénol permet de suivre le front de migration de 2nde dimension.

Tableau III.1 Préparation et composition du gel d'acrylamide à 12% utilisé pour la 2nde étape de l'électrophorèse bidimensionnelle (SDS-PAGE).

Solution	Volume pour 1 gel de 23x23x0,3 cm
Acrylamide 30,8% (Duracryl)	19,54 mL
Tampon Tris-Base (1,5 M, pH 8,8)	12,5 mL
Eau ultra pure	17,25 mL
SDS à 10% (p/v)	500 µL
Laisser 10 minutes à 30°C	
APS à 10% (p/v)	125 µL
TEMED	25 µL
Polymérisation en 1 heure	

Tableau III.2 Méthode de coloration au nitrate d'argent selon Blum *et al*. (1987) utilisée pour la révélation des protéines séparées en électrophorèse bidimensionnelle.

Étapes	Solutions de traitement	Durée de traitement
Fixation	Méthanol 50% (v/v), acide acétique glacial 12% (v/v), 0,5 µg.mL^{-1} formaldéhyde 37%	1 h au minimum
Lavages	Éthanol 50% (v/v)	3 fois 2 min
Prétraitement	0,2 mg.mL^{-1} $Na_2S_2O_3$,5H_2O	1 min
Lavages	Eau ultra pure	3 fois 20 sec
Imprégnation	2 mg.mL^{-1} $AgNO_3$, 0,75 µg.mL^{-1} formaldéhyde 37%	20 min
Lavages	Eau ultra pure	3 fois 20 sec
Révélation	60 mg.mL^{-1} Na_2CO_3, 4 µg.mL^{-1} $Na_2S_2O_3$,5H_2O, 0,5 µg.mL^{-1} formaldéhyde 37%	2 min
Lavages	Eau ultra pure	3 fois 30 sec
Arrêt	Méthanol 50% (v/v), acide acétique glacial 12% (v/v)	20 min

Seconde dimension (SDS-PAGE)

Au cours de cette étape, les polypeptides chargés négativement sont séparés selon leur poids moléculaire par le maillage du gel de polyacrylamide. La 2nde dimension a été réalisée sur des gels contenant 12 % de Duracryl (polymère d'acrylamide modifié à résistance mécanique élevée; Proteomic Solutions) dont la composition est indiquée dans le tableau III.1. La solution d'ammonium persulfate et le TEMED (N, N, N', N'-tétraméthyléthylène diamine) permettent respectivement d'initier et de catalyser la polymérisation des gels. Les gels ont été coulés entre des plaques de verre de 23 x 23 x 0,3 cm et déposés dans la cuve à électrophorèse (système GE Healthcare). La base des gels est placée dans du tampon de migration Tris/SDS/Glycine 1X (2,5 mM/0,01 %/19,2 mM, pH 8,8) et le haut des gels est recouvert par du tampon Tris/SDS/Glycine 2X (5 mM/0,02 %/38,4 mM, pH 8,8). Après dépôt des bandelettes au sommet des gels, la migration a été lancée durant près de 4h30 à température ambiante (300 V, 150 mA, 150 W) et a été arrêtée lorsque le bleu de bromophénol est arrivé à la base des gels.

E – 2.c Coloration et analyses des gels

Les protéines séparées par 2-DE ont été révélées par coloration au nitrate d'argent en suivant la méthode de Blum *et al.* (1987), décrite dans le tableau III.2. Les gels ont ensuite été scannés à l'aide du ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (Perkin Elmer) pour être analysés par le logiciel Progenesis SameSpots v3.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK). Les gels ont d'abord été alignés afin de corriger les différences de migration et de séparation et les quatre réplicats de chaque traitement ont été regroupés pour permettre l'analyse statistique. Les spots identifiés automatiquement par le logiciel sont ensuite validés manuellement. Après soustraction du bruit de fond, le volume de chaque spot est normalisé permettant ainsi de comparer les spots entre les traitements. Les spots protéiques spécifiquement induits ou réprimés en réponse à la limitation en S ont ensuite été analysés par spectrométrie de masse (LC MS/MS).

E – 2.d Séquençage des protéines d'intérêt par LC MS/MS

L'identification des protéines a été réalisée par la plate-forme de Protéomique de l'IFR MP 23 de Rouen. Une chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) permet de mesurer la masse des peptides issus de l'hydrolyse trypsique des protéines et de fragmenter ces mêmes peptides pour accéder à leur structure.

Les spots protéiques excisés ont été lavés plusieurs fois avec une solution de NH_4HCO_3 puis déshydratés avec de l'acétonitrile et séchés dans un évaporateur-concentrateur pendant quelques minutes. La digestion enzymatique par la trypsine a été réalisée grâce à un digesteur automatique (MultiPROBE II, PerkinElmer). La solution de trypsine 15 $ng.\mu L^{-1}$ (Promega), préparée dans du NH_4HCO_3 à 20 mM, est alors ajoutée sur les morceaux de gel pour une incubation à 37 °C sous agitation toute la nuit. L'échantillon est repris dans une solution d'extraction des peptides (20 µL d'acétonitrile 20 mM et 20 µL de NH_4HCO_3 20 mM).

Après digestion par la trypsine, les extraits peptidiques ont été resuspendus dans 10 µL d'une solution aqueuse contenant 5 % (v/v) d'acétonitrile et 0,2 % (v/v) d'acide formique. Pour l'analyse nanoLC-MS/MS, 5 µL de l'échantillon ont été injectés dans le système de nanochromatographie (Ultimate, Dionex, Voisins-le-Bretonneux). Les peptides ont été enrichis et dessalés sur une colonne de pré-concentration et séparés sur une colonne C18 (Pepmap C18, diamètre interne 75 µm). Un gradient linéaire de 10 à 45 % d'acétonitrile dans 0,2 % d'acide formique a été programmé pendant 45 minutes à un débit de 200 $nL.min^{-1}$. L'éluât a été analysé à l'aide d'un système Q-Trap (Applied Biosystems) équipé d'une source nanospray. Les ions entrant dans le spectromètre de masse sont analysés en continu. Lorsqu'un peptide est détecté, le balayage passe en mode MS/MS afin d'obtenir son spectre de fragmentation.

Les spectres MS/MS ont été générés par le logiciel Data Analysis for 6300 series Ion Trap LC/MS (v3.4; Bruker Daltonique). Pour l'identification des protéines, les séquences peptidiques ont été comparées aux bases de données contenant des digestats protéiques théoriques (NCBInr (*viridiplantae*) et de *Brassica* EST (*Brassica* Genome Gateway 2007 ; http://brassica.bbsrc.ac.uk/) en utilisant l'outil bioinformatique MASCOT (http://www.matrixscience.com/) et son module dédié à l'analyse de spectres MS/MS. Au moins deux peptides présentant un score supérieur à 53, définis par MASCOT, sont requis pour considérer l'identification comme étant positive. Les spectres de chaque peptide sont vérifiés manuellement.

E – 3 Analyse du protéome de la graine mature en réponse à une restriction de l'apport de S aux stades GS32 (début de montaison), GS53 (inflorescence principale dégagée) et GS70 (chute des premiers pétales).

L'analyse du protéome de la graine mature en réponse à une restriction de l'apport de sulfate aux stades GS32, GS53 et GS70 a été effectuée en collaboration avec le Dr. Karine Gallardo (UMR LEG, INRA de Dijon).

E – 3.a Extraction et dosage des protéines totales

L'extraction des protéines totales de graines matures a été réalisée à partir de 10 mg de matière fraiche broyée (n = 6 pour le control, n = 4 pour les traitements LS70, LS53 et LS32), selon un protocole décrit par Gallardo *et al.* (2002a). Après 1 h d'incubation dans le tampon d'extraction [Urée 7,4 M, thiourée 2,1 M, CHAPS 62 mM, DTT 8 mM, Triton X-100 0,24 %, Trizma base 16,5 mM, Trizma HCl 21 mM, DNaseI 60 units.mL^{-1} (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne), RNaseA 5,8 Kunitz, inhibiteurs de protéases "complete Mini" de Roche Diagnostics], les extraits ont été centrifugés deux fois à 20 000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Les concentrations en protéines des surnageants ont ensuite été déterminées par la méthode de Bradford (1976), en utilisant la BSA comme standard.

E – 3.b Electrophorèse bidimensionnelle (2-DE)

Première dimension (IEF)

L'isoéléctrofocalisation (IEF) a été réalisée en utilisant des bandelettes formant un gradient non linéaire de pH de 3 à 10 (Immobiline DryStrip, 24 cm; GE Healthcare/Amersham Biosciences), à partir de 250 µg de protéines totales dans un volume ajusté à 460 µL avec le tampon de réhydratation [Urée 7 M, thiourée 2 M, CHAPS 65 mM, DTT 20mM, pharmalytes pH 3-10 0,5 % (v/v), triton X-100 2 % (v/v)], selon le protocole décrit par Gallardo *et al.* (2007). Les bandelettes ont été réhydratées en présence des extraits protéiques dans le système IPGphor (GE Healthcare/Amersham Biosciences) pendant 7 heures à 20 °C. L'IEF a été réalisée à 20 °C dans le système IPGphor pendant 7 heures à 50 V, 1 heure à 350V, 3 h à 3 500 V et 7 h à 8000 V. Avant la 2nde dimension, chaque bandelette a été incubée à température ambiante 15 minutes dans 15 mL de tampon d'équilibration contenant du DTT (Urée 6 M, bis-tris 150 mM, glycérol 30 %, SDS 2,5 %, DTT 26 mM), puis 15 minutes dans 15 mL de tampon d'équilibration contenant de l'iodoacétamide (Urée 6 M, bis-tris 150 mM, glycérol 30 %, SDS 2,5 %, iodoacétamide 220 mM), comme décrit par Gallardo *et al.* (2002a).

Seconde dimension (SDS-PAGE)

La 2nde dimension a été réalisée sur le système Isodalt (Amersham Pharmacia Biotech) selon le protocole décrit par Gallardo *et al.* (2002a) en utilisant des gels de polyacrylamide à 10 % [acrylamide 10 % (v/v), pipérazine diacrylamide 0,33 % (p/v), Trizma base 0,18 M, HCl 166 mM, ammonium persulfate 0,07 % (p/v), TEMED 0,035 % (v/v)] de 24 x 18 cm. Une solution de dénaturation contenant du SDS [agarose de bas point de fusion 1 % (p/v) (In-Vitrogen, Cergy-Pontoise, France), SDS 0,4 % (p/v), bis-Tris 0,15 M, HCl 0,1 M) a été déposée sur les bandelettes disposées au sommet des gels. Après solidification de l'agarose, l'électrophorèse a été lancée à 10 °C dans un tampon (pH 8,3) contenant 25 mM de Trizma base, 200 mM de taurine et 0,1 % (p/v) de SDS, pendant 1 heure à 35 V et 14 heures à 75 V (système Isodalt, Amersham Pharmacia Biotech).

E – 3.c Coloration et analyses des gels

Les gels ont été colorés avec du bleu de Coomassie G250 (Bio-Rad, Marne la Coquette, France) selon un protocole décrit par Mathesius *et al.* (2001). Après la 2nde dimension, les gels ont été rincés à l'eau ultra pure pendant 3 min avant d'être colorés pendant 3 jours dans une solution contenant 10 % (p/v) de sulfate d'ammonium, 2 % (p/v) d'acide phosphorique, 0,1 % (p/v) de bleu de Coomassie G250 (Bio-Rad, Marne la Coquette, France). La coloration a été suivie par un lavage de 3 minutes dans une solution Tris/acide phosphorique (0,1 M ; pH 6,5) et par un lavage de 30 secondes dans une solution de méthanol 25 % (v/v). Ces lavages ont été suivis par une étape de décoloration de 24 heures dans une solution à 20 % (p/v) de sulfate d'ammonium.

L'acquisition des images des gels a été réalisée en utilisant le système d'imagerie infrarouge Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) à 700 nm avec une résolution de 169 µm. Les analyses d'images et la quantification du volume des spots protéiques ont été réalisées avec le logiciel SameSpots v3.0 Progenesis (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) selon les recommandations du fabricant.

E – 3.d Séquençage des protéines d'intérêt par LC MS/MS

Les spots protéiques excisés ont été traités par la plate-forme de Protéomique de l'IFR MP 23 de Rouen de façon similaire au protocole décrit § E – 2.d. Dans cette partie, les résultats de l'analyse protéomique et l'identification des protéines ont été incorporés dans la base de données PROTICdb (Ferry-Dumazet *et al.*, 2005). Une application disponible en

ligne permet de stocker et de consulter l'ensemble des informations relatives à l'analyse protéomique (http://moulon.inra.fr/protic/sms).

Les identifications ont été réalisées à l'aide du programme X!Tandem, développé par la « Global Proteome Machine organisation » (http://www.thegpm.org/). Les séquences peptidiques ont été comparées à la base de données NCBI filtrée pour les entrées *viridiplantae* (version du 02/11/2012; 1945867 entrées). Les protéines identifiées ont été sélectionnées à l'aide du programme X!Tandem pipeline (http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline/) avec les critères suivants: i) un minimum de deux peptides différents avec une Evalue inférieure à 0,05 et ii) une log(Evalue) pour la protéine (*i.e.* logarithme du produit des Evalue peptidiques) inférieure à -4. Les protéines identifiées pour le spot 233 ont été filtrées sur la base d'un seul peptide et une log(Evalue) pour la protéine inférieure à -1. Ces critères plus permissifs ont été retenus en raison de la petite taille de la protéine identifiée (79 AA), qui réduit le nombre de peptides générés.

F Détermination des teneurs en huile, en protéines et en glucosinolates et analyse de la composition lipidique des graines

Les analyses de la qualité grainière ont été réalisées en collaboration avec Nathalie Nési et Véronique Gautier (IGEPP, INRA du Rheu).

F – 1 Détermination des teneurs en huile, en protéines et en glucosinolates par Near InfraRed Spectroscopy (NIRS)

Comme précédemment décrit par Dubousset *et al.* (2010), les échantillons ont été analysés à l'IGEPP de Rennes à l'aide d'un spectromètre proche infrarouge monochromator NIRSystem model 6500 (FOSS NIRSystem Inc, Silver Spring, MD) en mode réflectance et équipé d'un module de transport. Environ 5 g de graines matures sèches et intactes ont été placés dans une coupelle standard et scannés. Les résultats ont été 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 mesures ont été réalisées pour chaque échantillon.

F – 2 Extraction et quantification de l'huile et détermination de la composition lipidique

F – 2.a Extraction des lipides et dérivatisation des acides gras

Après extraction des lipides de graines matures sèches de colza, les acides gras ont été méthylés en milieu acide et extraits à l'hexane pour être ensuite analysés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse. Pour chaque échantillon, trois aliquotes de 10 mg de graines matures sèches et broyées ont été transférées dans des tubes en verre contenant 1,32 mL de solution d'extraction fraîchement préparée (méthanol/acide sulfurique/toluène, 100v/2,5v/30v) et 400 µg.mL^{-1} d'acide heptadécanoïque (C17:0). L'acide heptadécanoïque, absent chez les plantes, est employé comme étalon interne pour la quantification. Les tubes sont fermés hermétiquement à l'aide de bouchons à vis garnis de Teflon et agités vigoureusement 30 secondes avant d'être incubés à 95 °C pendant 1 heure. La réaction d'estérification des acides gras est arrêtée par incubation pendant 10-15 minutes sur glace pilée. Après ajout de 1 mL d'eau et de 500 µL d'hexane suivi d'une agitation vigoureuse et d'une centrifugation (850 *g*, 5 min, 4 °C), la phase organique, contenant les esters méthyliques d'acides gras, a été récupérée pour être analysée par chromatographie en phase gazeuse.

F – 2.b Chromatographie en phase gazeuse

Les esters méthyliques d'acides gras ont été séparés par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne DB-WAX de 30 m x 0,25 mm x 25 µm (Agilent Technologies) à partir d'1 µL d'extrait, avant d'être détectés et quantifiés par ionisation de flamme. La chromatographie en phase gazeuse, réalisée sur l'appareil GC 6890N (Agilent Technologies) équipé d'un injecteur automatique et d'un passeur de 100 échantillons, a été effectuée dans les conditions suivantes : températures fixées à 220 °C pour la colonne, 250 °C pour l'injecteur et 260 °C pour le détecteur. L'hydrogène a été utilisé comme gaz vecteur à une pression de 100 kPa avec un débit de fuite de 100 mL.min^{-1}. Le pilotage et le traitement des données issues des analyses brutes ont été réalisés à l'aide du logiciel GC Chemstation (Agilent Technologies).

La quantité de chaque acide gras présente dans l'échantillon a été déterminée en comparant l'aire du pic correspondant sur le chromatogramme à l'aire du pic associé au C17:0 dont la quantité présente dans l'extrait est connue précisément.

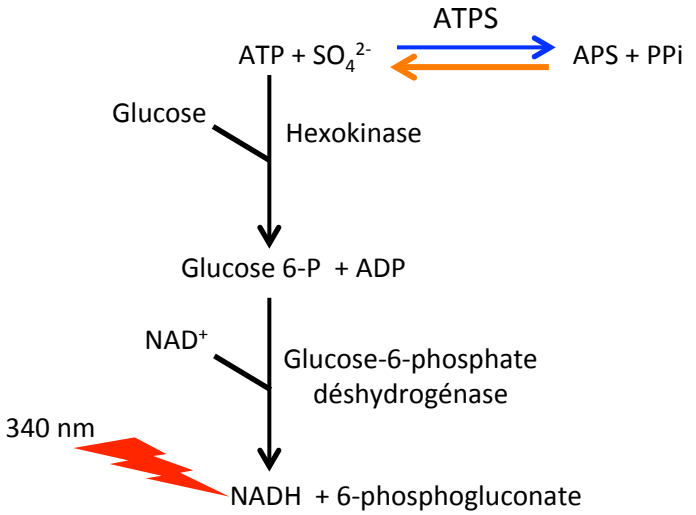


Figure III.7 Représentation schématique de la méthode utilisée pour la mesure d'activité ATP sulfurylase (ATPS).

La flèche bleue représente l'activité ATPS *in planta*, responsable de l'activation du sulfate (SO_4^{2-}) en APS, qui sera ensuite assimilé par les voies réductrices et non réductrices (Figure II.8). L'activation du sulfate en APS est une réaction endergonique nécessitant de l'ATP (Leustek & Saito, 1999). *In vitro*, l'ATPS catalyse de façon spontanée la réaction opposée, représentée par la flèche orange, générant de l'ATP et du sulfate à partir d'APS et de pyrophosphate. L'ATP produit par cette réaction permet la production de NADH par le système hexokinase/glucose-6-phosphate déshydrogénase en présence de glucose et de NAD^+ (Burnell *et al.,* 1984). La production de NADH est alors quantifiée pendant 3 minutes par spectrophotométrie à 340 nm.

Tableau III.3 Composition de la solution utilisée pour les mesures d'activités ATPS.

Solution	**Volume par échantillon (Volume final = 230 µL)**
H_2O	152,5 µL
Tris/HCl 1 M (pH 8)	15 µL
$MgCl_2$ 0,1 M	15 µL
D-glucose 0,1 mM	15 µL
NAD^+ 6 mM	15 µL
APS 3,75 mM	7,5 µL
Hexokinase de *Saccharomyces cerevisiae* de Type III 1 $u.\mu L^{-1}$	5 µL
Glucose-6-phosphate déshydrogenase 1 $u.\mu L^{-1}$	5 µL

G Mesures des activités enzymatiques ATPS et APR dans la graine de colza en développement

Les mesures d'activités ATPS et APR ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Stanislav Kopriva (John Ines Centre, Norwich, Grande-Bretagne).

G – 1 Préparation de l'extrait protéique

Les protéines ont été extraites à partir de 20 mg de matière fraiche de graines broyées. Les aliquotes ont été homogénéisées dans 300 µL de tampon d'extraction (50 mM $NaKPO_4$ (pH8), 30 mM Na_2SO_3, 500 µM AMP, 10 mM DTT). Après centrifugation (4 200 *g*, 1 min, 4 °C), les surnageants contenant les protéines extraites ont immédiatement été utilisés pour les mesures d'activités ATP sulphurylase (ATPS) et adénosine 5'-phosphosulphate réductase (APR). La concentration en protéines des extraits a été déterminée par la méthode de Bradford (1976) en utilisant la BSA comme standard.

G – 2 Mesure de l'activité ATPS

L'ATPS, 1ère enzyme de l'assimilation du sulfate, est responsable de la formation d'adénosine 5'-phosphosulphate (APS) à partir d'ATP et de sulfate. Pour la mesure de l'activité ATPS *in vitro*, la réaction opposée est utilisée, générant de l'ATP et du sulfate en présence d'APS et de pyrophosphate inorganique (Leustek & Saito, 1999). L'ATP produit par cette réaction est ensuite dosé par l'intermédiaire d'un système hexokinase/glucose-6-phosphate déshydrogénase en présence de glucose et de NAD (Burnell, 1984). La production de NADH en fonction du temps, proportionnelle à la production d'ATP est ensuite quantifiée par spectrophotométrie (Figure III.7).

Afin de mesurer l'activité ATPS, 40 µL d'extrait protéique ont été homogénéisés dans les puits d'une microplaque à 96 puits à fond plat avec 230 µL de solution dont la composition est indiquée dans le tableau III.3. L'absorbance – correspondant au bruit de fond – a alors été lue à 340 nm pendant 3 minutes, une mesure étant réalisée toutes les 10 secondes. Immédiatement après l'addition de 30 µL de sodium pyrophosphate à 10 mM, l'absorbance est à nouveau lue dans les mêmes conditions. L'activité ATPS, exprimée en $nmol.min^{-1}.mg\ de\ protéines^{-1}$, a été calculée après soustraction du bruit de fond par l'équation suivante :

$$Activité\ ATPS = \frac{\frac{\Delta Abs}{\Delta t} - \frac{\Delta Abs_{bruitdefond}}{\Delta t_{bruitdefond}}}{c_{prot} \times V}$$

Tableau III.4 Composition de la solution contenant l'adenosyl 5' phosphosulfate marqué au ^{35}S (^{35}S-APS) utilisée pour les mesures d'activités APS réductase (APR).

Solution	Volume par échantillon (Volume final = 240 µL)
Tris/HCl 1 M (pH9)	25 µL
$MgSO_4$ 2 M	100 µL
DTT 0,2 M	10 µL
^{35}S-APS 3,75 mM	5 µL
H_2O	100 µL

Où Δt correspond au temps de réaction

ΔAbs correspond à la différence d'absorbance à 340 nm de l'extrait au cours de la réaction pendant Δt

$\Delta t_{bruitdefond}$ correspond au temps de mesure du bruit de fond

$\Delta Abs_{bruitdefond}$ correspond à la différence d'absorbance à 340 nm du bruit de fond pendant $\Delta t_{bruitdefond}$

c_{prot} est la concentration en protéines de l'extrait ($mg.mL^{-1}$)

V est le volume d'extrait protéique engagé dans la réaction (mL)

G – 3 Mesure de l'activité APR

La mesure de l'activité APR, décrite par Brunold & Suter (1990), fait appel à l'isotope radioactif du S, le ^{35}S. L'APS marqué au ^{35}S apporté à l'extrait enzymatique est transformé en sulfite par l'APR en présence de DTT, fournissant le pouvoir réducteur nécessaire à la réaction. Le sulfite produit est ensuite volatilisé en condition acide et récolté dans une cuve à scintillation pour en mesurer la radioactivité.

Cette mesure a été réalisée dans des tubes sans bouchon à partir de 10 µL d'extrait homogénéisés en présence de 240 µL de solution contenant l'APS marqué au ^{35}S dont la composition est indiquée dans le tableau III.4. Les extraits ont immédiatement incubé 30 minutes à 37 °C, avant l'arrêt de la réaction par addition de 100 µL de Na_2SO_3 1M. Les tubes ont alors été transférés dans des flacons à scintillation contenant 1 mL de triethanolamine 1M. La volatilisation du sulfite a ensuite été effectuée par addition de 200 µL d'acide sulfurique 1M dans chaque tube. Les flacons ont été fermés hermétiquement à l'aide de bouchons à vis avant d'être incubés à température ambiante pendant une nuit. Après retrait et élimination des tubes des flacons à scintillation et ajout de 2,5 mL de cocktail à scintillation (OptiPhase 'HiSafe' 3, Perkin Elmer), les flacons ont été fermés hermétiquement et mélangés vigoureusement avant d'en mesurer la radioactivité. Un flacon à scintillation contenant 1 mL de triethanolamine 1M, 5 µL de ^{35}S-APS à 3,75 mM et 2,5 mL de cocktail à scintillation a servi de standard pour la détermination de l'activité APR.

L'activité APR, exprimée en $nmol.min^{-1}$.mg de protéines^{-1}, a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$Activité\ APR = \left(\frac{18{,}75 \times cpm}{cpm_{standard} \times c_{prot} \times V}\right)$$

Où cpm correspond à la radioactivité du ^{35}S-sulfite produit par l'extrait protéique

$cpm_{standard}$ correspond à la radioactivité du standard (5 µL de ^{35}S-APS à 3, 75 mM)

c_{prot} est la concentration en protéines de l'extrait (mg.mL^{-1})

V est le volume d'extrait protéique engagé dans la réaction (mL)

H Analyse de l'expression des gènes

H – 1 Extraction des ARN$_{totaux}$ et reverse transcription (RT)

Les ARN$_{totaux}$ ont été extraits à partir de 80 mg de masse fraiche de racines en utilisant le kit Mini Kit RNeasy from Qiagen (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fabricant. Les échantillons congelés ont été homogénéisés au vortex en présence de 450 µL de tampon de lyse, contenant du thiocyanate de guanidine, durant toute la durée de leur décongélation. Les lysats ont ensuite été transférés sur des colonnes QIAshredder puis centrifugés 2 minutes à 10 000 rpm. Les filtrats ont alors été récupérés, additionnés de 225 µL d'éthanol absolu puis déposés sur des colonnes RNeasy, avant d'être centrifugés 15 secondes à 10 000 rpm. Les colonnes ont été lavées par l'ajout de 350 µL de tampon (RW1) puis centrifugation (10 000 rpm, 15 sec). Les colonnes ont alors incubé 15 minutes à température ambiante en présence de 80 µL de mix contenant de la DNAse, avant d'être à nouveau lavées par l'ajout de 350 µL de tampon (RW1) et centrifugation (10 000 rpm, 15 sec). Les colonnes ont ensuite été lavées à deux reprises par l'ajout de 500 µL de tampon (RPE) et centrifugation (10 000 rpm, 2 min). Après cette étape, les colonnes ont été placées dans de nouveaux tubes et éluées avec 15 µL d'eau stérile sous centrifugation (10 000 rpm, 1 min), suivie d'une nouvelle élution avec 10 µL d'eau stérile sous centrifugation (10 000 rpm, 1 min). Les ARN$_{totaux}$ ont ensuite été quantifiés par spectrophotométrie (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) à 260 nm (une unité d'absorbance à 260 nm = 40 µg.mL^{-1} d'ARN).

La qualité des ARN$_{totaux}$ extraits a été vérifiée sur gel. À 1 µg d'ARN contenu dans un volume de 5 µL ajusté avec de l'eau stérile sont ajoutés 5 µL de tampon de charge (bleu de bromophénol 0,025 % (p/v), xylène cyanole 0,025 % (p/v), glycérol 3 % (v/v), bromure

Tableau III.5 Séquences nucléotidiques des couples d'amorces utilisées pour la PCR quantitative (Q-PCR).

Les gènes *BnSultr1;1* et *BnSultr1;2* codent pour des transporteurs de sulfate responsables de l'absorption racinaire de sulfate. Le.s gènes *EF1α,* codant le facteur d'élongation 1α, et *18S*, codant l'ARNr 18S, ont été utilisés comme références. Le numéro d'accession des gènes et la températures de fusion des amorces (Tm) sont indiqués.

Gènes	N° d'accession	Couple d'amorces	Tm
EF1α	DQ312264	Sens 5'-GCCTGGTATGGTTGTGACCT-3' Anti-sens 5'-GAAGTTAGCAGCACCCTTGG-3'	84 °C
18S	X16077	Sens 5'-CGGATAACCGTAGTAATTCTAG-3' Anti-sens 5'-GTACTCATTCCAATTACCAGAC-3'	87 °C
BnSultr 1;1	AJ416460	Sens 5'-AGATATTGCGATCGGACCAG-3' Anti-sens 5'-GAAAACGCCAGCAAAGAAAG-3'	86 °C
BnSultr 1;2	AJ311388	Sens 5'-GGTGTAGTCGCTGGAATGGT-3' Anti-sens 5'-AACGGAGTGAGGAAGAGCAA-3'	83 °C

d'éthidium 0,025 % (p/v), MOPS 1X, formamide désionisé 615 µL.mL^{-1} et formaldéhyde 188 µL.mL^{-1}). Après dénaturation (9 min à 70 °C), les ARN totaux sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % et visualisés sous UV.

La synthèse des ADNc simple brin par reverse transcription (RT) est réalisée à l'aide du kit « IScript cDNA synthesis » (Bio-Rad) selon les instructions du fabricant : à 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_{15})) et 0,5 µL d'enzyme Reverse transcriptase. Le mélange est incubé (5 min à 25 °C puis 30 min à 42 °C et enfin 5 min à 85 °C) pour stopper la réaction enzymatique.

H – 2 Analyse de l'expression des gènes par PCR quantitative (Q-PCR)

Les séquences nucléotidiques des couples d'amorces utilisés pour la Q-PCR sont indiquées dans le tableau III.5. Pour chaque gène, la réaction de Q-PCR a été 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). Une Taq polymérase de type Hot Start polymérase, associée à un anticorps qui rend l'enzyme inactive a été utilisée. La PCR commence donc par une étape de chauffage de 3 minutes à 95 °C ayant pour but de rompre la liaison entre l'enzyme et l'anticorps et d'activer ainsi la Taq polymérase. Un programme de 35 cycles comprenant les étapes suivantes est réalisé : une étape de dénaturation (15 sec, 95 °C) et une étape d'hybridation/élongation (1 min, 60 °C). À chaque fin de cycle, une lecture de la fluorescence est effectuée. À l'issue des 35 cycles, un protocole de dissociation thermique (de 65 °C à 95 °C avec un incrément de 0,2 °C.s^{-1}) des produits d'amplification est réalisé dans le but d'établir la courbe de fusion des produits de PCR générés et de s'assurer de la spécificité de l'amplification. Le niveau d'expression relative des gènes d'intérêt est calculé en utilisant la méthode des « delta-delta de Ct ».

H – 3 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» (ΔΔCt). Elle repose également sur l'utilisation de gènes de référence (*EF1α* et *18S*) dont nous avons vérifié que l'expression n'était pas modulée par les traitements. L'expression relative du gène étudié est déterminée en utilisant l'équation suivante :

$$Expression\ relative = 2^{-(\Delta Ct\ sample\ -\ \Delta Ct\ témoin)}$$

Où ΔCt = Ct_{BnSultr} - $Ct_{\text{reference genes}}$

et Ct désigne le cycle de seuil déterminé pour chaque gène dans la phase exponentielle d'amplification.

Par définition, l'expression relative du gène cible de l'échantillon témoin est égale à (2^0), c'est-à-dire 1 (Livak & Schmittgen, 2001).

I Exploitation statistique des données

Les résultats sont exprimés par les moyennes des valeurs obtenues pour l'ensemble des répétitions biologiques (*n* = 3 au minimum) ± les erreurs standards (SE).

Les analyses statistiques ont été réalisées sur différents logiciels [Microsoft® Excel 2008/XLSTAT©-Pro (Version 7.2, 2003, Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA) ; Microsoft® Excel 2011/XLSTAT©-Pro (Version 2013.3.01, Addinsoft, Inc.)]. La normalité de la distribution des valeurs ne pouvant pas être déterminée avec un nombre de répétitions biologiques aussi limité, les différents traitements étudiés ont été généralement comparés ($p < 0.05$) par les tests non paramétriques de Wilkoxon, lorsque les échantillons comparés sont appariés, et de Mann-Withney, lorsque les échantillons comparés sont indépendants. Les résultats des ANOVA réalisées de manière automatique par le logiciel d'analyse de gels de 2-DE Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) ont été vérifiés par le test de Mann-Withney ($p < 0.05$).

Dans le cas des expérimentations menées dans le Chapitre VIA dont le dispositif expérimental est décrit § A – 3.b, les données obtenues ont été comparées par le test de Student ($p < 0.05$).

Chapitres IV à VII

Résultats

Chapitre IV

Sulphur limitation provokes physiological and leaf proteome changes in oilseed rape that lead to perturbation of sulphur, carbon and oxidative metabolisms

Hypothèse : Une restriction de l'apport de S pourrait affecter le métabolisme et la physiologie des jeunes feuilles.

Objectifs : Les objectifs consistaient à i) identifier les modifications physiologiques survenant en réponse à une limitation en S au stade rosette chez le colza d'hiver et ii) déterminer si des modulations de l'expression de protéines au niveau de ces jeunes feuilles pourraient être à l'origine des modifications physiologiques et métaboliques survenant en réponse à une restriction de l'apport de S.

Démarche expérimentale : Des colzas d'hiver (cv. Capitol) ont subit une restriction de l'apport de sulfate au stade rosette. Une étude en cinétique des paramètres physiologiques (activité photosynthétique, teneurs en chlorophylles et en anthocyanes…) a été réalisée au cours de la période de restriction en sulfate. L'analyse protéomique d'une jeune feuille a été effectuée par éléctrophorèse bidimensionnelle (2-DE) à une date correspondant à l'apparition des premiers impacts physiologiques.

Résultats : La restriction en S provoque une réduction de l'activité photosynthétique des jeunes feuilles sans entrainer de diminution de la teneur en chlorophylle, qui reste semblable aux plantes témoins. L'accumulation d'anthocyanes et l'augmentation des teneurs en H_2O_2 dans les jeunes feuilles des plantes limitées en S suggèrent que la restriction en S mène à un stress oxydatif. Certaines protéines impliquées dans le métabolisme photosynthétique sont modulées en cas de restriction en S. La réduction de l'expression de la plastocyanine et de la ferrédoxine-NADP réductase suggère que l'accumulation d'H_2O_2 est associée à une perturbation de la chaine de transfert d'électrons thylakoïdale. L'augmentation de l'expression de la Cu-Zn SOD chloroplastidiale renforce l'idée qu'un stress oxydatif survient probablement dans le chloroplaste. Les résultats de l'analyse protéomique suggèrent que le maintien des teneurs en chlorophylle dans des conditions de limitation en S est lié à une accumulation de Water Soluble Chlorophyll binding Proteins, protéines impliquées dans la protection de la chlorophylle contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'accumulation de la sous-unité catalytique de l'ATP synthase chloroplastidiale suggère que la production d'énergie est maintenue.

Chapitre IV : Sulphur limitation provokes physiological and leaf proteome changes in oilseed rape that lead to perturbation of sulphur, carbon and oxidative metabolisms

D'Hooghe Philippe, Escamez Sacha, Trouverie Jacques, Avice Jean-Christophe

UMR INRA-UCBN 950 Écophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions NCS, Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée, Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, CS 14032, F-14032, Caen Cedex, France

Keywords:

Sulphur limitation, oilseed rape, leaf proteome, carbon metabolism, oxidative stress.

Abstract

Background: The decline in industrial emissions of sulphur (S) has led to a sulphate depletion in soil resulting in an alteration of crop performance. In oilseed rape, an S deficiency dramatically reduced the seed yield and/or quality. Paradoxically, little is known about the impact of sulphate limitation on oilseed rape leaf metabolism, despite it being a key determinant of growth. In order to identify the metabolic processes involved in the oilseed rape response to S restriction, an analysis of the young leaf proteome combined with a physiological study was carried out at the vegetative stage.

Results: S limitation does not significantly reduce the total shoot biomass but inhibits growth and photosynthesis of young leaves. This photosynthesis decline is not due to a decrease in chlorophyll content, which remains similar to Control. The increase in anthocyanins and H_2O_2 content in young leaves of S-limited plants suggests that S restriction leads to an oxidative stress. Proteomic analysis at 35 d of S limitation also revealed the induction of 12-oxophitodienoate reductase and ACC synthase, respectively involved in jasmonate and ethylene biosynthesis, two phytohormones that could be implicated in oxidative stress. Proteins involved in photosynthesis and carbon metabolism were also modulated by S restriction. In particular, the decrease in plastocyanin and ferredoxin–NADP reductase suggests that H_2O_2 accumulation is associated with perturbation of the photosynthetic electron transport chain. The accumulation of chloroplastic Cu-Zn SOD reinforces the idea that an oxidative stress probably occurs in the chloroplast. Proteomic results suggest that the maintenance of chlorophyll in S-limited conditions is related to an accumulation of Water Soluble Chlorophyll binding Proteins, involved in the protection of chlorophyll against ROS. The accumulation of the catalytic α–subunit of chloroplastic ATP synthase suggests that energy production is maintained.

Conclusion: S limitation leads to photosynthesis and carbon metabolism disturbances that could be responsible for the oxidative stress observed in the young leaves of oilseed rape. Despite this, induction of proteins involved in oxidative stress resistance and energy production shows that the leaf capacity to capture and use photosynthetic active radiations for ATP production remains efficient for as long as possible.

A Background

Crop plants take up sulphur (S) mainly in the form of sulphate and assimilate it into many compounds such as cysteine, methionine, glutathione (GSH), co–enzymes and vitamins. In addition, S is present within many plant secondary metabolites possessing various functions in plant metabolism (Leustek & Saito, 1999). Compared with other crops such as cereals or legumes, oilseed rape (*Brassica napus* L.) is particularly sensitive to S limitation because it has a high demand for S (Zhao *et al.*, 1997). The decline in industrial emissions of SO_2 leads to a depletion of sulphate (SO_4^{2-}) in soil, which impacts on oilseed rape growth and on both grain yield and oil quality (Dubousset *et al.*, 2010). Recent transcriptomic and metabolomic approaches have shown that alterations in the expression levels of numerous genes associated with metabolic and physiological changes allow *Arabidopsis thaliana* to respond to S limitation or restriction (Hirai *et al.*, 2003; Nikiforova *et al.*, 2003; Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003; Hirai & Saito, 2004; Nikiforova *et al.*, 2004; Hirai *et al.*, 2004; Nikiforova *et al.*, 2005b,a; Hirai *et al.*, 2005; Nikiforova *et al.*, 2006). First, the limitation of S supply provokes a decrease in cysteine and an increase in O–acetylserine (OAS), its precursor. The accumulation of OAS and the decrease in GSH are then presumed to regulate the expression of numerous genes, such as the induction of genes implicated in S uptake, assimilation and redistribution, improving the acquisition and the utilisation of S for plant growth (Davidian & Kopriva, 2010). Nevertheless, as reported by Rouached *et al.* (2008),these regulatory roles are questioned in the light of a number of experimental outcomes. Oilseed rape is also able to enhance its S remobilisation efficiency to sustain the S demand for growth under S restriction (Parmar *et al.*, 2007; Dubousset *et al.*, 2009; 2010). This is highly related to (i) the level of the SO_4^{2-} pool previously stored in source leaves and (ii) the up–regulation of *BnSultr4;1* and *BnSultr4;2* expression (Dubousset *et al.*, 2009), which are two genes encoding transporters that have been implicated in vacuolar efflux of SO_4^{2-} (Kataoka *et al.*, 2004b). Other sulphate transporter genes in oilseed rape leaves and roots also respond positively to S limitation, leading to an increase in sulphate absorption and transport capacities at the whole plant level (Parmar *et al.*, 2007). In spite of these processes, a lasting S limitation leads to an accumulation of amino acids, which is assumed to down–regulate nitrogen uptake and assimilation, while processes that increase the turnover of organic S compounds and stress defence responses are induced. Severe S

Table IV.1 Total shoot and root dry matter (DM), shoot:root ratio and DM of leaves #11 and 16 of plants subjected to Control and Low S treatments.

		Days of treatment				
		0	14	21	28	35
Shoot DM (g)	**Control**	26.24 ± 2.09	32.86 ± 5.09	44.11 ± 5.20	62.05 ± 4.38	64.69 ± 4.33
	Low S	26.24 ± 2,09	34.02 ± 5.09	43.87 ± 5.20	55.29 ± 4.38	66.48 ± 4.33
Root DM (g)	**Control**	4.42 ± 0.94	7.38 ± 1.90	13.18 ± 5.02	16.06 ± 1.07	15.56 ± 2.11
	Low S	4.42 ± 0.94	11.10 ± 4.04	12.26 ± 3.35	19.20 ± 2.64	19.45 ± 3.22
Shoot/Root ratio	**Control**	6.73 ± 1.32	5.43 ± 1.53	5.11 ± 1.57	3.86 ± 0.02	4.34 ± 0.51
	Low S	6.73 ± 1.32	5.18 ± 2.10	4.67 ± 1.38	3.08 ± 0.52	3.72 ± 0.71
DM of leaf # 11 (g)	**Control**	1.74 ± 0.22	3.31 ± 0.86	3.53 ± 0.31	4.16 ± 0.41	3.11 ± 0.44
	Low S	1.74 ± 0.22	3.17 ± 0.44	3.18 ± 0.32	3.65 ± 0.13	3.81 ± 0.09
DM of leaf # 16 (g)	**Control**	-	-	2.29 ± 0.47	4.51 ± 0.32	4.07 ± 0.63
	Low S	-	-	1.58 ± 0.26	3.31 ± 0.83	3.51 ± 0.56

Data are means ± standard error (SE, *n*=4). None significant difference from the Control was observed.

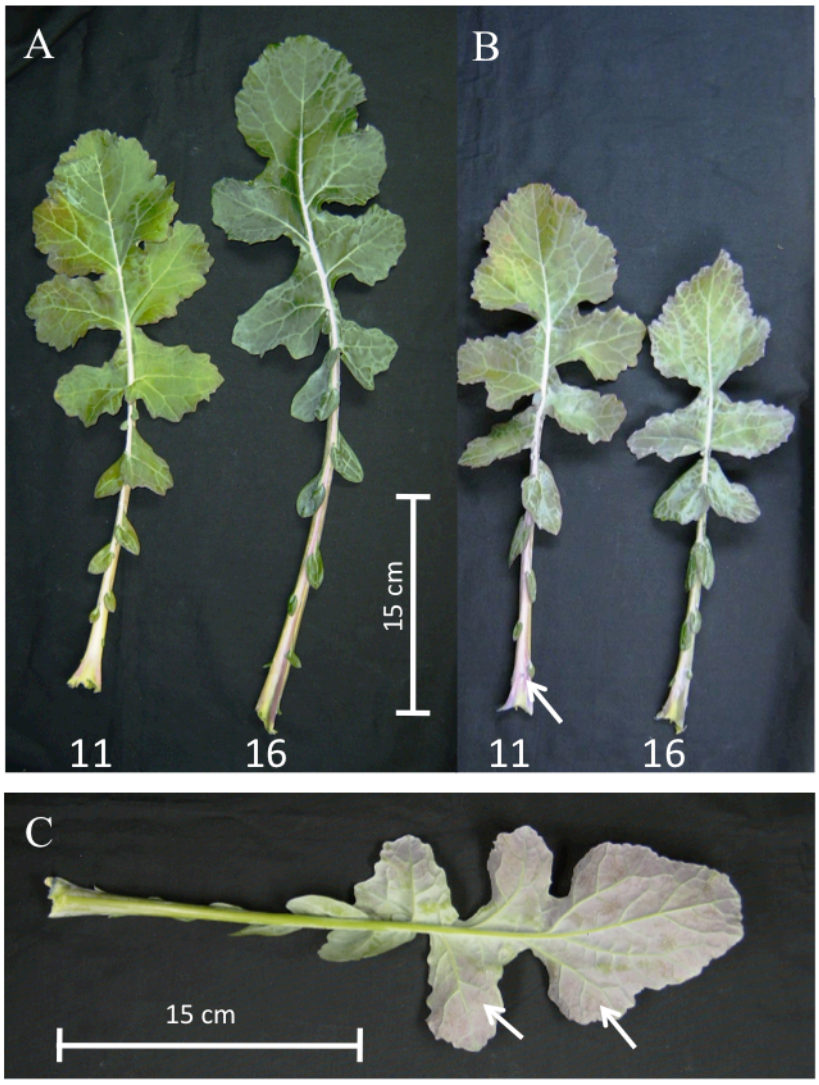


Figure IV.1 Leaves #11 and 16 of a Control plant (panel A) and those subjected to an S restriction (panel B) over 35 d.
The abaxial face of leaf rank #16 of an S-restricted plant (Low S, panel C) and the petiole of leaf rank #11 (panel B) show a violet colour (indicated by white arrows).

limitation can ultimately result in a reduced growth, which is particularly associated with a reduced shoot:root ratio (for review see Hawkesford & De Kok, 2006).

Compared to the numerous results obtained through metabolomic and transcriptomic approaches, studies of proteomic modifications occurring in response to S restriction remain scarce in the *Brassicacea* family. However, this kind of approach has the advantage of integrating the regulation of gene expression, taking into account any post–transcriptional control. Indeed, transcriptome analysis is not sufficient for observing such regulation and does not completely predict the corresponding proteomic profile, especially in allopolyploid species such as oilseed rape. As recently reported by Marmagne *et al.* (2010) in different neo synthesised oilseed rape lines, the majority of genes encoding proteins that exhibit additive gene expression are not expressed additively at the protein level. Such differences between transcription and protein expression could also occur in the case of S limitation, which could partially explain the observed temporal differences between metabolomic and transcriptomic responses (Nikiforova *et al.*, 2004). Additionally, the decrease in cysteine and methionine contents from restriction of S could have an impact on the expression of essential proteins. The effect of S limitation on the proteome was mentioned in regard to *Arabidopsis* by Higashi *et al.* (2006). These authors have reported a significant disruption in the seed proteome in response to a S restriction, such as a reduction in the expression of proteins rich in S–amino acids (At2S3 and At12S3) that was not related to the accumulation of corresponding mRNAs. Therefore, a proteomic approach is particularly relevant in oilseed rape for the study of S limitation impacts on metabolic pathways. In order to address this question on a major oleaginous crop such as oilseed rape, our study aims to determine the leaf proteome modifications caused by a long–term S depletion occurring at the rosette stage (vegetative stage). This proteomic approach was combined with a physiological study to provide new insights about the plant response to S restriction.

B Results

B – 1 Impact of S limitation on physiological parameters

At the rosette stage, the Low S treatment did not affect shoot and root growth significantly, compared to the Control (Table IV.1). However, a slight increase in the shoot:root ratio appeared after 35 d of S restriction (Low S) compared to Control plants. The growth of leaf #11, identified as a young leaf at the beginning of S treatment, and leaf #16,

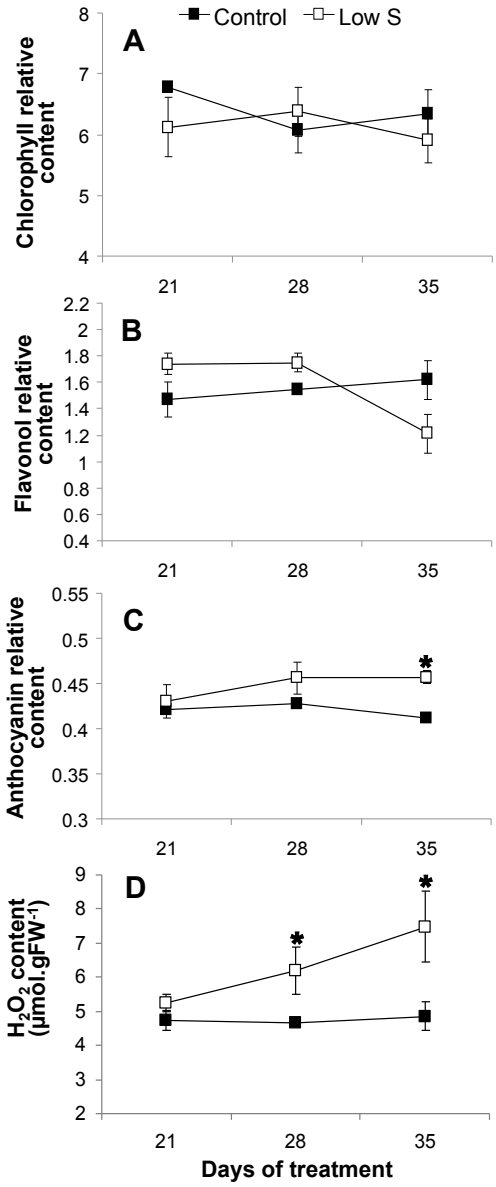


Figure IV.2 Relative contents of chlorophylls (A), flavonols (B), anthocyanins (C) and H_2O_2 content (D) in leaf rank #16 of Control and S-restricted plants (Low S) after 21, 28 and 35 d of treatment.

Data are means ± SE (*n*=3). Vertical bars fit within the symbol if not visible. *: Significant differences from the Control value at p ≤ 0.05.

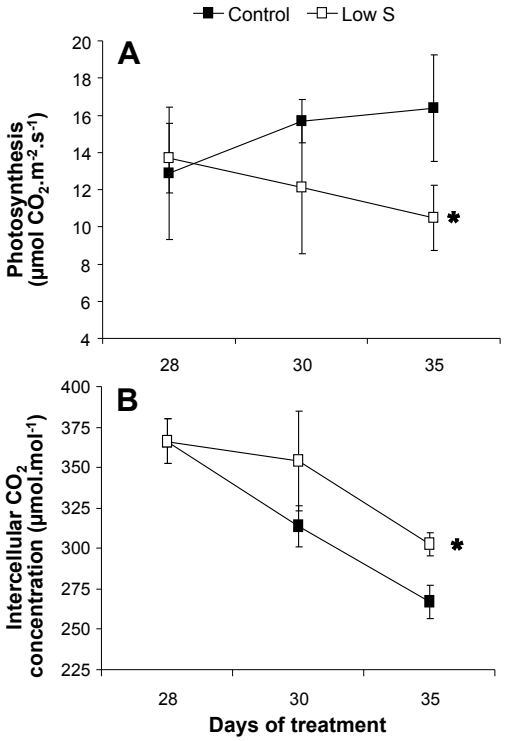


Figure IV.3 Photosynthetic activity (A) and intercellular CO_2 concentration (B) in leaf rank #16 of Control and S–restricted plants (Low S) after 28, 30 and 35 d of treatment.

Data are means ± SE (*n*=3). *: Significant differences from the Control value were at p ≤ 0.05.

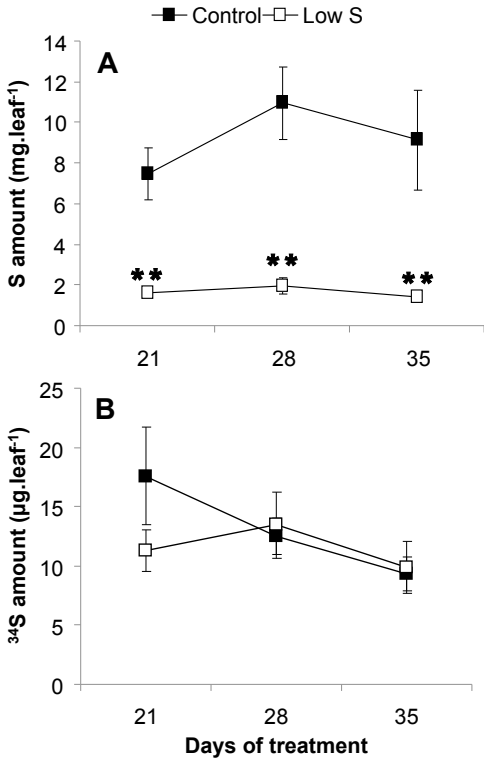


Figure IV.4 Amounts of S (A) and ^{34}S (B) in leaf rank #16 of Control and S–restricted plants (Low S) after 21, 28 and 35 d of treatment.

Data are means ± SE (*n*=3). **: Significant differences from the Control value were at p ≤ 0.01.

which appeared between 14 and 21 d after initiation of treatment, did not differ depending on the level of S supply (Table IV.1). Despite such lack of difference in growth, the length of petioles (Figure IV.1) as well as the biomass of petioles of younger leaves (i.e. above the leaf #16, Table IV.1) were significantly reduced by 35 d of Low S treatment (4.83 ± 0.83 g) compared to the Control (9.69 ± 1.63 g).

There were no significant differences in the chlorophyll and flavonol contents in leaves #11 (data not shown) and #16 (Figure IV.2A and 2B). However, after 35 d of S restriction, a significant increase in the relative anthocyanin content was observed in leaf #16 compared with Control (Figure IV.2C). In particular, this increase was also visible on the abaxial face of leaf #16 of Low S plants, which showed a violet colour that is indicative of anthocyanins at 35 d of S restriction (Figure IV.1C).

A significantly lower photosynthetic activity (Figure IV.3A) and a higher intercellular CO_2 concentration (Figure IV.3B) were also observed in leaf #16 of S restricted plants (Low S) compared to Control after 35 d. The S amounts of leaf #16 at 21, 28 and 35 d of treatment were significantly lower in Low S plants (Figure IV.4A), while the ^{34}S quantities did not differ in this leaf between the two considered treatments (Figure IV.4B).

In order to evaluate the impact of S restriction on the occurrence of oxidative stress, the H_2O_2 content was determined in young leaf (Figure IV.2D). While the H_2O_2 content of young leaf at position #16 remained unchanged after 21 d, it was significantly higher after 28 d of S limitation compared to Control conditions. After 35 d of S treatment, H_2O_2 content in the young leaf of S-limited plants was 1.5-fold higher than in the young leaf of Control plants (Figure IV.2D).

B – 2 S restriction affects the young leaf proteome

The proteomic profiles of leaf #16 were compared after 35 d of treatment between Control and Low S plants. The total protein extracts showed no significant difference in protein content between these two treatments (Figure IV.5). Analysis of gels obtained after two–dimensional electrophoresis revealed that 36 protein spots were modulated in this leaf in response to S limitation compared to the Control (Figure IV.6). Beyond those spots, 19 and 17 spots were respectively induced and repressed by Low S treatment. LC–MS/MS enabled the identification of 25 spots, as shown in Tables IV.2 and 3.

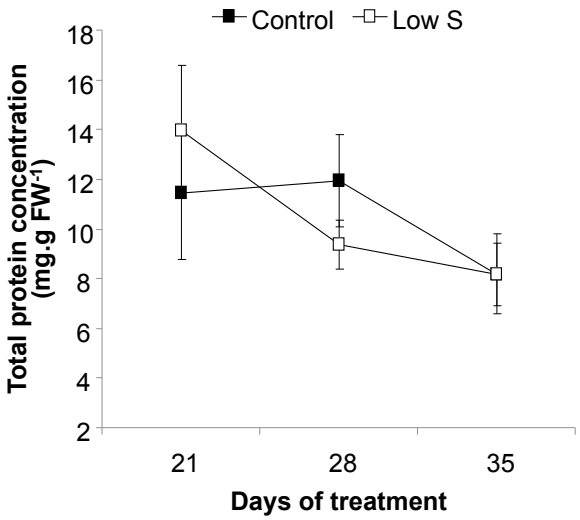


Figure IV.5 Changes in amount of total proteins in leaf rank #16 of Control and S–restricted (Low S) plants after 21, 28 and 35 d of treatment.

Data are means ± SE (*n*=4). None significant difference from the Control was observed.

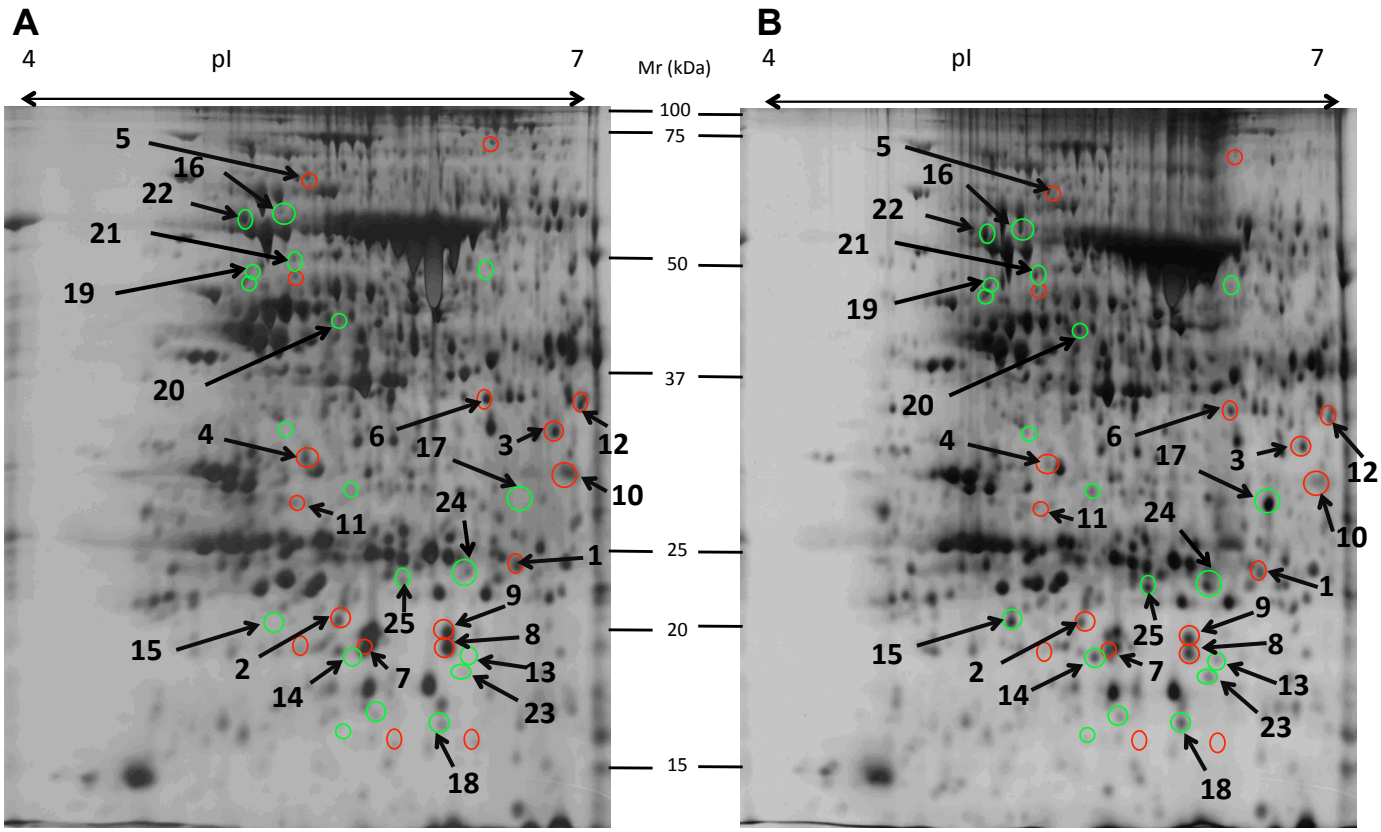


Figure IV.6 Silver–stained two dimensional electrophoresis gels (2–DE) of total proteins from leaf rank #16 in Control (A) and S–restricted (B) plants after 35 d of treatment.

The spots circled in green and red are respectively induced and repressed in S–restricted plants compared with Control plants. The numbered spots were identified by LC–MS/MS and are listed in Tables 2 and 3. Mr: Molecular Weight; pI: isoelectric point.

Among the 17 proteins that were repressed in Low S conditions (Table IV.2), several chloroplastic proteins were characterized: a photosystem I chlorophyll a/b binding protein (spot No. 2); a protein showing similarity with ferredoxin–NADP reductase (FNR, spot No. 3); and a chloroplastic malate dehydrogenase (MDH; spot No. 6) that could be involved in the "malate valve". The "malate valve" catalyses the export of malate from the chloroplast when the NADPH to $NADP^+$ ratio is high (Scheible *et al.*, 2004). THI1 (spot No. 4), a protein located in the chloroplast and mitochondrion that is involved in thiamine synthesis, was also repressed. A mitochondrial chaperonin, Heat Shock Protein (HSP; spot No. 5), and a glutathione S–transferase (spot No. 1), an enzyme especially involved in detoxification of xenobiotics, were also negatively affected. Spots 7, 8 and 9, similarly repressed by the S restriction treatment, were identified as germin–like proteins, which may present an oxalate oxidase activity (Davoine *et al.*, 2001).

Spots 13 and 14, strongly induced in our study (11.5 and 5.3 fold respectively) correspond to chloroplastic Water Soluble Chlorophyll binding Proteins (WSCPs) in *Brassica oleracea*, which present a dual function of protection of chlorophyll against reactive oxygen species (ROS) and protease inhibitor activity (Desclos *et al.*, 2008). A trypsin inhibitor propeptide (spot No. 15), was also significantly induced in leaf #16 after 35 d of S restriction (Low S), compared to Control. The ATP synthase F1–subunit (spot No. 16), responsible for the ATP synthesis that occurs during the light phase of photosynthesis, was also induced. A strong accumulation of a β–Carbonic anhydrase was also observed (factor 7.9; spot No. 17). This enzyme, that reversibly catalyses CO_2 hydration into carbonate (H_2CO_3), is involved in various metabolic processes (Jebanathirajah & Coleman, 1998). Similarly, a protein associated with the chloroplastic Cu-Zn superoxide dismutase (Cu–Zn SOD, spot No. 18) encoded by the *CSD2* gene in *A. thaliana* (Kliebenstein *et al.*, 1998) was induced in leaf #16 after 35 d of S restriction. This protein is well known to be involved in defence against oxidative stress. A spot identified as a putative myrosinase–binding protein from *Brassica rapa* (spot No. 19) was also induced under S restriction. The enzymes 12–oxophitodienoate reductase (spot No. 20) and 1–aminocyclopropane–1–carboxylate synthase (ACC synthase, spot No. 21), which catalyse jasmonate and ethylene synthesis respectively (Kende, 1989; Schaller & Stintzi, 2009) were similarly induced in leaf #16 after 35 d of S restriction. Finally, a slight induction was observed for a vacuolar ATPase subunit (spot No. 22), a tonoplastic protein involved in active transport in vacuoles (Krebs *et al.*, 2010).

Table IV.2 Proteins significantly repressed in leaf #16 after 35 d of sulphur restriction (Low S) identified by LC–MS/MS.

Spot No.	Normalized spot volume (Mean±SE x1E+06)				Fold change	Exp. pI / Mr	Theo. pI / Mr	PM	Score	SC (%)	Protein name / Species / NCBI Accession number
	Control		Low S								
1	11.16	±1.07	7.85	±0.29	**−1.42**	6.5 / 24	8.5 / 59.1	4	29	7	Glutathione S-transferase / *Brassica oleracea* / gi|171921127
2	12.49	±0.39	9.55	±0.35	**−1.31**	5.6 / 21	5.8 / 26.3	6	159	11	Photosystem I light-harvesting chlorophyll a / b-binding protein / *Nicotiana tabacum* / gi|493723
3	14.93	±0.09	10.83	±1.04	**−1.38**	6.7 / 33	8.7 / 41.1	5	204	17	FNR2 (Ferredoxin-NADP(+)-Oxidoreductase 2) / *Arabidopsis thaliana* / gi|145323954
4	9.39	±0.63	5.21	±0.37	**−1.8**	5.5 / 31	5.8 / 36.6	3	188	10	THI1; protein homodimerization / *Arabidopsis thaliana* / gi|15239735
5	1.70	±0.06	1.31	±0.08	**−1.3**	5.5 / 65	5.3 / 55.2	8	346	25	Mitochondrial chaperonin (HSP60) / *Arabidopsis thaliana* / gi|2924773
6	7.51	±0.27	5.88	±0.35	**−1.28**	6.4 / 35	8.5 / 42.3	13	516	39	Chloroplast malate dehydrogenase / *Brassica rapa* subsp. Pekinensis / gi|207667274
7	14.45	±0.95	9.59	±1.02	**−1.51**	5.8 / 19	6.8 / 21.8	3	112	17	Germin-like protein / *Arabidopsis thaliana* / gi|1755154
8	19.15	±0.65	13.37	±1.45	**−1.43**	6.2 / 19	6.8 / 21.8	3	94	17	Germin-like protein / *Arabidopsis thaliana* / gi|1755154
9	23.59	±1.66	17.53	±1.05	**−1.35**	6.2 / 20	6.8 / 21.8	3	102	17	Germin-like protein / *Arabidopsis thaliana* / gi|1755154
10	28.44	±0.85	19.68	±2.49	**−1.45**	6.8 / 30	6.2 / 27.5	14	619	55	Chain B, The Transient Complex Of Poplar Plastocyanin With Turnip Cytochrome F Determined With Paramagnetic Nmr / *Brassica rapa* / gi|67463833
11	2.90	±0.20	2.14	±0.17	**−1.36**	5.5 / 29	5.3 / 26.3	4	192	13	AT2G37660 / *Arabidopsis thaliana* / gi|227204455
12	9.24	±1.30	5.96	±0.37	**−1.55**	6.8 / 35	8.5 / 35.8	7	415	31	Mitochondrial malate dehydrogenase (NAD) / *Arabidopsis thaliana* / gi|18404382

Significant ANOVA was followed by a Mann–Whitney test ($p \leq 0.05$) carried out on the leaf–normalised spot volumes (n=3). Experimental and theoretical pI / Mr, the number of LC–MS/MS matched peptides (PM), the SCORE and the percentage of sequence coverage (SC) obtained are also indicated. The assigned best–matched protein is listed with the organism in which it was identified and its GenBank protein accession number.

Table IV.3 Proteins significantly induced in leaf #16 after 35 d of sulphur restriction (Low S) identified by LC–MS/MS.

Spot No.	Normalized spot volume (Mean±SE x1E+06)				Fold change	Exp. pI / Mr	Theo. pI / Mr	PM	Score	SC (%)	Protein name / Species / NCBI Accession number
	Control		Low S								
13	1.08	±0.18	12.47	±3.78	**11.51**	6.3 / 19	8.4 / 22.7	2	60	8	Water-soluble chlorophyll binding protein / *Brassica oleracea* var. acephala / gi|27530883
14	2.61	±0.40	13.75	±2.89	**5.27**	5.7 / 19	7.8 / 22.7	3	132	16	Water-soluble chlorophyll binding protein / *Brassica oleracea* var. acephala / gi|27530881
15	3.83	±1.88	11.77	±1.55	**3.08**	5.3 / 20	5.1 / 23.3	14	368	44	Trypsin inhibitor propeptide / *Brassica oleracea* / gi|841208
16	1.07	±0.09	3.11	±0.84	**2.92**	5.4 / 59	5.1 / 55.3	9	409	18	ATP synthase CF1 alpha subunit / *Brassica napus* / gi|262400756
17	2.97	±0.43	23.36	±1.06	**7.86**	6.6 / 29	6.5 / 28.8	7	175	15	BCA3 (BETA CARBONIC ANHYDRASE 4); carbonate dehydratase / zinc ion binding / *Arabidopsis thaliana* / gi|15220853
18	6.53	±0.32	9.69	±0.63	**1.49**	6.1 / 17	6.7 / 21.8	3	75	18	Cu-Zn Superoxide dismutase / *Arabidopsis thaliana* / gi|3273753
19	0.97	±0.15	2.22	±0.25	**2.29**	5.2 / 49	5.4 / 20.6	6	271	35	Putative myrosinase-binding protein 3 / *Brassica rapa* subsp. Pekinensis / gi|33285912
20	1.19	±0.13	2.73	±0.30	**2.3**	5.7 / 43	6.3 / 40.9	4	101	8	12-oxophytodienoate reductase / *Arabidopsis thaliana* / gi|2765083
21	2.82	±0.29	5.24	±0.70	**1.86**	5.4 / 51	7.6 / 48.7	2	77	5	Aminotransferase class I and II family protein / *Arabidopsis thaliana* / gi|15217440
22	8.10	±0.57	10.68	±0.44	**1.32**	5.2 / 57	5.0 / 54.7	21	954	50	Nucleotide-binding subunit of vacuolar ATPase / *Arabidopsis thaliana* / gi|166627
23	1.66	±0.25	4.81	±0.52	**2.89**	6.3 / 19	9.0 / 21.2	2	91	10	Unknown protein / *Arabidopsis thaliana* / gi|7658343
24	6.42	±0.36	14.89	±1.60	**2.32**	6.3 / 24	5.8 / 21.6	4	145	19	Unknown protein / *Populus trichocarpa* / gi|118485421
25	2.77	±0.22	8.29	±1.21	**2.99**	5.9 / 24	5.8 / 21.6	3	118	19	Unknown protein / *Populus trichocarpa* / gi|118485421

Significant ANOVA was followed by a Mann–Whitney test ($p \leq 0.05$) carried out on the leaf–normalised spot volumes (n=3). Experimental and theoretical pI / Mr, the number of LC–MS/MS matched peptides (PM), the SCORE and the percentage of sequence coverage (SC) obtained are also indicated. The assigned best–matched protein is listed with the organism in which it was identified and its GenBank protein accession number.

C Discussion

C – 1 S limitation at the rosette stage does not change the total shoot biomass but inhibits growth and photosynthesis of young leaves

As previously described in *Brassica olearacea* (Koralewska *et al.*, 2007; 2009) and oilseed rape (Dubousset *et al.*, 2009; Abdallah *et al.*, 2010), S restriction applied at the rosette stage over 35 d does not result in a significant inhibition of the total shoot growth (Table IV.1). However, these results contrast with two studies showing a growth reduction after a shorter period of S depletion in oilseed rape (Blake-Kalff *et al.*, 1998; Parmar *et al.*, 2007). In these cases, the chlorophyll content of young leaves was also affected by the S restriction, a symptom that was not found in our study. Our finding suggests that during the 55 d preceding the sulphate limitation, plants have sufficiently absorbed and stored S for sustainable growth and maintenance of the various physiological processes measured during the following 35 d of treatment. It thus appears that at the rosette stage, S limitation has varying effects on oilseed rape, depending on the initial level of S storage.

Nevertheless, in our experiment, a significant reduction in biomass and length of petioles in the younger leaves (Figure IV.1B) was observed after 35 d of Low S treatment compared to the Control. If this reduction in petiole length is confirmed in further experiments, it could be possible to use this morphological trait as an indicator of S deficiency during the early vegetative stage of oilseed rape development. The total S amount in young leaf #16 of Low S plants was significantly lower than Control (Figure IV.4A). This indicates that S limitation has a negative impact on young leaf metabolism. Indeed, this is highlighted by a significant increase in anthocyanin content (Figures IV.1 and IV.2C), a decrease in photosynthetic activity (Figure IV.3A), and is associated with a higher intercellular CO_2 concentration (Figure IV.3B). Proteome analysis performed on the young leaf #16 provides evidence that these physiological alterations were related to modulations of protein expression leading to metabolic changes that occurred in response to 35 d of S restriction.

C – 2 Proteins associated with S metabolism and remobilisation of S compounds are specifically modulated by S restriction

Among the physiological responses that may contribute to compensating for low S nutrition, the remobilisation of S reserves is a major process. Using ^{34}S labelling, it appeared

that Low S plants are able to maintain the amount of ^{34}S in young leaves at a relatively stable level compared to the Control (Figure IV.4B). In contrast, leaf #16 of Control plants undergoes ^{34}S isotope dilution associated with the chase–period (Figure IV.4B), attesting that unlabelled S is absorbed and transported to this young leaf. As previously reported (Parmar *et al.*, 2007; Dubousset *et al.*, 2009), the redistribution of S in response to S limitation can be achieved by a strong remobilisation of previously stored sulphate, through a tissue–specific induction of genes encoding the sulphate transporters, Sultr4;1 and 4;2, which are involved in the efflux of sulphate accumulated in the vacuolar compartment. The proteomics approaches (Table IV.3) revealed the induction of a vacuolar ATPase subunit, which could be implicated in S remobilisation processes through the maintenance of an efficient sulphate efflux from the vacuole, so as to sustain growth (Dubousset *et al.*, 2009; Krebs *et al.*, 2010).

Our proteomic analysis does not reveal modulation of proteins associated with primary S metabolism, probably due to the fact that the proteomic study was performed after 35 days of S limitation. However, some proteins implied in secondary S metabolism are affected by S limitation. The putative myrosinase–binding protein is induced by S restriction. Because of its potential involvement in the regulation of myrosinase activity, this result suggests that glucosinolates can be used as a sulphate source in cases of severe S limitation. This finding is consistent with transcriptomic data and metabolome analysis in *Arabidopsis thaliana* that reveal an induction of myrosinase binding protein gene induction (Nikiforova *et al.*, 2003) and showed a decrease in the accumulation of glucosinolates in S restricted plants (Hirai & Saito, 2004). Also, the repression of THI1, involved in thiamine biosynthesis, may lead to a preferential allocation of cysteine for GSH and protein synthesis, since thiamine is produced from glyceraldehyde–3–phosphate and cysteine, two molecules whose levels are affected by the S limitation (Nikiforova *et al.*, 2005b; 2006). Similarly, after 35 d of S restriction, the repression of glutathione S–transferase (Table IV.2), also shown at the transcriptomic level in *Arabidopsis thaliana* (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2006), could reduce the xenobiotic detoxification capacity in the young leaf, may allow regulation of GSH utilisation for other purposes. These proteomic changes associated with the lower S content of leaf #16 observed in cases of S restriction clearly indicate a lack of S for the proper metabolism of this leaf.

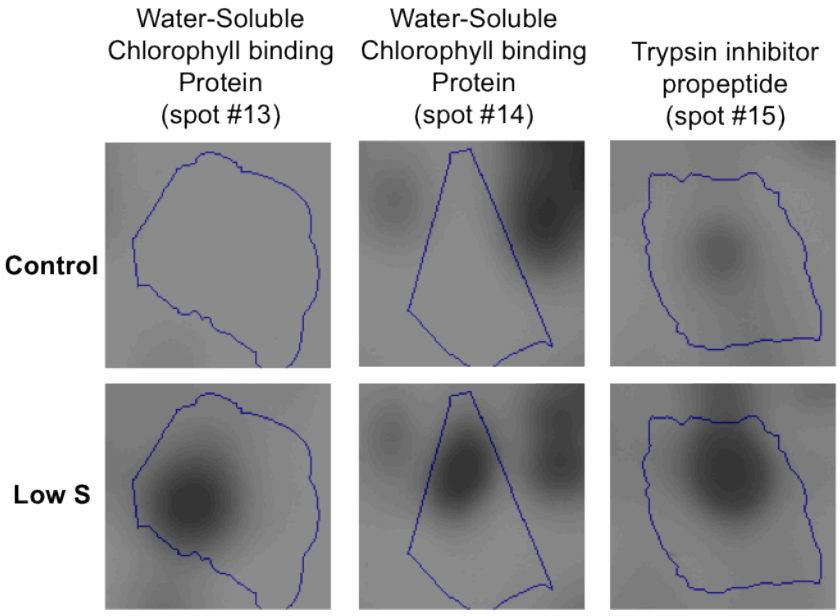


Figure IV.7 Changes in abundance of protein spots #13 (WSCP), 14 (WSCP), and 15 (Trypsin inhibitor propeptide) in leaf rank #16 of Control and S–restricted plants.

Details about protein identification are given in Tables 2 and 3. WSCP: Water-Soluble Chlorophyll binding Protein.

C – 3 Proteins involved in C metabolism and processes related to energy production are impacted by S restriction

In young leaves, C metabolism appears to be affected by 35 d of S limitation, and particularly photosynthetic metabolism (Figure IV.3A), which leads to a C fixation decline and a higher intercellular CO_2 concentration (Figure IV.3B). The proteomics approaches performed in the present study (Tables 2 and 3) helped to understand how the S restriction interacts with C metabolism by determining the impact of S limitation on the light and dark reactions of photosynthesis.

The reduction of a putative Chl*a*/*b* binding protein could cause an inhibition of photosynthetic activity in young leaves, since this protein belongs to the photosystem I Light Harvesting Complex (LHCI) and is involved in chlorophyll protection against degradation. In *Arabidopsis thaliana,* numerous genes encoding for this protein were also repressed in response to S depletion (Hirai *et al.*, 2003; Nikiforova *et al.*, 2003). However, the impact of a lower accumulation of this Chl*a*/*b* binding protein would be minimal since the S restriction applied in our experiment did not result in altering the chlorophyll level of the young leaves studied. Spots no. 13 and 14 (Figure IV.7), identified as Water Soluble Chlorophyll binding Protein (WSCP), correspond to serine protease inhibitor that can bind to chlorophyll. The accumulation of WSCPs such as WSCP1, WSCP2 and BnD22 is also observed in young leaves of oilseed rape subjected to a nitrogen starvation (0 mM NO_3^-), in comparison with well–fed oilseed rape (3 mM NO_3^-, Desclos *et al.*, 2008). WSCPs, that are specific of *Brassicacea,* may also be involved in chlorophyll protection against ROS and in the maintenance of protein content (Etienne *et al.*, 2007; Desclos *et al.*, 2008; Damaraju *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2012). Interestingly, proteomics approaches revealed the induction of Trypsin inhibitor propeptide (spot no. 15, Figure IV.7), which is able to inhibit proteases, binding with them in their active site. Therefore, the strong accumulation of WSCPs and Trypsin inhibitor propeptide could be involved in maintaining the protein content and chlorophyll level observed in leaf #16 under low S nutrition.

In contrast, two proteins that belong to the electron transfer chain in the thylakoidal membrane were repressed: plastocyanin (PC) and ferredoxin-NADP reductase (FNR). Because these two proteins act in the final stages of electron transfer during the light phase of photosynthesis and FNR catalyses the production of $NADPH+H^+$ required for CO_2 assimilation, it could be hypothesized that the first physiological symptoms of S limitation

result in an alteration of the coupling between the light and dark phases of photosynthesis leading to a depletion of C assimilation by the limitation of $NADPH+H^+$ availability. Indeed, sulphate restriction is known to affect C assimilation leading to a reduction in photosynthetic activity and a distortion of glycolytic flux, which can be assumed as a repercussion of amino acid accumulation, itself resulting from a reduction of S assimilation into cysteine (Kopriva & Rennenberg, 2004; Nikiforova *et al.*, 2005b). These changes to proteins associated with C metabolism observed in our study may lead to the accumulation of intercellular CO_2 (Figure IV.3B), which may finally result in the inhibition of growth in young leaves.

The strong accumulation of a β–carbonic anhydrase is also indicative of a C metabolism disruption in this leaf in response to 35 d of S restriction. This enzyme, which catalyses the reversible hydration of CO_2 to form HCO_3^- and H^+, is directly involved in the CO_2 metabolism associated with the Calvin cycle (Jebanathirajah & Coleman, 1998). In *Arabidopsis thaliana*, S limitation also results in the induction of the gene encoding this protein in leaves (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003). The accumulation of this protein would allow a better solubilisation of CO_2 at the cellular level and could therefore promote photosynthetic processes at the leaf level. It may also modify the pH of the intracellular medium, which could impact on numerous protein activities. Therefore, it can be assumed that the reduction in photosynthetic activity and the accumulation of CO_2 at the intercellular level are not directly caused by the reduction in the cysteine content or OAS accumulation, but could be related closely to C metabolism disturbances.

Proteomic analysis also shows an induction of proteins implicated in the maintenance of energy production in young leaves subjected to Low S treatment such as the catalytic α–subunit of chloroplastic ATP synthase. The induction of this enzyme, involved in ATP synthesis at the end of the electron transport chain in the thylakoidal membrane, suggests that the production of ATP in chloroplasts is favoured in the case of S limitation. This hypothesis is supported by the induction of proteins (WSCPs, Trypsin inhibitor propeptide) involved in the maintenance of reactions of the light phase of photosynthesis, providing the proton gradient required for ATP synthesis.

Although the repression of the thiazole biosynthetic enzyme (THI1) may lead to a preferential allocation of cysteine, it could have a negative impact on carbohydrate metabolism, whether on glycolysis/neoglucogenesis or on chlorophyll synthesis. Thiamine,

an S containing molecule, is the precursor of thiamine pyrophosphate, an essential co–enzyme for the activity of key enzymes involved in C metabolism such as pyruvate carboxylase, pyruvate oxidase or transketolase (Lindqvist & Schneider, 1993). The repression of this enzyme could also cause chlorosis if S restriction is extended beyond 35 d. Indeed, in *Arabidopsis thaliana*, *AtTHI1* mutants result in a significant decrease in the chlorophyll level leading to photobleaching (Redei, 1965). THI1 repression, similar to HSP60, is also a sign of mitochondrial stress caused by S limitation since this protein is also involved in mitochondrial DNA damage tolerance (Machado *et al.*, 1996).

Proteomic analysis has also revealed the repression of a chloroplast malate dehydrogenase (MDH) suggesting a relative reduction in malate export (Minárik *et al.*, 2002). Additionally, the repression of a mitochondrial MDH that uses NADH to reduce oxaloacetate to malate, which is then exported to the cytosol, also suggests an alteration of energy production through the Krebs cycle. This protein, highly regulated in a post–translational manner, is involved in the partitioning of C and energy, and here could be partly responsible for the reduction in net CO_2 consumption, as suggested by Tomaz *et al.* (2010). These chloroplastic and mitochondrial MDH repressions could also be implied in the malate accumulation observed in oilseed rape in the case of S deficiency (Blake-Kalff *et al.*, 2000). Indeed, with respect to sulphate decreases, malate may be transported into the vacuole where it could act as a counter ion for cations as assumed by Blake–Kalff *et al.* (2000).

C – 4 S restriction provokes physiological and proteomic changes related to oxidative stress in young leaves

In accordance with the *Arabidopsis thaliana* transcriptome responses to S restriction (Hirai *et al.*, 2003; Nikiforova *et al.*, 2003; Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003; Hirai & Saito, 2004), our proteomic study showed an accumulation of 12–oxophytodienoate reductase, which catalyses the last step of jasmonic acid biosynthesis. Jasmonic acid could have a positive effect on S metabolism in cases of S limitation through the induction of many genes such as *APS1* and *APS2* coding for ATP sulfurylase, *SAT3* coding for serine acetyltransferase (Jost *et al.*, 2005). Interestingly, among the genes induced by jasmonic acid, there is the myrosinase binding-protein (Nikiforova *et al.*, 2003). Then, it could be postulated that the induction of this protein observed in our study is related to jasmonic acid accumulation in

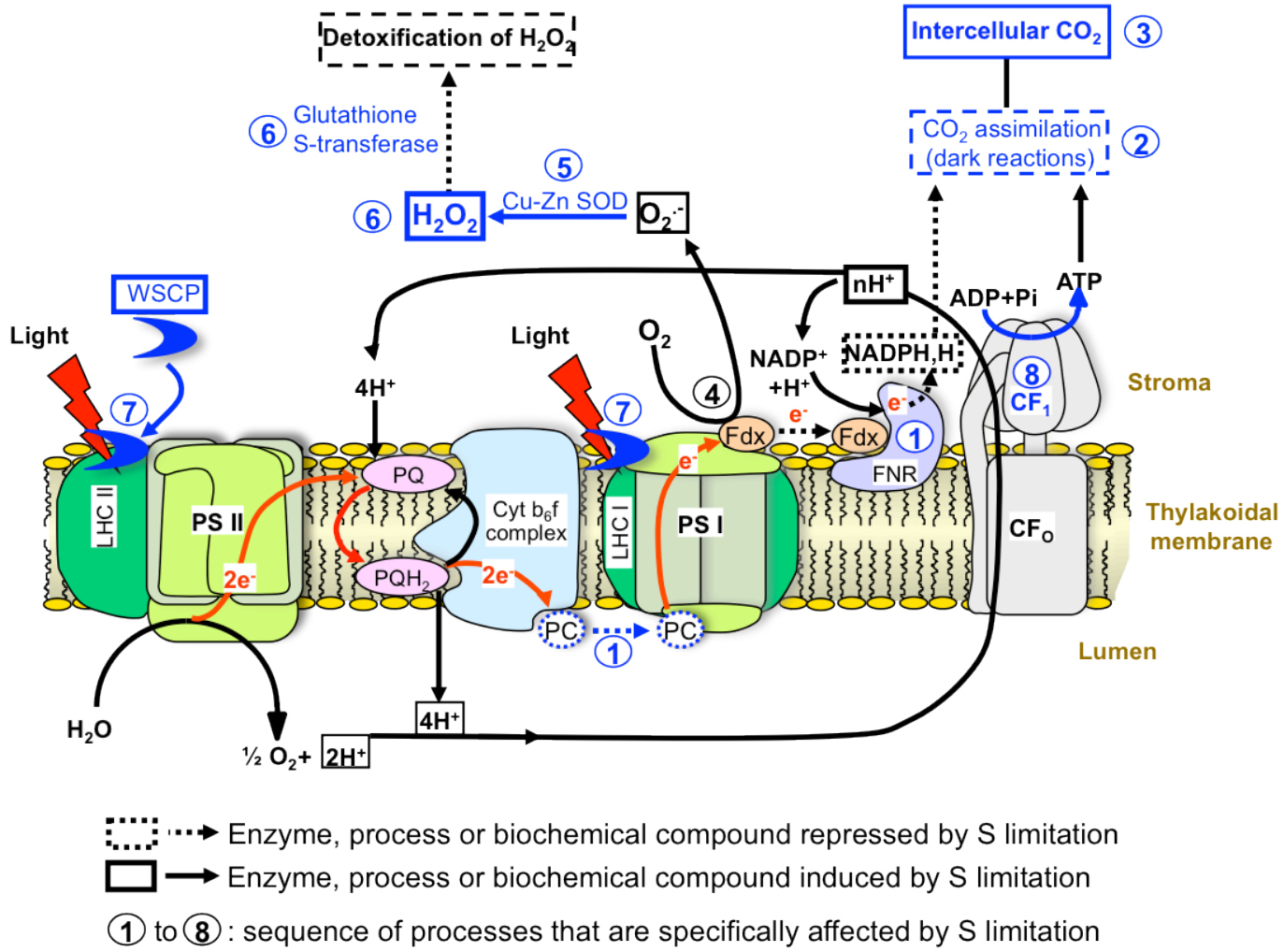


Figure IV.8 Putative sequence of events provoked by a 35 d S limitation on the electron transfer chain and ATP synthase in a young leaf chloroplast.

Proteins, processes (1 to 8) or biochemical compounds that are effectively repressed or induced by S restriction are indicated respectively in doted or plain blue lines, while those that are postulated to be repressed or induced are in black lines. In Control, the electron transfer chain produced NADPH required for CO_2 assimilation. After 35 d under Low S conditions, we observed: **1**, a repression of ferredoxin-NADP reductase (FNR) and plastocyanin (PC) (Table 2) which could cause a perturbation of the electron transfer and a lower production of $NADPH+H^+$; **2**, the decline in CO_2 assimilation (Figure 3B), probably linked to $NADPH+H^+$ depletion; **3**, an intercellular CO_2 accumulation (Figure 3A) concomitant with the photosynthesis reduction; **4**, the lower abundance of FNR may also result in the transfer of electrons to O_2 by Ferredoxin (Fdx), producing $O_2^{\cdot-}$; **5**, a higher abundance of Cu-Zn Superoxide Dismutase (SOD) (Table 3), which suggests that the of $O_2^{\cdot-}$ detoxification into H_2O_2 could be increased; **6**, an accumulation of H_2O_2 (Figure 2D) probably due to ineffective detoxification process such as the repression of glutathione S-transferase, which leads to an oxidative stress; **7**, an accumulation of Water Soluble Chlorophyll binding Protein (WSCP) while the chlorophyll content is maintained (Figure 2A), may signify that chlorophylls are protected against oxidative stress and that the photosystems remain efficient; **8**, an accumulation of ATP synthase F1 complex, which in association with the H^+ accumulation in the lumen due to proper functioning of photosystems and electron chains, suggests that ATP production is favoured. CF_O: membrane-embedded subunit of ATP synthase; CF_1: catalytic subunit of ATP synthase; Cyt b_6f: cytochrome b_6f complex; LHC: Light Harvesting Complex; PQ: Plastoquinone.

case of S limitation. Indeed, several S compounds play a role in plant stress tolerance (Foyer & Rennenberg, 2000), and jasmonic acid is known to participate in the transduction of stress responses (Reymond & Farmer, 1998). This phytohormone could result ultimately in cell death, particularly *via* the induction of an oxidative stress. In response to S restriction, analysis of the leaf proteome also reveals the induction of ACC synthase, an enzyme implicated in the biosynthesis pathway of ethylene. Like jasmonic acid, ethylene plays a potential role in the stimulation of ROS accumulation, which acts as a signalling molecule for inducing plant responses against biotic and abiotic stresses (Wi *et al.*, 2010).

The accumulation of the chloroplastic Cu–Zn SOD, associated with $O_2^{\cdot-}$ detoxification, also indicates that S limitation causes an oxidative stress in young leaves, as previously observed under S deficiency in mulberry plants (Tewari *et al.*, 2010). The repression of protein spots showing similarity to germin–like proteins, which could have an oxalate oxidase activity that generates H_2O_2 and CO_2 (Davoine *et al.*, 2001), may thus be involved in reducing oxidative stress. Furthermore, the strong accumulation of the β–carbonic anhydrase also suggests a possible antioxidant function of this enzyme as mentioned by Slaymaker *et al.* (2002). All these results together reinforce the idea that S restriction leads to an oxidative stress that seems to be actively attenuated in young leaves by the modulation of various proteins involved in resistance to oxidative stress. However, our findings show an increase in H_2O_2 content after 28 and 35 d of S restriction, demonstrating that these defence mechanisms do not appear entirely effective.

D Conclusions

A relatively long period (35 d) of S limitation affects C metabolism in the young leaves of oilseed rape, and in particular the photosynthetic activity through the repression of dark reactions, as evidenced by the reduction of CO_2 assimilation and the accumulation of intercellular CO_2. A general scheme for summarizing the cascade of events that explain the impact of S limitation on photosynthesis was proposed in Figure IV.8. The reduction in CO_2 assimilation in young leaf is not due to a decrease in chlorophylls, which remains stable, but it is probably related to an alteration of the final stages of electron transfer and a limitation of $NADPH+H^+$ due to the repression of PC and FNR. The accumulation of H_2O_2 and anthocyanins indicated that S limitation also provokes an oxidative stress in young leaves. This could be explained by (i) the repression of FNR that might amplify the formation of ROS

by the Mehler reaction, resulting in the transfer of electrons to O_2 by ferredoxin, producing $O_2^{\cdot-}$, (ii) the higher abundance of Cu-Zn SOD, which detoxifies $O_2^{\cdot-}$ into H_2O_2, and (iii) the up-regulation of enzymes involved in the synthesis of jasmonic acid (12–oxophytodienoate reductase) and ethylene (ACC synthase), two phytohormones potentially involved in the induction of oxidative stress. Simultaneously, (i) chlorophylls and protein contents remained stable, (ii) WSCPs which are involved in the protection of chlorophyll against photooxidation, were induced, and (iii) ATP synthase F1 complex were accumulated. This suggests that, despite the occurrence of an oxidative stress, the capacity of leaves to absorb photosynthetic active radiations by the photosystems and ATP production remain efficient for as long as possible. However, these protection mechanisms against ROS damage *via* the regulation of ROS production and detoxification are not fully effective to enable tolerance to a long period of S limitation.

Our proteomic study does not reveal inductions of well known biomolecular markers of S deficiency that were identified in *Arabidopsis thaliana* such as isoflavonoïde reductase, involved in anthocyanins synthesis, or primary S metabolism enzymes (Nikiforova *et al.*, 2003; Hirai *et al.*, 2004). Then, it could be interesting to perform a kinetic study of changes in leaf proteome to determine the first events associated with S limitation, and verify if these typical marker genes are also detectable using 2-DE in *Brassica napus*.

E Methods

E – 1 Plant material, experimental treatments and tissue sampling

Seeds of *Brassica napus* L. (cv. Capitol) were sterilised by exposure to 80% ethanol for 30 s followed by treatment with 1% sodium hypochlorite for 10 min under agitation and then washed thoroughly with demineralised water. Then seeds were germinated on perlite soaked with ¼ Hoagland nutrient solution consisting of 1.25 mM $Ca(NO_3)_2$,$4H_2O$, 1.25 mM KNO_3, 0.5 mM $MgSO_4$, 0.25 mM KH_2PO_4, 0.2 mM Fe–Na EDTA, 14 µM H_3BO_3, 5 µM $MnSO_4$, 3 µM $ZnSO_4$, 0.7 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 0.7 µM $CuSO_4$, 0.1 µM $CoCl_2$, which included sulphate-labelled with ^{34}S isotope at 1% atom excess in K_2SO_4 form as previously described by Dubousset *et al.* (2009). Five–day–(d)–old seedlings were then transplanted at 18 plants per tray into a hydroponic system supplied with 20 L of ¼ Hoagland nutrient solution containing $^{34}SO_4^{2-}$, constantly aerated and renewed every 7 d. After 55 d in these conditions, plants were grown in individual containers filled with 4 L of nutrient solution, and then the $^{34}SO_4^{2-}$

labelling was stopped, giving way to a chase period of 35 d where two levels of S supply were applied: 500 µM for Control and 8.7 µM $MgSO_4$ for S limited plants (Low S). The lack of Mg was compensated with addition of $MgCl_2$. These nutrient solutions were renewed every 7 d. During the whole experiment, plants were illuminated by natural light, supplied with Philips® Green Power lamps (400 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ photosynthetically active radiation in the canopy) for 16 h per day, and subjected to a thermoperiod of 20°C (day) and 15°C (night). Leaves were numbered in order of their appearance and therefore according to their nodal position.

Four plants of each treatment (Control, Low S) were harvested after 0, 14, 21, 28 and 35 d of treatment. Leaf fresh mass and leaf area were measured. An aliquot of each leaf was freeze–dried to determine the dry matter, and samples were ground into a fine powder to determine their S and ^{34}S content. Aliquots of about 200 mg of fresh matter of each organ were immediately frozen after harvest in liquid nitrogen and stored at –80°C to extract total proteins.

E – 2 Measurement of physiological parameters during application of treatments

All measurements were made on three or four plants for each treatment (Control and Low S) to allow statistical analysis, and two or three technical replicates were conducted. The levels of chlorophylls, anthocyanins and flavonols in leaves were measured each week from the beginning of the S treatment in Control and Low S plants with an optical sensor system (Multiplex ®, Force A, Orsay, France). Gas exchanges for the photosynthetic parameter measurements were performed during the last days of treatment, between 9:00 and 12:00, with a portable LI–6400 system for measuring gas exchange (LI–COR, Inc., Lincoln, NE, USA) in leaves from rank #7 (mature leaf at the beginning of treatment), rank #11 (young leaf at the beginning of treatment) and rank #16 (young leaf emerged during treatment). Net photosynthesis and intercellular CO_2 concentration were determined in these leaves at 20°C, at approximately 400 ppm CO_2 and with a photosynthetically active photon flux of 1000 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$.

E – 3 S and ^{34}S analysis

Freeze–dried samples were ground to a fine powder, weighed, and placed into tin capsules. S content was determined with an elemental analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy) connected to a continuous flow isotope mass spectrometer (IRMS, Isoprime, GV

Instruments, Manchester, UK). The IRMS analysis also provided the changes in the relative amount of ^{34}S in excess in each sample derived from the tracer fed to the plant as described previously by Dubousset *et al.* (2010).

E – 4 Determination of H_2O_2 content

The H_2O_2 content was determined as described by Lee *et al.* (2009). About 500 mg FW of leaf samples were homogenized with 1.5 mL of 50 mM phosphate buffer (pH 6.8) and then centrifuged at 6000 *g* for 25 min. The resulting supernatant was then mixed with 1 mL of 0.1% titanium chloride in 20% (v/v) H_2SO_4 and centrifuged at 6000 *g* for 15 min. The absorbance of the resulting supernatant was immediately read at 410 nm and H_2O_2 concentration was calculated using a linear calibration curve of H_2O_2 solutions ranging from 0 to 10 mM.

E – 5 Extraction and determination of total proteins

Two hundred milligrams of fresh leaf samples were ground to a fine powder in liquid nitrogen in the presence of 50 mg of poly(vinylpolypyrrolidone) (PVPP). The addition of PVPP is used to fix plant polyphenols that might interfere with the quantification of proteins or during separation of proteins by electrophoresis. The ground material was dissolved in 1.75 mL of TCA/acetone solution (10% TCA (w/v) prepared in acetone). After centrifugation (3 min, 16000 *g*, 4°C), the protein pellet was purified according to the protocol adapted from Wang *et al.* (2003). The protein pellet obtained after precipitation with TCA/acetone was resuspended in 1.75 mL of 0.1 M ammonium acetate dissolved in 80% methanol. After homogenisation and centrifugation (16000 *g*, 3 min, 4°C), the pellet was washed with 1.75 mL of 80% acetone and centrifuged again (16000 *g*, 3 min, 4°C). The supernatant was removed and the pellet was dried under vacuum (Speedvac Concentrator 5301, Eppendorf, France) for 5 min at 50°C and then resuspended in 0.8 mL phenol at pH 7.9 and in 0.8 mL of dense SDS buffer (30% sucrose, 2% SDS, 0.1 M Tris–HCl, pH 8.0, 0.5% 2–mercaptoethanol). After 5 minutes incubation at 4°C and centrifugation (16000 *g*, 3 min, 4°C), the phenol phase was transferred to a new tube and supplemented with 1.75 mL of 0.1 M ammonium acetate and stored at –20°C overnight. Afterwards, ammonium acetate was used to precipitate proteins to enable their collection by centrifugation (16000 *g*, 5 min, 4°C). The protein pellet was then washed with 1.75 mL of 100% methanol and again with 1.75 mL of 80% acetone. Residual acetone was removed by vacuum evaporation over a few minutes. The pellet was

resuspended in 400 µL of rehydration R2D2 buffer [5 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 2% N–decyl–N,N–dimethyl–3–ammonio–1–propanesulfonate, 20 mM dithiothreitol, 5 mM Tris (2–carboxy– ethyl) phosphine, 0.5% IPG buffer (GE Healthcare, Saclay, France), pH 4 to 7; (Méchin *et al.*, 2003)]. The total protein concentration was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

E – 6 Two–dimensional electrophoresis (2–DE) and image analysis

For 2–DE, we followed the protocol detailed by Desclos *et al.* (2008). Gels were stained using the silver–staining procedure described by Blum *et al.* (1987) and scanned with the ProXPRESS 2D proteomic imaging system (Perkin–Elmer, Courtaboeuf, France) before image analysis. Images of the 2–DE gels were analysed using the Progenesis SameSpots software v3.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) according to the manufacturer's protocol. Gels from four independent biological replicates were used. Spot detection, warping, and matching were performed automatically by the software and manually validated. Artefacts due to non–specific silver nitrate staining or spots that could not be confidently verified as true matches were disregarded rather than manually edited, and misalignments were corrected by manual warping when appropriate. M_r and p*I* were calculated using Samespots software calibrated with commercial molecular mass standards (prestained precision protein standards; Bio–Rad, Marne–la–Coquette, France) run in a separate marker lane on 2–DE gel.

E – 7 Protein Identification by ESI LC–MS/MS

Spots of interest were excised and washed several times with water and dried for a few minutes. Trypsin digestion was performed overnight with a dedicated automated system (MultiPROBE II, Perkin-Elmer). The gel fragments were subsequently incubated twice for 15 min in a 0.1% CH_3CN solution in water to allow extraction of peptides from the gel pieces. Peptide extracts were then dried and dissolved in starting buffer for chromatographic elution, consisting of 3% CH_3CN and 0.1% HCOOH in water. Peptides were enriched and separated using lab–on–a–chip technology (Agilent, Massy, France) and fragmented using an on–line XCT mass spectrometer (Agilent). The ESI LC–MS/MS data were converted into DTA–format files that were further searched for proteins with MASCOT Daemon (Matrix Science, http://www.matrixscience.com/). For protein identification, two strategies were employed to mine the maximum information. Measured peptides were searched in the NCBInr–protein

sequence database, viridiplantae (green plants), and in the Brassica EST database (Brassica Genome Gateway 2007, http://brassica.bbsrc.ac.uk/). Proteins with two or more unique peptides matching the protein sequence with a score >53 defined by MASCOT, were considered as a positive identification. The spectra of each peptide were verified manually.

E – 8 Statistics

The variability of the results is expressed by the average values for all biological replicates (n = 3 or 4) ± standard error (SE). For each harvest date, the effects of Low S treatments compared to the Control were subjected to statistical analysis using Microsoft® Excel 2008/XLSTAT©-Pro (Version 7.2, 2003, Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA). With a statistical significance postulated at $p<0.05$, the Wilcoxon test was chosen to compare physiological parameters between treatments, whereas the Mann–Whitney test was done to compare S, ^{34}S, H_2O_2 and protein expressions between Low S and Control plants. These statistical methods were used to characterise the protein spots specifically induced and repressed during S limitation, which were subsequently analysed by mass spectrometry (ESI LC–MS/MS).

Competing interests

The authors have declared no conflict of interest.

Authors' contribution

All authors contributed to the experimental design, to the plant growth and tissue sampling and have been involved in revising critically the article for important intellectual content. SE carried out S and ^{34}S analyses. SE and PD performed measurements of photosynthetic activities, chlorophylls, anthocyanins and flavonols contents. PD made the other measurements and analyses, including statistical analyses and drafting the article.

Acknowledgements

The authors thank Mrs Anne-Françoise Ameline for her help in the plant growth, Mr Laurent Coquet for protein identification by ESI LC-MS/MS, Mrs Marie-Paule Bataillé for S and ^{34}S analyses, and Mr Tae-Hwan Kim for the method for the determination of H_2O_2.

Chapitre V

Evidence for proteomic and metabolic adaptations associated to alterations of seed yield and quality in sulphur-limited *Brassica napus* L.

Hypothèses : La qualité lipidique et protéique des graines matures de colza est réduite en cas de restriction de l'apport de sulfate. Cette réduction de la qualité grainière est fonction du stade de développement auquel survient la restriction de l'apport de S.

Objectif : L'objectif était de caractériser l'incidence de restrictions en sulfate appliquées à différents stades du développement (GS32, GS53 et GS70) sur la qualité lipidique et protéique de la graine.

Démarche expérimentale : L'analyse du contenu lipidique et protéique des graines matures obtenues au cours de la thèse de Lucie Dubousset (2009) ont été respectivement déterminés par Near InfraRed Spectroscopy (NIRS) et par 2-DE. Les principaux composés soufrés (sulfate, cystéine, glutathion, soufre protéique) ont été déterminés par des analyses biochimiques.

Résultats : La qualité protéique des semences produites dans les conditions LS70, LS53 et LS32 est réduite. Cette réduction de qualité est associée à une plus faible accumulation de protéines de stockages (SSPs) riches en soufre (comme la cruciférine Cru4) au profit de SSPs pauvres en S (comme la cruciférine BnC1). Cette compensation a permis un maintien de la teneur en protéines dans les graines LS70 et LS53, mais n'était pas suffisante pour maintenir la teneur en protéines des graines LS32. La teneur en lipides des graines LS53 et LS32 a également été affectée. Une réduction de la qualité lipidique de ces graines est observée, principalement associée à une réduction de l'accumulation des dérivés de type C18. Les changements protéomiques notamment associés au stockage des lipides, au métabolisme carboné et à la production d'énergie donnent un aperçu des processus qui peuvent contribuer à diminuer la teneur en huile et à modifier la composition des lipides. Des protéines impliquées dans la réponse de la plante au stress, comme la déshydroascorbate réductase et la Cu/Zn superoxyde dismutase, ont également une expression plus forte dans les graines LS53 et LS32, ce qui peut être associé à une plus faible accumulation de glutathion. D'autres modifications protéomiques comme la faible abondance de malate synthase glyoxysomale dans les graines LS53 et LS32, essentielle à la dégradation des acides gras lors de l'établissement de la plantule, suggèrent que la germination et le développement des plantules issues de ces graines peuvent être altérés. Les données de l'analyse protéomique et de l'identification des protéines par spectrométrie de masse sont disponibles à l'adresse http://moulon.inra.fr/protic/sms.

Chapitre V : Evidence for proteomic and metabolic adaptations associated to alterations of seed yield and quality in sulphur-limited *Brassica napus* L.

D'Hooghe Philippe[1,2,3], Dubousset Lucie[1,2,3], Gallardo Karine[4], Kopriva Stanislav[5], Avice Jean-Christophe[1,2,3], Trouverie Jacques[1,2,3]

[1] Normandie Univ, France

[2] UCBN, UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France, F-14032 Caen, France

[3] INRA, UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France

[4] INRA, UMR1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France.

[5] John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich, NR4 7UH, UK.

Keywords:

Lipids, meal, oilseed rape, seed proteome, seed quality, sulphur limitation.

Running title:

Seed quality adaptation in S-limited *Brassica napus*

Summary

In *Brassica napus*, seed yield and quality are related to sulphate availability but the seed metabolic changes in response to sulphate limitation remain largely unknown. To address this question, proteomics and biochemical studies were carried out on mature seeds obtained from plants grown under low sulphate (LS) applied at the bolting (LS32), early flowering (LS53) or start of pod filling (LS70) stages. The protein quality of all LS seeds was reduced and associated with a reduction of S-rich seed storage protein (SSP) accumulation (as Cruciferin Cru4) at benefit of S-poor SSP (as Cruciferin BnC1). This compensation allowed maintaining the protein content in LS70 and LS53 seeds, but was not sufficient to maintain the protein content in LS32 seeds. The lipid content and quality of LS53 and LS32 seeds were also affected, and primarily associated with a reduction of C18 derivates accumulation. Proteomics changes related to lipid storage, carbohydrate metabolism and energy (reduction of caleosins, phosphoglycerate kinase, malate synthase, ATP-synthase β-subunit, thiazole biosynthetic enzyme THI1; accumulation of β-glucosidase, citrate synthase) provide insights into processes that may contribute to decrease oil content and alter lipid composition (in favour of long chain fatty acids in LS53 and LS32 seeds). These data indicate that metabolic changes associated with S limitation responses affect SSP composition and lipid quality. Proteins involved in plant stress response, such as dehydroascorbate reductase and Cu/Zn-superoxide dismutase, were also accumulated in LS53 and LS32 seeds and may be a consequence of lower glutathione content under low S availability. Other proteomic changes such as the low abundance of glyoxysomal malate synthase, which is essential for the use of fatty acids during seedling establishment, suggest that germination and seedling development of S-limited seeds may be impaired. Proteomic data and mass spectrometry identification are available at http://moulon.inra.fr/protic/sms.

A Introduction

As the third main oil crop worldwide (58.5 Mt in 2011), oilseed rape represents a major renewable resource for food (oil, meal) and non-food uses (green energy, green chemistry). Compared with other crops such as cereals, oilseed rape (*Brassica napus* L.) requires high amounts of sulphur (S) to sustain growth and yield (McGrath & Zhao, 1996; Zhao *et al.*, 1997; Scherer, 2001). The reduction of S atmospheric deposits observed over the last decades forces farmers to add S fertilizer to maintain seed yield and quality. Previous study highlighted the necessity to satisfy plant S requirements until the start of pod filling to ensure yield as well as high lipid and protein contents (Dubousset *et al.*, 2010). These observations emphasize the importance of detailed understanding of the impact of S limitation on seed oil and protein quality and of the processes involved.

During *Brassica napus* seed development, the carbon (C) provided by source organs as sucrose is assimilated through both oxidative phosphate and glycolytic pathways. These pathways provide precursors for fatty acid synthesis in the form of acetyl-CoA, an S containing metabolite. Glycolysis enables the production of phosphoenolpyruvate (PEP) from hexose phosphates formed from sucrose cleavage and is considered as the predominant metabolic pathway for the production of these precursors. During seed development, PEP is principally transported to the plastid, where it is dephosphorylated by pyruvate kinase into pyruvate which is the substrate responsible for acetyl-CoA formation, used for fatty acid synthesis inside plastids (Eastmond & Rawsthorne, 2000; Schwender *et al.*, 2003). In the cytosol, PEP can also produce pyruvate by cytosolic pyruvate kinase or by a system involving phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCase), malate dehydrogenase (MDH) and chloroplastidial malic enzyme (ME). The PEPCase-MDH-ME pathway may be important since PEPCase activity is substantial during Brassica napus seed development, relative to most non-photosynthetic tissues (Plaxton, 1996). The cytosolic pyruvate can also be transported to the mitochondria to produce energy through the TCA cycle. Nevertheless, in maturing *B. napus* embryos, flux through the complete TCA cycle is absent and oxidation of mitochondrial substrate only weakly contributes to ATP production (Schwender & Shachar-Hill, 2006). The mitochondrial metabolism is mostly devoted to cytosolic fatty acid elongation, since the citrate formed in TCA cycle is exported into the cytosol and used for the production of acetyl-CoA by ATP citrate lyase (Baud & Lepiniec, 2010).

After extraction of oil from *B. napus* seeds, the residual protein-rich meal is used for animal feeding. Cruciferins are the major forms of seed storage proteins (SSP) found in *Brassica* species. These 11-12S globulins are synthesized inside endoplasmic reticulum during seed development as a precursor form of 50-60 kD, prior to be transported *via* the Golgi to vacuoles where they are partially cleaved during later stage by vacuolar proteases, leading to the formation of acidic α- and basic β-subunits. In dry mature seeds, cruciferins stored in vacuoles are composed of six pairs of acidic and basic associated subunits that interact nonconvalently. These subunits are subjected to limited proteolysis at the C-terminal end (Bewley & Black, 1994; Gallardo *et al.*, 2001; 2002a), which is repressed by S limitation treatments in *Arabidopsis thaliana* (Higashi *et al.*, 2006). During germination, SSP are broken down and used as source of nitrogen (N), C and S by the germinating seedling (Bewley & Black, 1994). The impacts of S limitation on seed protein quality have been previously studied in *Arabidopsis thaliana* (Higashi *et al.*, 2006), in which S limitation leads to a decrease of seed protein content, principally associated with a decrease in S-rich SSP accumulation (At12S3, At2S3). In oilseed rape, the N/S ratio in seed protein increases in S-limited conditions (Zhao *et al.*, 1997). Many attempts have been made to increase the seed methionine content of Brassicaceae species (for review see Ufaz & Galili, 2008). Transgenic *Brassica napus* lines carrying a gene encoding the Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) 2S albumin, a methionine-rich storage protein (representing 18.8% of total amino acids of this protein), and fused with the regulatory region of the phaseolin gene show a significant enhancement of total seed methionine accumulation under non S-limiting conditions (Altenbach *et al.*, 1992), improving the nutritional value of *Brassica napus* seeds. Unfortunately, this Brazil nut 2S sulphur-rich albumin was found to be allergenic (Pastorello *et al.*, 2001). Recently, it has been reported that a reduced activity in homocysteine methyltransferase 2, a methionine biosynthetic enzyme specifically expressed in vegetative tissues, leads to an increased accumulation of methionine in *Arabidopsis thaliana* seeds (Lee *et al.*, 2008). To our knowledge, such attempt has not yet been made in the context of S deficiency.

Since S limitation leads to perturbations of S, C and N metabolisms (Kopriva & Rennenberg, 2004; Hirai *et al.*, 2004; D'Hooghe *et al.*, 2013b) and considering the importance of these metabolisms for lipid and protein synthesis in developing seeds, this study aims to characterize the impacts of S limitation applied at different growth stages on

Brassica napus seed quality. In addition, the present study reveals the adaptations that may occur during seed maturation in response to S limitation. Their consequences on the maintenance of seed yield, lipid and protein quality and on the germination capacity are also discussed.

B Experimental procedures

B – 1 Experimental treatments and tissue sampling

Brassica napus plants were grown and harvested according to the protocol described by Dubousset *et al.* (2010). Briefly, Brassica napus cv. Capitol seeds were germinated with a thermoperiod of 20°C (day 16 h) and 15°C (night 8 h), for 36 d on 25% Hoagland nutrient solution. The plants were then submitted to 8°C (day 10 h) and 4°C (night 14 h) during 46 d for vernalization with the same nutrient solution. Each plant was then transferred to one pot containing perlite and vermiculite (2:1, v/v), and submitted to a thermoperiod of 20°C (day) and 15°C (night). Each day, the nutrient solution 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, the visible bud, the flowering, and the seed maturation stage, respectively. Optimal S nutrition (508.7 μM SO_4^{2-}) was applied in control plants while mineral S restriction (LS treatments) corresponding to 8.7 μM SO_4^{2-} was applied at GS32 (bolting stage) for LS32 treatment, GS53 (visible bud – early beginning of flowering) for LS53 treatment, or GS70 (start of the pod filling) for LS70 treatment, until the end of the growth cycle. At mature seeds stage, the number of mature seeds per plant was determined for four replicates per treatment. Seeds were then used for all the analyses. The yield components data and contents of total oil, total proteins and glucosinolates were previously published by Dubousset *et al.* (2010).

B – 2 Determination of total S and S-proteic contents

Freeze–dried samples were ground to a fine powder, weighed and prepared into tin capsules for determination of total S content using an elemental analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy) connected to a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (Isoprime, GV Instruments, Manchester, UK).

For determination of S-proteic content, soluble proteins were extracted by grinding 30 mg fresh weight of seed in 0.5 mL of citrate Na-phosphate buffer (20 mM citrate and 160

mM Na_2HPO_4, pH 6.8). The homogenate was centrifuged at 12 000 *g*, 4°C for 1 h and the resulting supernatant was used to determine the concentration in soluble proteins by protein-dye standing (Bradford, 1976) using BSA as standard. Proteins were then precipitated by adding four volumes of 10% TCA in acetone to one volume of extract. After storage at -20°C overnight, the extract was centrifuged (12 000 *g*, 4°C, 20 min) and the resulting pellet was washed twice with 1 mL 80% acetone, and centrifuged (16 000 *g*, 4°C, 3 min). Residual acetone was evaporated under vacuum at 45°C, and the resulting pellet, resuspended in 0.1 mL of ultra-pure water, was placed into tin capsule. The water was then evaporated under vacuum at 45°C (Speedvac Concentrator 5301, Eppendorf, France) and dry protein extract was analysed for S content using an elemental analyser combined to an isotope ratio mass spectrometer as described above for total S content.

B – 3 Extraction and quantification of sulphate content

Sulphate was extracted from 45 mg dry weight (DW) of seed samples ground to a fine powder, incubated twice with 2 mL of 50% ethanol, at 40°C for 1 h, centrifuged (10 000 *g*, 20 min), incubated twice with water, at 95°C

for 1 h, and centrifuged (10 000 *g*, 20 min). The supernatants were pooled and evaporated under vacuum (Concentrator Evaporator RC 10.22, Jouan, Saint-Herblain, France). The dry residue was resuspended in 2 mL of ultra-pure water and the sulphate concentration was determined by HPLC (ICS3000, Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA).

B – 4 Determination of free cysteine and total glutathione contents by HPLC

Thiols were extracted by grinding 20 mg fresh weight of seed in 0.2 mL of 0.1 M HCl. After centrifugation (20 000 *g*, 10 min), the supernatant was used to measure the content of total free cysteine and total glutathione after reduction with DTT by HPLC using the monobromobimane derivatization method as described by Koprivova *et al.* (2008).

B – 5 Determination of oil, proteins and glucosinolates contents by NIRS

As previously described by Dubousset *et al.* (2010), all the seed samples (about 5 g) 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. The results were predicted from an external calibration established for oil

and total glucosinolates (GLS) content (CRAW, Gembloux, Belgium). Three determinations were performed for each sample.

B – 6 Extraction and quantification of oil content and lipids composition

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 methanol/sulphuric acid/toluene (100/2.5/30, v/v/v) with 400 µg ml^{-1} of heptadecanoic acid as an internal standard. The mixture was shaken vigorously for 30 s, heated (95°C, 1 h), cooling on ice, and fatty acid methyl esters (FAMEs) were then extracted into 500 µL of hexane following the addition of 1 mL of water. After vigorous hand shaking (15 s) and centrifugation (2000 rpm, 5 min), 10 µL of the upper organic phase was analysed by gas chromatography (GC). If necessary, extracts were evaporated under nitrogen and dissolved into 50 µL of hexane before GC analysis. FAMEs were separated on a DB-WAX column (30 m x 0.25 mm i.d., 25 µm film, J&W Scientific Columns from Agilent Technologies Co., Palo Alto, CA, USA) and quantified with a flame ionisation detector using the recommendations of manufacturer (Agilent). To determine the mass of each fatty acid, the peak area was compared to the internal standard peak area.

B – 7 Two–dimensional electrophoresis (2–DE) and image analysis

Total proteins were extracted from 10 mg of mature seeds, without discarding none viable seeds, according to a protocol described by Gallardo *et al.* (2002a) (n = 6 for Control, n = 4 for LS70, LS53 and LS32). After 1 h incubation at room temperature in the thiourea/urea buffer, the extracts were centrifuged twice at 20 000 g, 4, for 10 min. Protein concentration was then measured according to Bradford (1976). Isoelectric focalisation was performed from 250 µg of proteins as described by Gallardo *et al.* (2007) using gel strips forming an immobilized non-linear pH 3 to 10 gradient (Immobiline DryStrip, 24 cm; GE Healthcare, Saclay, France) and proteins were separated in vertical polyacrylamide gels as described by Gallardo *et al.* (2002a). Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, Marne la Coquette, France) according to Mathesius *et al.* (2001). Gel image acquisition was performed using the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) at 700 nm with a resolution of 169 µm. Image analyses and spot volume quantification were

carried out with the Progenesis SameSpots v3.0 software (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) according to the manufacturer's protocol. Molecular weights (*Mr*) and isoelectric points (p*I*) were calculated according to the migration of standard proteins (Bio-Rad).

B – 8 Protein Identification by electrospray ionization liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Spots of interest were excised and washed several times with water and dried. Trypsin digestion was performed overnight with a dedicated automated system (MultiPROBE II, PerkinElmer). The gel fragments were subsequently incubated twice for 15 min in a 0.1% CH_3CN solution to allow extraction of peptides from the gel pieces. Peptide extracts were dried and dissolved in starting buffer for chromatographic elution, consisting of 3% CH_3CN and 0.1% HCOOH. Peptides were enriched and separated using lab–on–a–chip technology (Agilent) and fragmented using an on–line XCT mass spectrometer (Agilent). The software used to generate the peak list was Data Analysis for 6300 series Ion Trap LC/MS (v3.4; Bruker Daltonique). Identification were performed using X!Tandem program, developed by the Global Proteome Machine organisation (the GPM; http://www.thegpm.org/) and the NCBI non redundant protein sequence database filtered for *viridiplantae* entries (release 02/11/2012 v4; 1945867 entries). Parameters used in X!Tandem search were: enzyme, trypsin; number of missed cleavages, 1; fixed modifications, carbamidomethylation of cysteine; variable modifications, oxidation of methionine; lower window mass tolerance for precursor ions, –1 Da; upper window mass tolerance for precursor ions, +2.5 Da; mass tolerance for fragment ions, 0.5 Da. Identified proteins were filtered using the X!Tandem pipeline (http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline/) with the following criteria: i) two or more different peptides with an E value smaller than 0.05 and ii) a protein log E value (the log of the product of unique peptide E values) smaller than -4. The identified proteins for the spot 233 were filtered on the basis of only one peptide and subsequently a protein log E value smaller than -1 because of the small size of the identified protein (79 AA). The results of proteomic analysis and protein identification were incorporated into PROTICdb database (Ferry-Dumazet *et al.*, 2005), a web-based application that allows storing and querying information related to proteomic analysis (http://moulon.inra.fr/protic/sms).

Table V.1 Yield components and contents of oil, proteins and glucosinolates in mature seeds produced by plants grown under Control, LS70, LS53 or LS32 conditions (Dubousset *et al.,* 2010).

	Total seed DW produced per plant (g)	No. of viable seeds produced per plant	Maximal pod length (cm)	Number of pods per plant	Thousand seed weight (mg)	Oil content in mature seeds (% DW)	Protein content in mature seeds (% DW)	Glucosinolate content in mature seeds (µmol g^{-1}DW)
Control	11.6 ± 0.61	2398 ± 146	8.3 ± 0.1	178 ± 4	4694 ± 39.50	45 ± 0.5	23 ± 0.3	14 ± 0.4
LS70	11.7 ± 0.49	2502 ± 109	**7.9 ± 0.1**	187 ± 7	4583 ± 53.02	45 ± 0.2	23 ± 0.2	**8.3 ± 0.5**
LS53	11.6 ± 0.81	2325 ± 206	8.4 ± 0.1	165 ± 9	4928 ± 140.1	**43 ± 0.3**	*22 ± 0.2*	**2.5 ± 0.4**
LS32	**6.30 ± 0.66**	**313 ± 233**	*7.5 ± 0.8*	162 ± 6	**3124 ± 293.9**	**32 ± 1.3**	**21 ± 0.3**	**4.2 ± 0.9**

The values represent mean ± SE (*n* = 6 for control, *n* = 4 for LS70, LS53 and LS32). Significant differences from the control value are indicated in bold ($p < 0.05$). LS70, LS53 and LS32 treatments respectively correspond to a sulphur limitation applied when the first petals falls (GS70), when the main inflorescence emerged (GS53) and at the beginning of bolting stage (GS32).

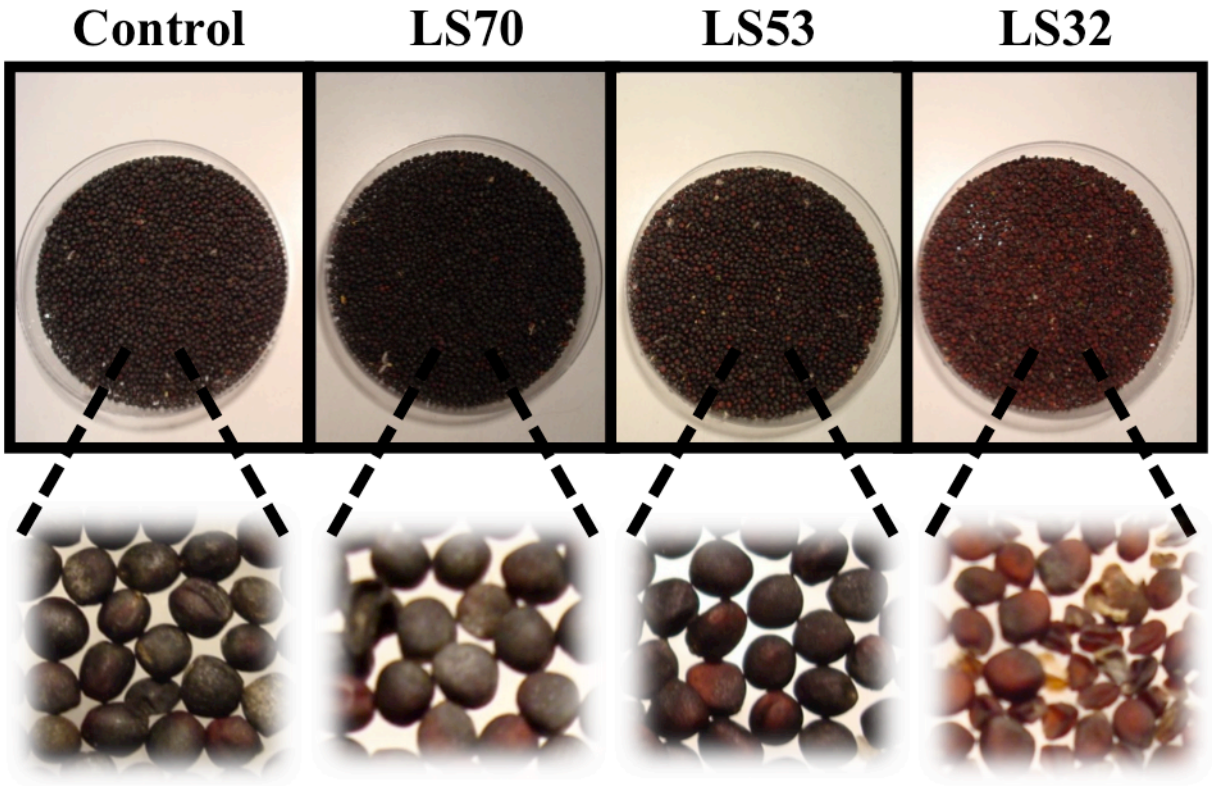


Figure V.1 Morphology of mature seeds harvested from plants grown under Control, LS70, LS53, or LS32 conditions.

LS70, LS53 and LS32 treatments correspond to a sulphur limitation applied when the first petals falls (GS70), when the main inflorescence emerged (GS53) and at the beginning of bolting stage (GS32).

B – 9 Statistics

The variability of the results is expressed by the average values for all biological replicates (*n* = 3, 4 or 6) ± standard error (SE). The effects of LS70, LS53 and LS32 treatments compared to the Control were subjected to statistical analysis using Microsoft® Excel 2008/XLSTAT©-Pro (Version 7.2, Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA). With a statistical significance postulated at $p < 0.05$, the Mann–Whitney test was done to compare data obtained for LS and Control seeds. Protein spots specifically induced and repressed in LS70, LS53 and LS32 seeds were subsequently analysed by electrospray ionization liquid chromatography–tandem mass spectrometry.

C Results

C – 1 Impact of S limitation on yield components, quality and S status in mature seeds

Seed yield was significantly reduced by S limitation applied at the bolting stage (LS32 treatment) but not by S limitation applied at later stages (LS53 and LS70 conditions) (Table V.1). The number of pods per plant was not affected, but the thousand seed weight was reduced by 33% in LS32 treatment compared to the control (Table V.1). Similarly, LS32 treatment led to an altered morphology of seeds (Figure V.1).

Total oil content was not affected by LS70 treatments but was reduced in LS53 and LS32 seeds (Table V.1). Whatever the S fertilization treatment, the main fatty acid was oleic acid (C18:1) (Figure V.2, Table V.S1). The LS70 treatment had no effect on fatty acid composition in mature seeds. On the other hand, LS32 treatment led to a significant reduction of all C18 derivatives. For instance, the quantity of C18:1 in LS32 seeds decreased by 32% compared to the control. In contrast, quantities of palmitoleic acid (C16:1) and behenic acid (C22:0) increased noticeably in response to LS32 treatment. While the behenic acid concentration slightly increased in response to LS53 treatment, the concentration of stearic (C18:0), linoleic (C18:2) and linolenic (C18:3) acids were significantly reduced in comparison to control but to a lesser extent than in LS32 conditions (Figure V.2, Table V.S1). The $\omega 6/\omega 3$ ratio was significantly higher in LS32 seeds compared to the control (Figure V.2). The protein content was also significantly lower only in LS32 seeds compared to the control (Table V.1).

As expected, the three LS treatments led to significant reductions of S content in mature seeds (up to -67% in LS32 seeds compared to the control), together with reductions of S-sulphate (-93% in LS32 seeds) and glucosinolates contents (-70% in LS32 seeds) (Tables V.1

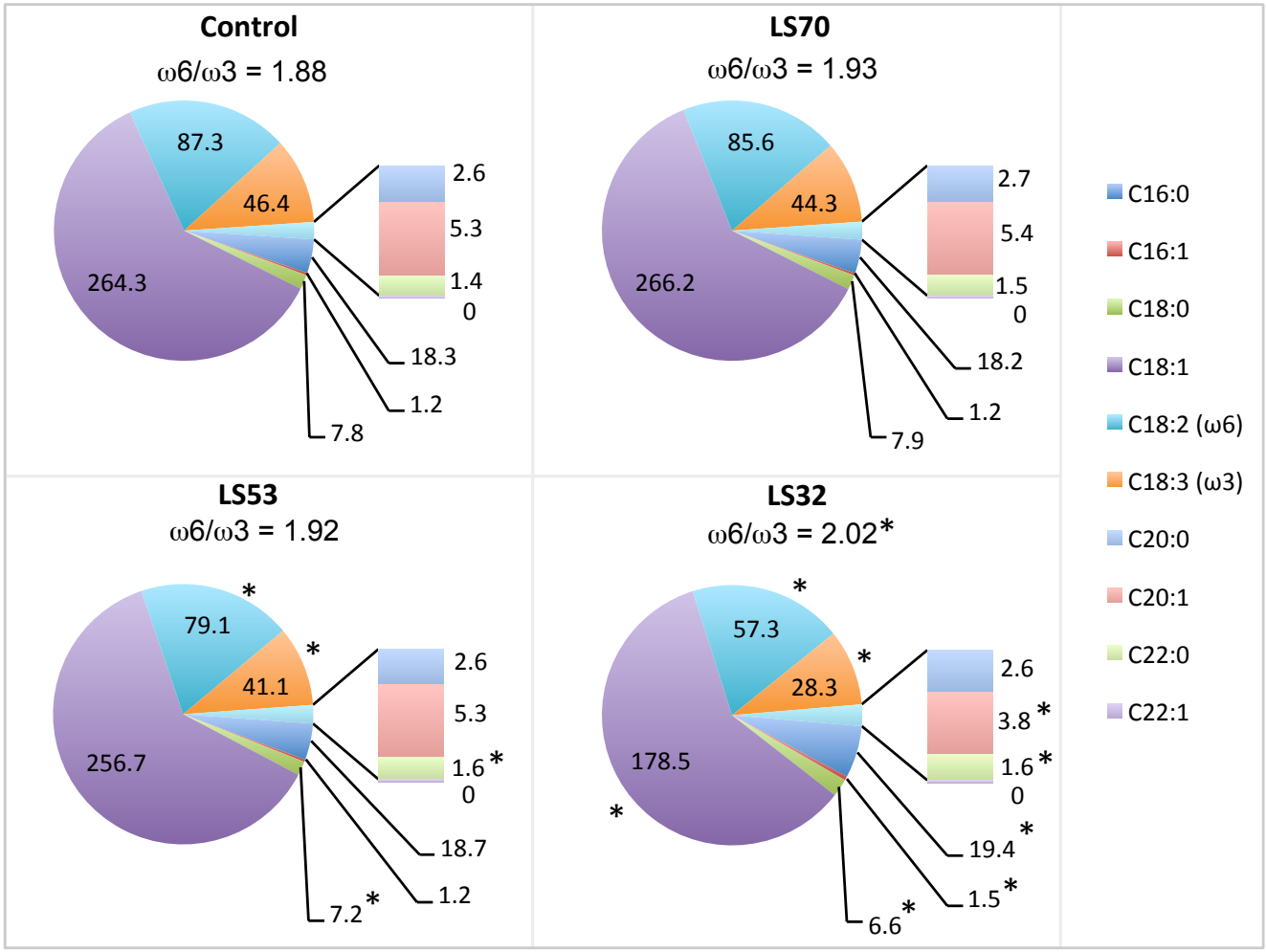


Figure V.2 Fatty acid composition of mature seeds harvested from plants grown under Control, LS70, LS53, or LS32 conditions.

The values are shown as mean in mg g^{-1}DW (*n* = 6 for control, *n* = 4 for LS70, LS53 and LS32). The ω6/ω3 ratio are indicated above the pie charts. *: Significant differences from the control value ($p < 0.05$). Means ± SE are indicated in Table V.S1.

Table V.2 Sulphur status of mature seeds harvested from plants grown under Control, LS70, LS53, or LS32 conditions.

	S content (µmol g^{-1}DW)	S-sulphate content (µmol g^{-1}DW)	S-glutathione content (µmol g^{-1}DW)	Free S-cysteine content (nmol g^{-1}DW)	S-sulphate/S (%)
Control	121.74 ± 1.81	18.38 ± 0.67	2.46 ± 0.21	2.31 ± 0.13	15.12 ± 0.56
LS70	**88.01 ± 2.84**	**11.58 ± 1.04**	2.16 ± 0.24	2.42 ± 0.50	13.13 ± 1.01
LS53	**62.31 ± 4.59**	**4.63 ± 0.82**	**1.59 ± 0.32**	**3.49 ± 0.11**	**7.29 ± 0.92**
LS32	**39.46 ± 2.75**	**1.28 ± 0.27**	**0.90 ± 0.10**	**4.38 ± 0.38**	**3.21 ± 0.62**

The values are shown as mean ± SE (for S and S-sulphate contents: *n* = 6 for control and *n* = 4 for LS70, LS53 and LS32; For S-glutathione and Free S-cysteine content: *n* = 3). Significant differences from the control values are indicated in bold ($p < 0.05$).

and V.2). As for glutathione content, the S-sulphate/S-total ratio was significantly reduced in LS53 and LS32 seeds compared to the control, but was similar to the control in LS70 seeds. Interestingly, free cysteine content was significantly higher in LS53 and LS32 compared to control seeds (Table V.2).

C – 2 Modifications in the seed proteome in response to S limitation

The proteomic analysis resulted in 495 protein spots detected in mature seeds. Among them, 208 protein spots were differentially expressed in mature seeds of S-limited plants compared to the control (Figure V.3). The three LS treatments applied at different growth stages led to different proteomic responses at the mature seed level: only a small proportion of the modulated proteins (17 spots i.e. 8.17%) was shared by all treatments (Figure V.4A). The number of proteins presenting a significant change in abundance increased with the precocity of S limitation: 69 modulated spots for LS70 seeds *versus* 144 modulated protein spots for LS32 seeds compared to the control (Figure V.4A,B). Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) enabled the identification of 83% of the 208 modulated protein spots. All major proteins (i.e. SSP) detected in the 2-DE gels were identified in this study (Figure V.3), thus providing a global view of the SSP component of oilseed rape. Except for the proteins that were not identified nor associated to a functional group (Table V.S2), these spots could be classified in 11 groups, corresponding to their functional role (Figure V.4B, Tables V.3-V.6).

C – 2.a Modulations of SSP, proteins involved in protein synthesis and processing, and LEA

The proteomic analysis of mature seeds revealed that S limitation led to significant modulations of SSP accumulation (Table V.3). The number of changed SSP spots increased with the precocity of S-deficiency: only 11 SSP spots were affected by LS70 treatment *versus* 42 SSP spots for LS32 treatment (Figure V.4B, Table V.3, Figure V.5A). LS70 seeds showed a significant accumulation of SSP spots identified as BnC1 subunits (about +1.5 fold), which are relatively poor in cysteine and methionine (representing 1.84% of total amino acids in this protein). In contrast, the relative abundance of protein spots identified as cruciferin Cru4 subunits, a S-rich SSP (S-amino acids represent 2.80% of total amino acids) decreased in LS70 seeds. LS53 seeds were also characterized by an accumulation of BnC1 and a decrease in Cru4 abundance, but these changes were more pronounced than in LS70 seeds. Markedly,

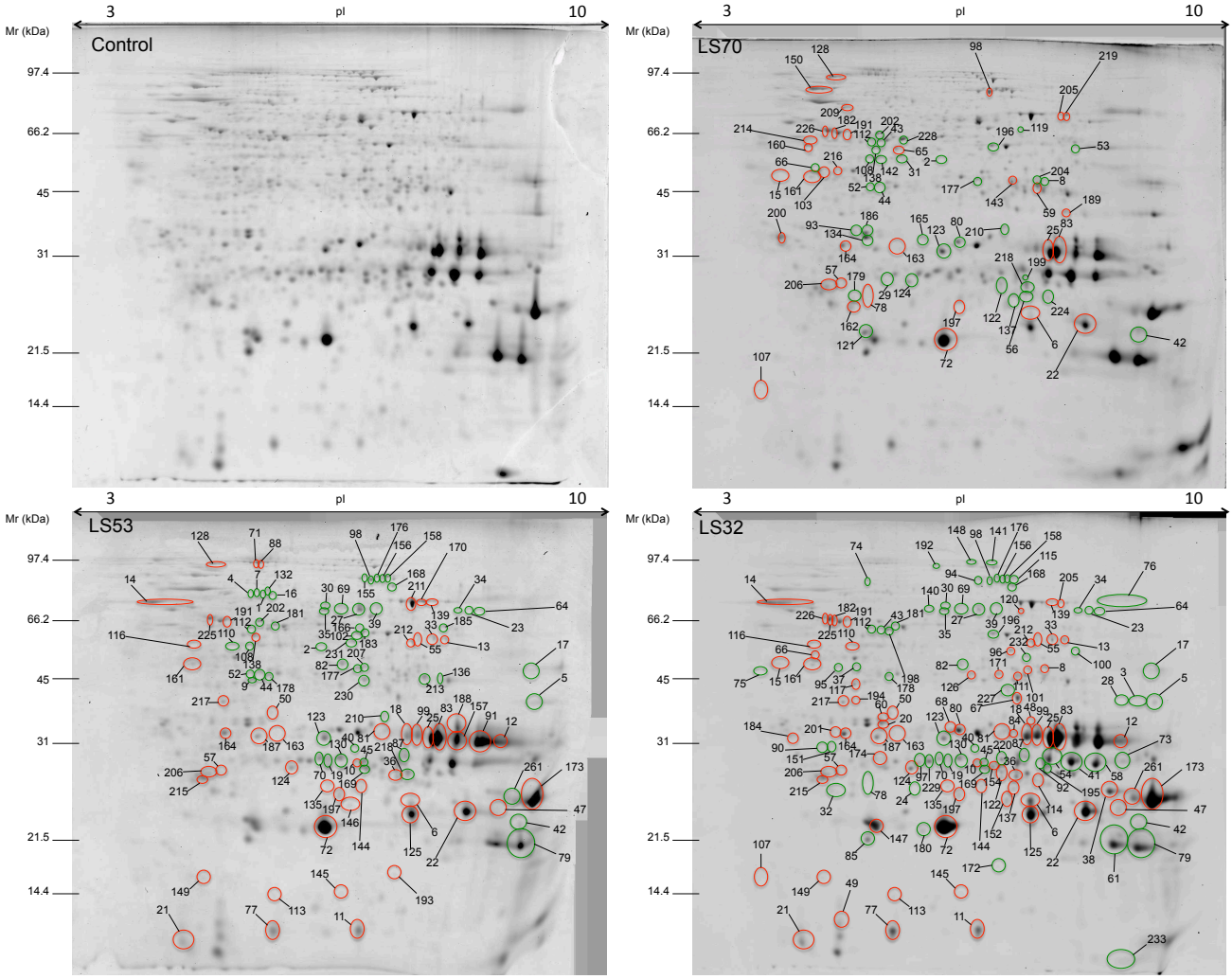


Figure V.3 Two dimensional electrophoresis gels (2-DE) of total proteins from control, LS70, LS53 and LS32 mature *Brassica napus* seeds.

For each treatment, the induced and repressed protein spots are circled in red and green, respectively, on the corresponding gel image. These spots were identified by LC-MS/MS and are listed in Tables 3 to 6. Unidentified spots or spots that are not associated to a functional group are listed in Table V.S2. *Mr*: Molecular Weight; p*I*: isoelectric point.

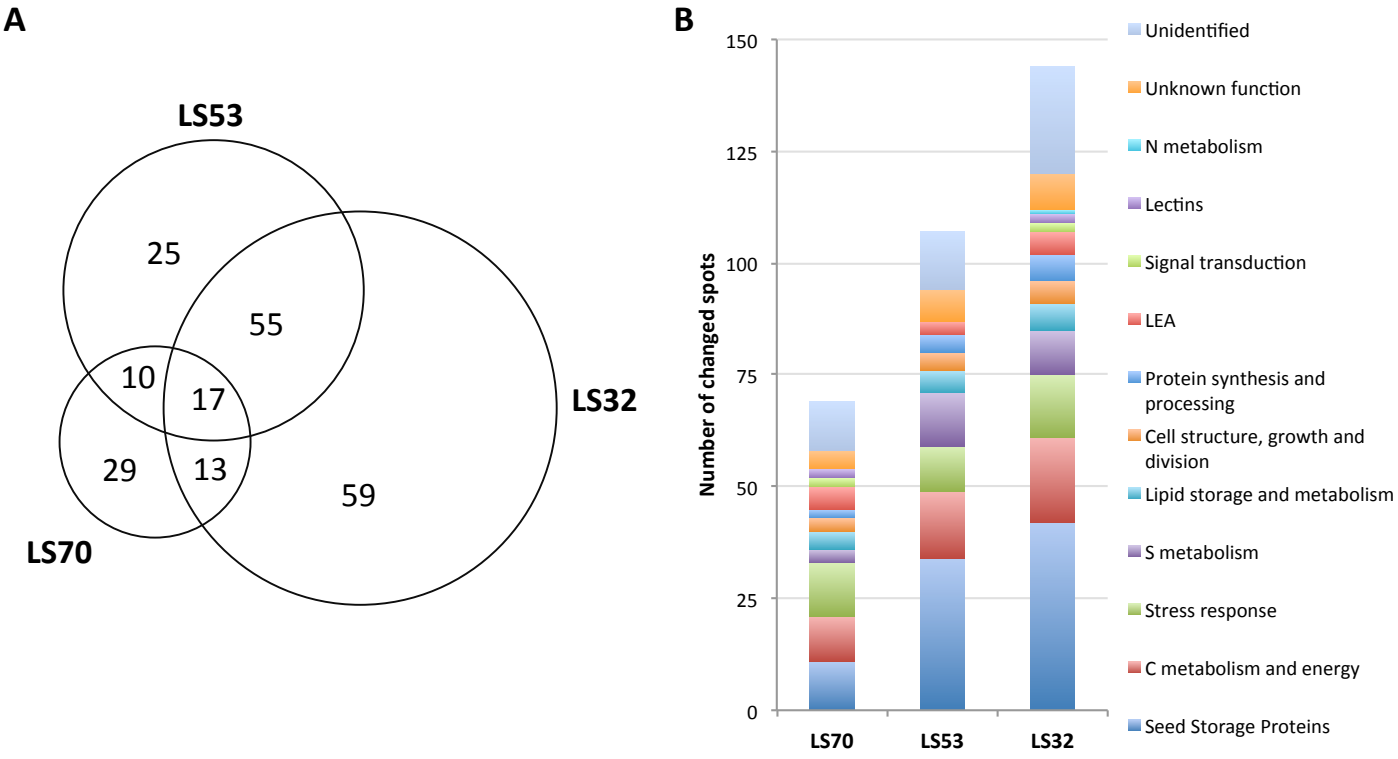


Figure V.4 (A) Distribution of the 208 proteins presenting a significant variation of abundance in LS70, LS53 and LS32 seeds compared to the control, (B) Number and distribution of the functional groups of proteins changed in LS70, LS53 and LS32 seeds compared to the control.

an early S limitation (LS32 treatment) drastically affects Cru4 accumulation and significantly increased the abundance of SSP spots that correspond to BnC1. Surprisingly, the majority of protein spots corresponding to a S-rich SSP (Cru1, 3.34% S-amino acids in total amino acids) increased in abundance in LS53 and LS32 seeds compared to the control. LS53 and LS32 treatments also led to an accumulation of low *Mr* spots that correspond to BnC1 (Spots n°11 and 77) and Cru1 (Spots n°21 and 49) in mature seeds.

In order to compare the contribution of the different SSP to the total protein pool depending on the treatment, the proportion of each SSP in the total protein content was calculated (Figure V.5B). Interestingly, the global contribution of SSP to the total protein content was significantly increased in LS53 and LS32 seeds compared to the control. This increase was principally associated with a higher relative accumulation of BnC1 in LS53 seeds and BnC1 and Cru1 in LS32 seeds, whereas the accumulation of Cru4 was lower in LS53 and LS32 seeds than in the control (Figure V.5B). Considering the percentage of S-amino acids in each SSP and in the other proteins, the theoretical proportions of S-amino acids found in total proteins from control and S-limited seeds were also calculated (Figure V.6A). This proportion significantly decreased in LS70, LS53 and LS32 seeds compared to the control. In accordance with these calculations, the S-proteic content measured by mass spectrometry after soluble protein extraction and purification was significantly lower in LS70, LS53 and LS32 seeds than in control seeds (up to -49% for LS32 treatment, Figure V.6B). However, the S-proteic content, which accounts for 51.3% of total S in control seeds, respectively represented 59.9%, 57.9% and 80.9% of total S in LS70, LS53 and LS32 seeds (Figure V.6B).

Among proteins with a function in protein synthesis, proteomic analysis revealed a reduction of translation initiation factor accumulation (Spots n°108, 110 and 142) in LS70 and LS53 seeds compared to the control and a spot corresponding to elongation factor 1α (EF1α, spot n°100) was less abundant in LS32 seeds. Conversely, spot n°110 increased in LS32 seeds compared to control (1.3 fold). An accumulation of two protein spots identified as 60S acidic ribosomal protein (Spots n°194 and 217) was observed in LS32 seeds while the relative abundance of a chaperonin (Spot n°140) and a glycosyl hydrolase family 38 protein (Spot n°168), both involved in protein processing, decreased in LS32 seeds (Table V.3).

Sulphur limitation also led to differential accumulation of numerous protein spots identified as late embryogenesis abundant proteins (LEA). Among them, three spots very

Table V.3 Significantly changed proteins in LS70, LS53 and LS32 mature seeds identified by mass spectrometry as seed storage proteins, proteins involved in protein synthesis and processing and LEA.

Spot n°	Protein name	LS70		LS53		LS32		Species	NCBI accession numbers	log (E value)	CV (%)	Exp. *pI*	Exp. *Mr* (kDa)	Theo. *pI*	Theo. *Mr* (kDa)
Seed Storage Proteins															
4	Convicilin	-3.3		-5.5	**	-2.0		*Ps*	7339551	-20.0	16	5.4	77.7	5.5	72.06
5	Cruciferin / CRU1	1.3		-2.4	**	-4.4	**	*Bn*	461840	-10.2	4	8.8	42.6	7.64	56.50
6	Cruciferin / BnC1	1.6	*	2.2	**	5.5	**	*Bn*	1345840	-45.6	21	6.6	24.2	6.84	53.82
7	Convicilin	-2.8		-4.6	**	-1.9		*Ps*	227928	-18.4	12	5.4	78.1	5.49	71.41
9	Legumin	-4.2		-4.6	*	-1.5		*Ps*	126161	-11.4	12	5.4	48.2	6.21	59.27
10	Cruciferin / CRU1	1.5		2.2	**	3.9	**	*Bn*	461840	-10.6	9	6.1	30.4	7.64	56.50
11	Cruciferin / BnC1	1.0		2.5	**	3.6	**	*Bn*	1345840	-10.4	6	6.1	12.2	6.84	53.82
12	Cruciferin / BnC1	1.9		3.2	**	2.0	*	*Bn*	1345840	-23.5	20	8.0	34.4	6.84	53.82
13	Cruciferin / BnC1 homologue	-1.2		1.5	*	2.6	**	*Bn*	294979712	-35.5	29	6.9	60.0	6.6	51.32
18	Cruciferin / BnC1	1.4		2.1	**	3.1	**	*Bn*	1345840	-23.7	19	6.5	35.3	6.84	53.82
21	Cruciferin / CRU1	1.2		2.6	**	3.0	**	*Bn*	461840	-17.7	14	5.0	11.4	7.64	56.50
22	Cruciferin / BnC1	1.7	*	2.6	**	3.0	**	*Bn*	1345840	-50.0	25	7.3	23.2	6.84	53.82
25	Cruciferin / BnC1	1.7	*	2.5	**	3.0	**	*Bn*	1345840	-40.2	20	6.8	33.9	6.84	53.82
32	Cruciferin / CRU1	1.1		-1.3		-2.6	**	*Bn*	461840	-36.6	30	5.2	26.2	7.64	56.50
33	Cruciferin / BnC1	1.2		1.3	*	2.8	**	*Bn*	1345840	-45.1	32	6.8	60.0	6.84	53.82
36	Cruciferin	1.5		2.0	*	2.7	**	*Bn*	12751302	-7.6	6	6.4	28.5	8.13	54.38
38	Cruciferin / CRU1	1.2		1.3		2.7	**	*Bn*	461840	-35.2	22	7.8	26.1	7.64	56.50
41	Cruciferin / CRU4 homologue	1.1		-1.1		-2.4	**	*Al*	297843196	-60.5	18	7.0	30.1	7.09	50.65
42	Cruciferin / CRU4	-2.1	*	-2.6	**	-2.4	**	*Bn*	17807	-32.9	59	8.5	21.7	8.98	20.36
45	Cruciferin / CRU4	1.0		-1.2	*	-2.4	**	*Bn*	461841	-12.6	10	6.1	30.6	7.7	51.38
47	Cruciferin / CRU1	1.3		1.7	*	2.5	**	*Bn*	461840	-9.8	10	8.1	23.8	7.64	56.50
48	Cruciferin / CRU1	-1.2		-1.1		2.1	*	*Bn*	461840	-32.7	17	6.6	38.5	7.64	56.50
49	Cruciferin / CRU1	1.0		2.0		2.4	*	*Bn*	461840	-24.7	12	5.2	12.6	7.64	56.50
52	Legumin	-1.8	**	-2.4	**	-2.0		*Ps*	294979728	-6.0	10	5.4	49.6	6.06	56.59
54	Cruciferin / CRU4	1.1		-1.3		-2.2	**	*Bn*	17805	-60.1	30	6.8	30.7	8.84	45.54
55	Cruciferin / BnC1	1.4		1.5	**	2.4	**	*Bn*	1345840	-19.1	19	6.7	60.2	6.84	53.82
58	Cruciferin / CRU4	-1.2		-1.2		-2.3	**	*Bn*	17805	-71.0	31	7.5	30.3	8.84	45.54
61	Cruciferin / CRU4	1.1		-1.1		-2.0	**	*Bn*	17807	-44.4	60	7.9	19.4	8.98	20.36
72	Cruciferin / BnC1	1.7	*	2.2	**	2.1	**	*Bn*	1345840	-45.5	24	5.8	21.2	6.84	53.82
73	Cruciferin / CRU4	1.2		-1.0		-1.8	**	*Bn*	461841	-39.0	22	8.1	30.9	7.7	51.38
77	Cruciferin / BnC1	-1.1		1.7	*	1.9	**	*Bn*	1345840	-16.1	10	5.5	12.1	6.84	53.82
79	Cruciferin / CRU4	1.2		-1.3	*	-1.8	**	*Bn*	461841	-39.9	20	8.4	19.1	7.7	51.38
83	Cruciferin / BnC1	1.5	*	1.9	**	2.1	**	*Bn*	1345840	-35.8	21	6.8	34.3	6.84	53.82
85	Cruciferin	-1.0		-1.2		-2.0	**	*At*	15219584	-12.9	10	5.4	20.0	5.47	49.67
87	Cruciferin / CRU4 homologue	-1.2		-1.5	*	-2.0	**	*Al*	297843196	-55.6	17	6.5	31.6	7.09	50.65
91	Cruciferin / BnC1	1.4		2.0	**	1.4		*Bn*	1345840	-25.3	22	7.6	33.7	6.84	53.82
92	Cruciferin / CRU4 homologue	-1.1		-1.1		-2.0	**	*Al*	297843196	-11.3	14	6.7	30.1	7.09	50.65
99	Cruciferin / BnC1	1.2		1.5	*	1.9	**	*Bn*	1345840	-19.6	14	6.6	35.4	6.84	53.82
121	Cruciferin / BnC1	-1.5	*	1.2		1.1		*Bn*	1345840	-38.9	17	5.4	22.0	6.84	53.82
125	Cruciferin / BnC1	1.3		1.6	*	1.8	*	*Bn*	1345840	-111.1	30	6.6	22.9	6.84	53.82
132	Convicilin	-1.7		-1.7	**	-1.6		*Ps*	7339551	-27.8	18	5.5	78.4	5.5	72.06
147	Cruciferin / BnC1	-1.2		1.2		1.3	*	*Bn*	1345840	-41.6	19	5.4	21.7	6.84	53.82
157	Cruciferin	1.2		1.6	*	1.3		*Bn*	12751302	-40.3	16	7.1	34.8	8.13	54.38
173	Cruciferin / CRU1	1.4		1.3	*	1.5	**	*Bn*	461840	-81.6	32	8.7	24.4	7.64	56.50
174	Cruciferin / CRU1	-1.3		1.1		1.2	**	*Bn*	461840	-17.6	13	5.5	31.5	7.64	56.50
180	Cruciferin / BnC1	-1.0		1.1		-1.4	**	*Bn*	1345840	-19.6	17	5.7	21.1	6.84	53.82
188	Cruciferin / CRU1	1.1		1.4	*	1.5		*Bn*	461840	-75.5	21	7.1	36.9	7.64	56.50
195	Cruciferin / CRU4	-1.0		1.0		-1.4	**	*Bn*	461841	-60.8	24	6.7	29.7	7.7	51.38
197	Cupin	1.5	*	1.4	*	1.4	**	*At*	15226403	-10.4	9	5.9	25.5	5.83	55.71
199	Cruciferin / CRU4	-1.4	**	-1.2		-1.0		*Bn*	461841	-22.0	16	6.5	30.1	7.7	51.38
210	Cruciferin / CRU1	-1.3	*	-1.4	*	-1.1		*Bn*	461840	-10.8	8	6.3	39.4	7.64	56.50
233	Napin	-2.1		-3.1		-4.7	*	*Bn*	243209	-1.6	15	8.1	10.4	8.31	8.91
261	Cruciferin / CRU1	1.4		2.0		1.5	*	*Bn*	461840	-55.1	30	8.4	25.2	7.64	56.50

close to a LEA from *Arabidopsis thaliana* (Spots n°182, 191 and 225; gi:15231736) specifically expressed during seed ripening (The Arabidopsis Information Resource, TAIR) increased significantly in LS seeds (Table V.3).

C – 2.b Proteome changes related to S, N metabolisms, cell structure, growth and signal transduction

In our experiment, the protein spots corresponding to myrosinase were significantly reduced in LS53 and LS32 mature seeds, whereas a differential accumulation of Myrosinase-Binding Proteins (MBPs) (Table V.4) according to the period of S deficiency was revealed. The thiamine biosynthetic enzyme THI1 decreased significantly in LS53 and LS32 seeds compared to the control (Spot n°40, Table V.4). This enzyme is involved in thiamine synthesis from glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) and cysteine. Thiamine is the precursor of the coenzyme thiamine pyrophosphate required for the activity of some decarboxylases such as pyruvate decarboxylase, pyruvate dehydrogenase, pyruvate oxidase or transketolase (Lindqvist & Schneider, 1993). THI1 is also suggested to be involved in mitochondrial DNA damage tolerance in plant cells (Machado *et al.*, 1996).

While the secondary S metabolism appears to be highly modulated in seeds subjected to S-deficiency, only weak changes associated to primary S metabolism were observed: two protein spots corresponding to methionine synthase were significantly less abundant in LS53 and LS32 seeds compared to the control (Spots n°158 and 176, Table V.4).

A protein spot related to N metabolism identified as a glycine cleavage T-protein, involved in glycine conversion to serine in the course of photorespiration, is significantly reduced in LS32 seeds compared to the control (Spot n°37, Table V.4). We also observed that the three S limitation treatments led to an increased accumulation of β-tubulin in mature seeds (Spots n°160, 161 and 214; Table V.4) and to differential accumulation of actin isoforms. The abundance of 51.7 kDa actin (Spot n°95) was significantly reduced in LS32 mature seeds. This protein is homologous to actin 7 from *A. thaliana* (99% similarity, At5G09810, gi:15242516; TAIR) whose mutants are defective in germination and root growth (blastp from National Center for Biotechnology Information (NCBI)). Conversely, LS32 seeds showed an accumulation of a 24.8 kDa actin, homologous to actin 11 from *A. thaliana* (91% similarity, At3G12110, gi:15229955; TAIR) expressed predominantly during reproductive development.

Table V.3 (continued from previous page)

Spot n°	Protein name	LS70		LS53		LS32		Species	NCBI accession numbers	log (E value)	CV (%)	Exp. *pI*	Exp. *Mr* (kDa)	Theo. *pI*	Theo. *Mr* (kDa)
Protein synthesis and processing															
100	Elongation factor 1 alpha	1.2		-1.4		-1.6	*	*Bn*	241740165	-6.3	7	7.1	56.9	9.19	49.48
108	Translational initiation factor	-1.4	**	-1.3	*	1.3		*At*	18400210	-26.7	19	5.4	58.0	5.47	46.70
110	Translational initiation factor	-1.2		-1.4	**	1.3	**	*At*	15221761	-17.7	15	5.3	58.0	5.45	46.76
140	Chaperonin	-1.1		-1.1		-1.7	**	*At*	15229866	-16.6	16	5.8	71.7	6.03	59.78
142	Translational initiation factor	-1.4	**	-1.1		1.2		*At*	18400210	-30.3	22	5.5	58.1	5.47	46.70
168	Glycosyl hydrolase family 38 protein	1.0		-1.2	*	-1.5	**	*Al*	297807421	-35.5	12	6.4	80.6	6.21	116.02
194	60S acidic ribosomal protein	1.2		1.1		1.5	**	*At*	15229706	-18.1	25	5.3	42.9	5.05	34.39
217	60S acidic ribosomal protein	1.2		1.2	*	1.3	**	*At*	15229706	-21.1	37	5.2	42.8	5.05	34.39
LEA															
98	Late embryogenesis-abundant protein	1.3	*	-1.1	*	-1.5	**	*At*	15227965	-11.5	2	6.2	83.3	5.78	67.20
137	Late embryogenesis-abundant protein 1b	-1.4	*	-1.0		1.2	*	*Bn*	79150665	-13.6	13	6.4	26.6	6.02	16.67
182	Late embryogenesis-abundant protein	1.2	*	1.1		1.5	**	*At*	15231736	-10.6	7	5.2	67.5	5.29	52.08
191	Late embryogenesis-abundant protein	1.3	*	1.3	*	1.5	**	*At*	15231736	-10.1	9	5.2	66.6	5.29	52.08
200	Seed maturation protein	1.3	*	1.0		-1.1		*At*	15228768	-9.3	9	4.7	37.6	4.73	26.74
225	Late embryogenesis-abundant protein	1.2		1.2	**	1.3	**	*At*	15231736	-16.0	10	5.1	67.2	5.29	52.08

Significant ANOVA was followed by a Mann–Whitney test ($p < 0.05$) carried out on the normalised spot volumes ($n = 6$ for control, $n = 4$ for LS70, LS53 and LS32). Values indicate fold changes in protein abundance in LS seeds compared to control seeds in a linear scale. *, **: Significant differences from the control were at $p < 0.05$ or $p < 0.01$, respectively. The assigned best–matched protein is listed with the organism in which it was identified and its GenBank protein accession number. The log (Evalue), the percentage of sequence coverage (CV) and experimental (Exp.) and theoretical (Theo.) *pI* / *Mr* obtained are also indicated.

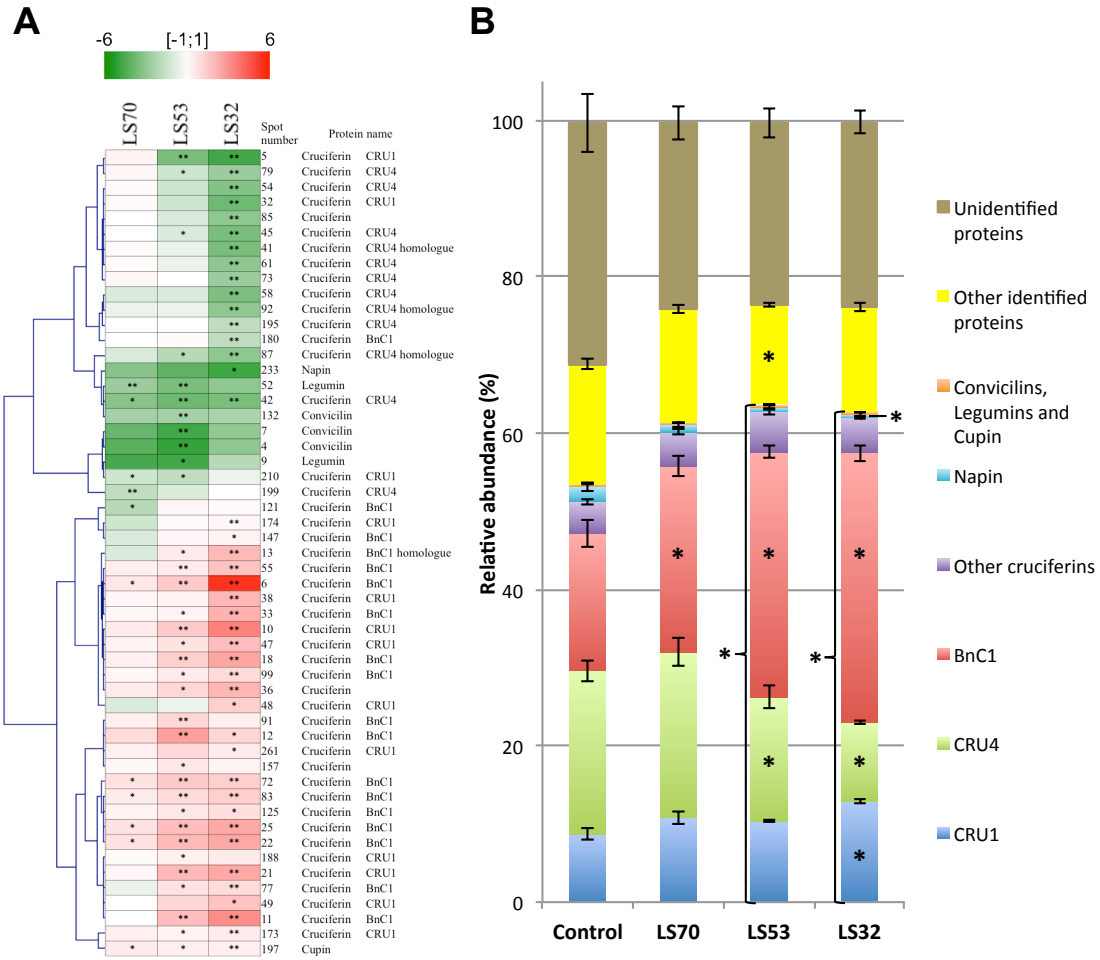


Figure V.5 Adaptation of seed storage proteins (SSP) accumulation in response to LS70, LS53 and LS32 treatments.

(A) Clustering of expression profiles of significantly modulated SSP identified by mass spectrometry in LS70, LS53 and LS32 mature seeds compared to the control ($n = 6$ for control, $n = 4$ for LS70, LS53 and LS32). Proteins up- and down-regulated in the whole seed are marked in red and green, respectively (colour code on the top). (B) Relative abundance of the different classes of SSP and other proteins in the total protein content of *Brassica napus* mature seeds grown under Control, LS70, LS53 or LS32 conditions. The values correspond to the mean ± SE ($n = 6$ for control, $n = 4$ for LS70, LS53 and LS32). (A-B) *, **: Significant differences from the control were at $p < 0.05$ or at $p < 0.01$, respectively.

The proteomic analysis also revealed changes in the expression of some proteins involved in signal transduction: a guanine nucleotide-binding protein (Spot n°189) and an importin α (Spot n°226) both accumulated in LS70 seeds compared to the control. In addition to the latter, a 14-3-3 protein (Spot n°184) also accumulated in LS32 seeds compared to control seeds (Table V.4).

C – 2.c Modulations of proteins involved in lipid storage, C metabolism and Energy

Different classes of lipid storage associated proteins were modulated in LS seeds (Table V.5). The abundance of two protein spots corresponding to caleosins (Spots n°19 and 97), a minor group of integral lipid body proteins able to bind Ca^{2+} (Næsted *et al.*, 2000), and to PAP3 (Plastid-lipid associated protein 3, spot n°75) was decreased in LS53 and further in LS32 seeds, while these protein spots were not significantly affected by LS70 treatment (Table V.5). Nevertheless, protein spots corresponding to stereoleosins did not exhibit the same patterns, and were differentially regulated by S restriction treatments.

The three S limitation treatments applied in our study led to substantial modulations of numerous spots related to C metabolism as depicted in Figure V.7 (see also Table V.5). LS70 seeds showed a reduction of UDP-glucose pyrophosphorylase (Spot n°43), phosphoglycerate kinase (PGK; spot n°44), enolase (Spot n°228), alcohol dehydrogenase (Spot n°177) and of the β-subunit of mitochondrial F1 ATP synthase (Spot n°202). Conversely, the abundance of aconitase (Spot n°57) and malic enzymes (Spots 205 and 219) increased in LS70 and LS53 seeds compared to control. In LS53 seeds, there was also an accumulation of β-glucosidases (Spots n°14, 170 and 211), a reduction of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 2 (GAPDH; spot n°213), succinate dehydrogenase (Spot n°16), cytosolic malate dehydrogenase (MDH, spot n°230), and glyoxysomal malate synthase (Spots n°23, 34 and 64). Interestingly, as for LS53 seeds, LS32 seeds showed an over–accumulation of citrate synthase (Spot n°212), aconitase (Spots n°57 and 148), and also isocitrate dehydrogenase (Spot n°96), the first TCA cycle enzymes, and a lower abundance of glyoxysomal malate synthase (Spots n°23, 34 and 64). In LS32 seeds, there was also an accumulation of phosphoglucose isomerase (Spot n°120), fructose bisphosphate aldolase (Spot n°101), and GAPDH (Spot n°171), three enzymes involved in the first steps of glycolysis. Cytosolic MDH (Spot n°111) is also over-accumulated in LS32 seeds (about +1.5 fold) compared to control.

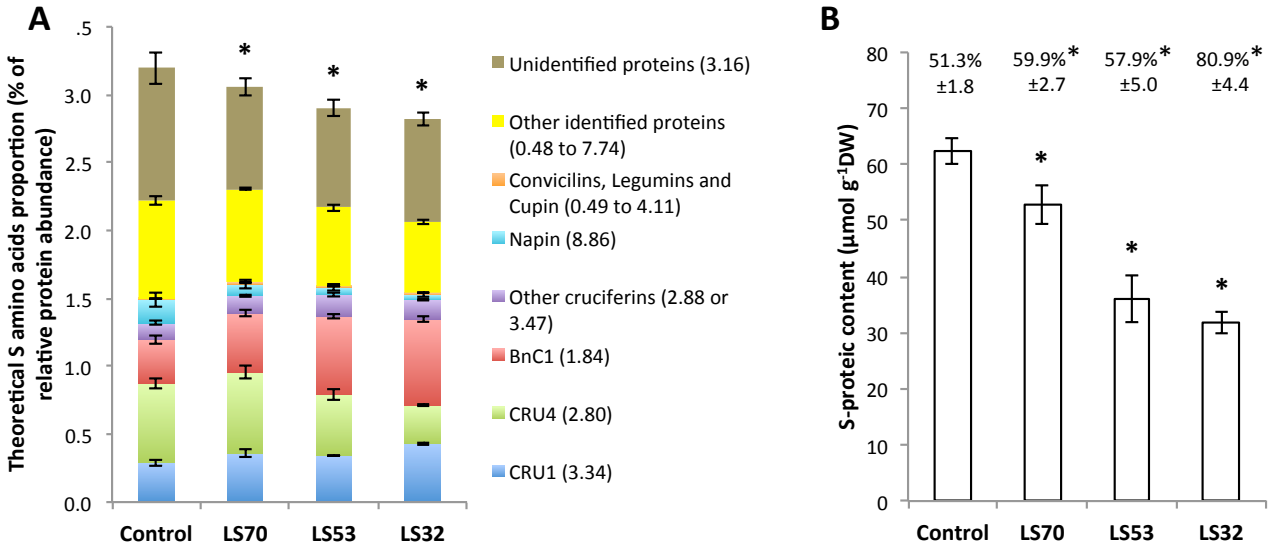


Figure V.6 Effect of LS70, LS53 and LS32 treatments on theoretical and experimentally measured sulphur content of mature seeds proteins.

(A) Theoretical S-amino acids proportion calculated as the sum of relative abundances multiplied by the S-amino acids (Cysteine and methionine) proportion of the corresponding protein, given next to protein name between brackets. (B) S-proteic content of mature seeds grown under Control, LS70, LS53 or LS32 conditions. For each treatment, the S-proteic/S ratio is shown directly above the corresponding bar. (A-B) The values correspond to the mean ± SE (*n* = 6 for control, *n* = 4 for LS70, LS53 and LS32). *: Significant differences from the control value ($p < 0.05$).

Table V.4 Significantly changed proteins in LS70, LS53 and LS32 mature seeds identified by mass spectrometry as involved in sulphur metabolism, in nitrogen metabolism, in cell structure, growth and division and in signal transduction.

Spot n°	Protein name	LS70		LS53		LS32		Species	NCBI accession numbers	log (E value)	CV (%)	Exp. *pI*	Exp. *Mr* (kDa)	Theo. *pI*	Theo. *Mr* (kDa)
S metabolism															
1	Myrosinase	-3.3		-7.5	**	-1.9		*Bn*	5459292	-12.8	11	5.5	77.7	6.32	60.42
17	Myrosinase-associated protein	-1.3		-2.1	**	-3.1	**	*Bn*	1216389	-50.9	38	8.7	51.2	8.47	41.82
27	Myrosinase 1	-1.1		-1.5	**	-3.0	**	*Bn*	310781304	-43.1	24	6.1	70.6	6.62	62.74
30	Myrosinase 2	-1.2		-1.6	**	-2.9	**	*Bn*	310781306	-25.5	18	5.9	71.8	6.45	62.72
31	Myrosinase-binding protein	-2.4	**	1.2		1.2		*Bn*	1655824	-31.4	9	5.6	57.4	5.48	99.46
35	Myrosinase	-1.1		-1.5	**	-2.7	**	*Bn*	127733	-36.0	23	5.8	71.4	6.62	62.74
40	Thiazole biosynthetic enzyme	-1.2		-1.5	*	-2.6	**	*At*	15239735	-9.5	18	6.0	33.2	5.82	36.66
65	Myrosinase-binding protein	2.1	**	1.1		-1.1		*Bn*	1655826	-25.3	10	5.6	59.7	5.77	67.30
69	Myrosinase	-1.3		-1.6	**	-2.2	**	*Br*	56130949	-30.2	19	5.9	71.4	6.65	62.97
71	Myrosinase-binding protein	1.2		1.6	*	-1.4		*Bn*	1655824	-60.8	27	5.4	91.5	5.48	99.46
76	Myrosinase	1.1		-1.3		-2.0	**	*Bn*	127733	-8.2	6	8.0	74.8	6.62	62.74
88	Myrosinase-binding protein	1.2		1.5	*	-1.3		*Bn*	1655824	-35.0	15	5.5	91.5	5.48	99.46
138	Myrosinase-binding protein	-1.5	**	1.2	*	1.0		*Bn*	1655824	-29.3	15	5.4	61.3	5.48	99.46
158	Cobalamin-independent methionine synthase	1.2		-1.2	*	-1.4	**	*At*	15238686	-36.3	19	6.4	84.7	6.09	84.36
176	Cobalamin-independent methionine synthase	1.2		-1.3	**	-1.2	**	*Al*	297807807	-29.1	19	6.3	84.5	6.12	84.35
227	Epithiospecifier protein	-1.1		-1.1		-1.3	**	*Br*	211905345	-34.1	36	6.4	45.8	5.95	37.91
N metabolism															
37	Glycine cleavage T-protein family	1.3		-1.1		-2.0	**	*At*	79470337	-12.1	14	5.3	51.9	6.3	43.53
Cell structure, growth and division															
14	Beta-glucosidase	1.2		1.9	*	3.2	**	*Bn*	757740	-8.5	8	4.8	73.4	6.21	58.51
95	Actin	1.2		-1.2		-1.7	**	*Bn*	4139264	-15.4	24	5.2	51.7	5.29	41.69
117	Annexin 1	1.0		1.1		1.8	**	*Bn*	300433289	-17.5	24	5.3	47.2	5.34	36.16
152	Actin	1.1		1.2		1.6	**	*Cc*	111610552	-7.2	16	6.4	24.8	4.78	23.36
160	Beta-tubulin	1.4	**	-1.1		1.1		*At*	18424620	-15.5	16	5.0	62.2	4.7	50.73
161	Beta-tubulin	1.4	**	1.6	**	1.5	**	*Bn*	8050828	-6.6	10	5.0	52.3	5.69	36.10
170	Beta-glucosidase	1.3		1.5	**	1.3		*Bn*	757740	-37.3	29	6.7	73.7	6.21	58.51
211	Beta-glucosidase	1.1		1.4	**	1.1		*Bn*	757740	-42.1	30	6.6	72.3	6.21	58.51
214	Beta-tubulin	1.2	*	1.1		-1.1		*At*	18424620	-6.9	5	5.0	64.0	4.7	50.73
Signal transduction															
184	1433-3	-1.0		1.1		1.5	**	*Bn*	224981577	-13.7	22	4.8	35.2	4.77	28.91
189	Guanine nucleotide-binding protein	1.4	*	-1.1		-1.0		*Bn*	3023857	-12.4	14	6.9	43.0	8.06	35.72
226	Importin alpha	1.2	*	1.0		1.3	*	*At*	238480717	-8.3	9	5.1	67.9	5	58.91

Significant ANOVA was followed by a Mann–Whitney test ($p < 0.05$) carried out on the normalised spot volumes (*n* = 6 for control, *n* = 4 for LS70, LS53 and LS32). Values indicate fold changes in protein abundance in LS seeds compared to control seeds in a linear scale. *, **: Significant differences from the control were at $p < 0.05$ or $p < 0.01$, respectively. The assigned best–matched protein is listed with the organism in which it was identified and its GenBank protein accession number. The log (Evalue), the percentage of sequence coverage (CV) and experimental (Exp.) and theoretical (Theo.) *pI* / *Mr* obtained are also indicated.

Interestingly, our proteomic analysis revealed significant accumulation of protein spots identified as glyoxalase I (lactoylglutathione lyase, spots n°163, 164, 187 and 201, Figure V.7) for the three treatments applied, except for one spot over three in LS70 seeds that was increased (Spot n°179). This protein, along with reduced glutathione (GSH), is involved in methylglyoxal detoxification formed from nonenzymatic phosphate elimination of GAP or dihydroxyacetone phosphate (DHAP; Richard, 1993).

C – 2.d Modulation of proteins involved in plant stress response and lectins

In LS70 and LS53 seeds, there was a decrease in accumulation of catalase (Spots n°53 and 185) and glutathione-S-transferase (GST; spots n°122, 169 and 218; Table V.6). Interestingly, a decrease in Mn-superoxide dismutase (SOD; spots n°56 and 224) and dehydroascorbate reductase (DHAR; spots n°29 and 124) was also observed in LS70 seeds compared to the control. Conversely, LS53 and LS32 seeds showed an over-accumulation of Cu/Zn-SOD (Spots n°113 and 145). As shown in Table V.6, two spots corresponding to jacalin-like jasmonate inducible proteins were significantly repressed in LS70 seeds compared to the control.

D Discussion

This study clearly demonstrated that the impact of S limitation on components of yield depend on the timing of the deficiency during the ontogenetic cycle of *B. napus*. Previous study emphasized the crucial role of leaves as the major source organ for S in response to S restriction (Dubousset *et al.*, 2010). Despite the enhancement of the S remobilization processes, the LS70, LS53 and LS32 treatments lead to a reduction of the S content in mature seeds, which can explain the reduced accumulation of S into proteins, GLS and glutathione (Tables V.1 and V.2).

Late S deficiency (applied at start of pod filling i.e. LS70 treatment) did not affect seed yield, oil, lipid and protein contents, but reduced seed protein quality and the GLS seed content. Severe decreases in seed yield and/or protein and lipid quality were observed when S limitation occurred at early stages of development (bolting stage, LS32 or visible buds – early flowering stage, LS53). These reductions of seed yield and quality in response to S restriction were associated with specific physiological and proteomics changes (Figure V.7).

Table V.5 Significantly changed proteins in LS70, LS53 and LS32 mature seeds identified by mass spectrometry as involved in lipid storage and metabolism and in carbon metabolism and energy.

Spot n°	Protein name	LS70		LS53		LS32		Species	NCBI accession numbers	log (E value)	CV (%)	Exp. p*I*	Exp. *Mr* (kDa)	Theo. p*I*	Theo. *Mr* (kDa)
Lipid storage and metabolism															
8	Stereoleosin SLO1-2	-1.4	*	1.3		3.3	**	*Bn*	196122096	-19.7	26	6.7	51.7	6.26	39.11
19	Caleosin	1.3		-1.3	**	-2.3	**	*Bn*	196122112	-5.3	11	5.9	31.0	5.81	28.13
59	Stereoleosin SLO1-2	1.6	**	-1.3		-1.4		*Bn*	196122096	-29.6	43	6.7	50.2	6.26	39.11
75	Plastid-lipid associated protein	-1.1		-1.4		-2.1	*	*Br*	14248552	-6.9	6	4.3	50.9	4.55	39.24
82	Alcohol dehydrogenase	-1.2		-1.3	**	-2.1	**	*Br*	330414748	-8.8	9	5.9	52.4	5.93	41.17
97	Caleosin	1.1		-1.1		-1.8	**	*Bn*	196122112	-10.8	19	5.7	30.9	5.81	28.13
143	Stereoleosin	1.4	*	1.0		-1.2		*Bn*	196122094	-52.4	47	6.4	50.9	6.27	39.09
177	Alcohol dehydrogenase	-1.5	**	-1.4	*	-1.4		*Br*	330414748	-33.6	27	6.1	51.3	5.93	41.17
207	Stereoleosin	-1.0		-1.4	*	-1.1		*Bn*	196122094	-14.6	20	6.1	51.6	6.27	39.09
231	Beta-ketoacyl-ACP synthetase 1	-1.1		-1.1	*	-1.2		*Bn*	7385217	-14.3	21	6.0	59.1	9.47	32.07
232	Alcohol dehydrogenase Class 3	1.0		-1.1		-1.2	*	*At*	1143388	-19.8	21	6.5	54.5	6.51	40.68
Carbon metabolism and Energy															
16	Succinate dehydrogenase	-2.1		-3.1	**	-1.8		*Al*	297797713	-16.2	11	5.5	77.4	5.92	69.64
23	Malate synthase, glyoxysomal	-1.2		-1.8	**	-3.0	**	*Bn*	126766	-55.9	30	7.4	70.8	7.64	63.73
34	Malate synthase, glyoxysomal	1.0		-1.8	**	-2.7	**	*Bn*	126766	-23.9	19	7.2	71.1	7.64	63.73
43	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	-2.5	*	-1.7		-2.2	**	*At*	15237947	-10.9	14	5.5	64.0	5.72	51.92
44	Phosphoglycerate kinase	-2.5	**	-2.2	*	-1.4		*At*	15219412	-12.4	12	5.4	49.5	5.49	42.13
57	Aconitase	1.4	*	1.4	*	2.3	**	*At*	15224221	-8.2	17	5.2	29.1	6.33	26.79
64	Malate synthase, glyoxysomal	-1.0		-1.7	*	-2.3	**	*Bn*	126766	-42.0	22	7.5	71.5	7.64	63.73
68	Glucose and ribitol dehydrogenase	-1.5		-1.0		1.5	*	*At*	75309952	-37.4	35	5.9	36.4	6.11	31.39
74	Transketolase	-1.3		-1.5		-2.2	**	*At*	18411711	-17.9	10	5.4	82.9	5.94	79.97
81	Glucose and ribitol dehydrogenase	-1.1		1.5	**	1.9	**	*At*	75309952	-9.9	13	6.3	36.6	6.11	31.39
96	Isocitrate dehydrogenase	-1.2		1.1		1.6	**	*At*	15218869	-29.9	27	6.4	56.5	6.13	45.75
101	Fructose-bisphosphate aldolase	-1.2		-1.1		1.6	**	*At*	15231715	-18.5	20	6.6	51.2	6.05	38.54
111	Malate dehydrogenase, cytosolic	1.2		-1.2		1.5	*	*At*	21593565	-9.1	11	6.5	49.3	7	35.66
120	Phosphoglucose isomerase, cytosolic	1.0		1.2		1.8	**	*At*	15239045	-26.9	23	6.5	70.9	6.19	61.72
136	Fructose-bisphosphate aldolase, cytosolic	1.2		-1.4	**	-1.3		*Vv*	225440976	-22.6	18	6.9	48.8	8.03	38.63
139	NADP-Malic enzyme	1.3		1.7	**	1.5	**	*At*	15225262	-6.3	5	6.8	74.0	6.32	64.28
148	Aconitase	1.2		1.0		-1.4	*	*At*	15233349	-45.6	23	6.0	92.5	5.98	98.15
165	Glucose and ribitol dehydrogenase	-1.4	**	1.1		1.1		*At*	75309952	-17.0	22	5.7	37.0	6.11	31.39
166	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	-1.0		-1.5	*	-1.3		*At*	15219379	-27.7	24	6.1	63.6	6.51	56.56
171	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.0		1.1		1.5	**	*Bn*	310896467	-26.4	38	6.3	49.8	6.81	15.69
181	ATP synthase CF1 beta subunit	-1.1		-1.3	*	-1.5	**	*At*	17939849	-71.0	39	5.5	65.2	6.53	63.37
198	Enolase	-1.2		-1.2		-1.4	**	*Br*	90194338	-31.7	36	5.5	63.6	5.55	47.56
202	ATP synthase CF1 beta subunit	-1.3	*	-1.3	*	1.1		*At*	17939849	-96.5	54	5.4	66.2	6.53	63.37
205	NADP-Malic enzyme	1.3	**	1.1		1.4	**	*At*	15225262	-9.7	6	6.9	73.4	6.32	64.28
209	V-type proton ATPase catalytic subunit A	1.2	*	1.1		-1.1		*Gm*	356521645	-54.2	22	5.3	77.6	5.35	68.78
212	Citrate synthase	1.1		1.3	*	1.3	*	*At*	18406515	-12.1	13	6.6	59.1	6.41	52.65
213	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2	1.1		-1.3	*	-1.1		*Bn*	241740186	-44.6	40	6.7	48.6	7.7	36.94
216	Phosphoglycerate kinase	1.3	*	1.1		1.3		*At*	1022805	-8.0	7	5.2	54.5	4.93	41.91
219	NADP-Malic enzyme	1.2	*	1.2		1.3		*At*	15225262	-18.6	18	6.9	73.5	6.32	64.28
228	Enolase	-1.2	**	1.0		1.1		*Br*	34597330	-85.3	56	5.6	64.1	5.46	47.38
230	Malate dehydrogenase, cytosolic	-1.2		-1.3	*	-1.1		*At*	15239843	-29.0	36	6.1	48.1	6.33	35.68

Significant ANOVA was followed by a Mann–Whitney test ($p < 0.05$) carried out on the normalised spot volumes ($n = 6$ for control, $n = 4$ for LS70, LS53 and LS32). Values indicate fold changes in protein abundance in LS seeds compared to control seeds in a linear scale. *, **: Significant differences from the control were at $p < 0.05$ or $p < 0.01$, respectively. The assigned best–matched protein is listed with the organism in which it was identified and its GenBank protein accession number. The log (Evalue), the percentage of sequence coverage (CV) and experimental (Exp.) and theoretical (Theo.) p*I* / *Mr* obtained are also indicated.

D – 1 Seed oil content and quality are impacted by an early S limitation, related to disturbance of C metabolism and energy

The nutritional value and usefulness of vegetable oils depend on their fatty acid balance. While a late S limitation (LS70) did not result in a reduction in oil content and quality, LS53 and LS32 treatments led to a lower accumulation of fatty acids in seeds mainly due to a decrease in C18 derivates, especially the two essential fatty acids, linoleic (ω6) and linolenic (ω3) acids (Table V.3). These results are consistent with a study conducted in *Brassica campestris* (Ahmad & Abdin, 2000a). The significant decrease of lipid-body associated proteins such as caleosins and PAP3 in LS53 and LS32 seeds (Table V.5) is in accordance with the lower lipid amount of these seeds. In contrast, the relative maintenance of these caleosins and the induction of stereoleosins in LS70 seeds could participate in the conservation of a high lipid amount in these seeds.

Interestingly, the lower fatty acid content in LS53 and LS32 seeds is mainly associated with a lower content of C18 but not of C20 and C22 fatty acids, suggesting that S limitation leads to a decrease in fatty acid synthesis, while their elongation to very long chains does not seem to be affected (Figure V.2). Although the present proteomic analysis was performed on mature seeds, this hypothesis is consistent with the characterisation of changes in proteins associated with C metabolism, strongly suggesting that glycolysis and the TCA cycle are affected in developing seeds under S limitation. For example, the significant decrease in PGK and enolase (Figure V.7) may be a source of disturbance in C flux through glycolysis that may contribute to the lower fatty acid content observed in LS53 and LS32 seeds. Also, the results suggest a redirection of the glycolic flux towards methylglyoxal metabolism previously shown to be activated by various abiotic stresses (Dixon *et al.*, 2010). It is worth noting in this context that the abundance of chloroplastidial ME is up-regulated by S deficiency, suggesting that the PEPCase-MDH-ME pathway is induced under S-limited condition and that its contribution to the acetyl-CoA supply for fatty acid synthesis is substantial. Moreover, the data revealed a reduction of malate synthase, a specific enzyme of the glyoxylate cycle involved in acetyl-CoA conversion to carbohydrates (Eastmond & Graham, 2001), which may result in lowering C fluxes through the glyoxylate cycle in LS53 and LS32 seeds. This could allow a down-regulation of fatty acid β-oxidation that may help to maintain oil content as high as possible, although these metabolic adjustments are not sufficient for LS53 and LS32 treatments. In addition, the accumulation of citrate synthase,

Table V.6 Significantly changed proteins in LS70, LS53 and LS32 mature seeds identified by mass spectrometry as involved in stress response and as lectins.

Spot n°	Protein name	LS70		LS53		LS32		Species	NCBI accession numbers	log (E value)	CV (%)	Exp. p*I*	Exp. *Mr* (kDa)	Theo. p*I*	Theo. *Mr* (kDa)
Stress response															
29	Dehydroascorbate reductase	-1.8	**	-1.1		1.6		*Br*	33285914	-7.8	32	5.5	29.8	6.15	12.04
53	Catalase	-2.4	**	-1.9		-1.7		*At*	1518450	-12.4	9	7.1	61.6	6.95	56.99
56	Mn Superoxide dismutase	-2.1	**	1.1		-1.2		*Eh*	148515008	-19.8	21	6.6	28.0	8.77	25.50
66	Peroxidase	-1.8	**	1.0		1.2	*	*Br*	253762012	-16.4	24	5.0	55.2	6.34	35.37
113	Cu/Zn Superoxide dismutase	-1.1		1.2	*	1.7	**	*Rs*	2305111	-8.3	16	5.5	14.6	5.44	15.10
122	Glutathione S-transferase	-1.5	**	-1.1		1.2	*	*Bo*	171921127	-21.4	15	6.3	29.1	8.48	59.12
124	Dehydroascorbate reductase	-1.4	**	1.1	*	1.3	**	*Br*	33285914	-7.9	32	5.6	29.7	6.15	12.04
141	Heat shock protein	-1.0		-1.2		-1.7	**	*Al*	297842179	-45.7	23	6.2	92.9	5.86	101.20
144	Fe Superoxide dismutase	1.3		1.4	*	1.7	**	*Bo*	334701491	-10.9	24	6.1	26.9	5.97	23.90
145	Cu/Zn Superoxide dismutase	-1.1		1.3	*	1.5	**	*Rs*	2305111	-10.4	16	5.9	14.8	5.44	15.10
162	Heat shock protein 22	1.3	*	-1.0		-1.3		*Bn*	341872725	-10.1	18	5.3	25.7	5.58	22.18
163	Glyoxalase I	1.3	*	1.6	**	1.5	**	*Bo*	2494843	-8.9	22	5.5	36.1	5.16	31.65
164	Glyoxalase I	1.2	**	1.4	**	1.6	**	*Br*	157890952	-4.3	14	5.2	35.9	5.35	31.91
169	Glutathione S-transferase	-1.1		-1.3	*	-1.5	**	*Bj*	2204102	-15.6	29	6.1	29.5	5.37	15.44
179	Glyoxalase I	-1.4	**	-1.2		1.1		*Bj*	3334244	-7.9	25	5.3	27.1	5.56	20.78
185	Catalase	-1.1		-1.5	**	-1.2		*Bn*	169244543	-22.2	19	6.9	64.4	6.75	56.86
187	Glyoxalase I	1.0		1.3	**	1.5	**	*At*	15221116	-7.0	9	5.4	35.3	5.17	31.93
201	Glyoxalase I	1.1		1.1		1.4	*	*Bo*	2494843	-19.3	22	5.2	35.9	5.16	31.65
218	Glutathione S-transferase	-1.3	**	-1.3	*	1.0		*Bj*	170177802	-65.2	42	6.5	28.9	5.81	22.64
220	Peroxiredoxin antioxidant	-1.1		-1.1		-1.3	**	*Bn*	7381260	-24.5	41	6.3	31.1	5.97	23.91
224	Mn Superoxide dismutase	-1.2	**	1.0		1.1		*At*	15228896	-7.8	16	6.8	27.0	6.25	26.89
229	Peroxiredoxin antioxidant	1.1		1.1		-1.2	*	*Bn*	7381260	-45.0	45	5.7	30.7	5.97	23.91
Lectins															
80	Jacaline like Jasmonate inductible protein	-1.3	*	1.2		1.6	**	*At*	34222076	-20.7	8	5.9	36.5	6.03	49.28
196	Jacaline like Jasmonate inductible protein	-1.5	**	-1.3		-1.2	*	*At*	34222076	-16.5	10	6.2	62.2	6.03	49.28

Significant ANOVA was followed by a Mann–Whitney test ($p < 0.05$) carried out on the normalised spot volumes ($n = 6$ for control, $n = 4$ for LS70, LS53 and LS32). Values indicate fold changes in protein abundance in LS seeds compared to control seeds in a linear scale. *, **: Significant differences from the control were at $p < 0.05$ or $p < 0.01$, respectively. The assigned best–matched protein is listed with the organism in which it was identified and its GenBank protein accession number. The log (Evalue), the percentage of sequence coverage (CV) and experimental (Exp.) and theoretical (Theo.) p*I* / *Mr* obtained are also indicated.

aconitase and isocitrate dehydrogenase suggests that citrate formation in mitochondria is promoted, which may allow maintenance of cytosolic fatty acid elongation to very long chains. The low abundance of the thiazole biosynthetic enzyme THI1 (spot n°40) observed in LS53 and LS32 seeds may result to a decline of synthesis of thiamine that could led to a negative impact on carbon metabolism and thereby on fatty acid synthesis. Indeed, thiamine is the precursor of thiamine pyrophosphate, an essential coenzyme for the activity of several enzymes associated to primary metabolism such as pyruvate decarboxylase and pyruvate dehydrogenase, two enzymes strongly involved in the synthesis of acetyl-CoA that could be used in TCA cycle and/or fatty acid elongation (Figure V.7).

The repression of succinate dehydrogenase, directly involved in the transport chain of the inner mitochondrial membrane electron, and the repression of the ATP synthase β-subunit strongly suggest that energy production is diminished in S-limited seeds compared to the control. Despite mitochondrial ATP production only contributes to a small part of the energy required for seed development (Schwender & Shachar-Hill, 2006), this repression could also explain the reduced accumulation of storage compounds. Altogether, these proteomics changes provide insights into processes that may contribute to the reduction of fatty acid accumulation and to the alteration of lipid composition (in favour of fatty acids with long chain) observed in LS53 and LS32 seeds.

D – 2 Seed metabolic changes induced in response to S limitation may contribute to maintain protein content but not quality.

As for oil, meal quality would be reduced if extracted from seeds obtained from early S-limited plants. Indeed, data obtained by theoretical calculation from proteomic analysis (Figure V.6A) and by mass spectrometry (Figure V.6B) revealed that the reduced accumulation of S-rich SSP in response to S limitation results in a lower S-proteic content than in control. However, seed protein content remained high for the LS32 and LS53 treatments (Table V.1). Thus, under S limitation, the protein content of *B. napus* seeds can be maintained at a level very close to control by decreasing the S-rich/S-poor proteins ratio, as previously demonstrated in *Arabidopsis*, lupin and pea (Higgins *et al.*, 1986; Hirai *et al.*, 1995; Tabe & Droux, 2002). Nevertheless, this adaptation strategy is not sufficient for LS32 treatment, where the seed protein content is affected, as observed in *Arabidopsis thaliana*

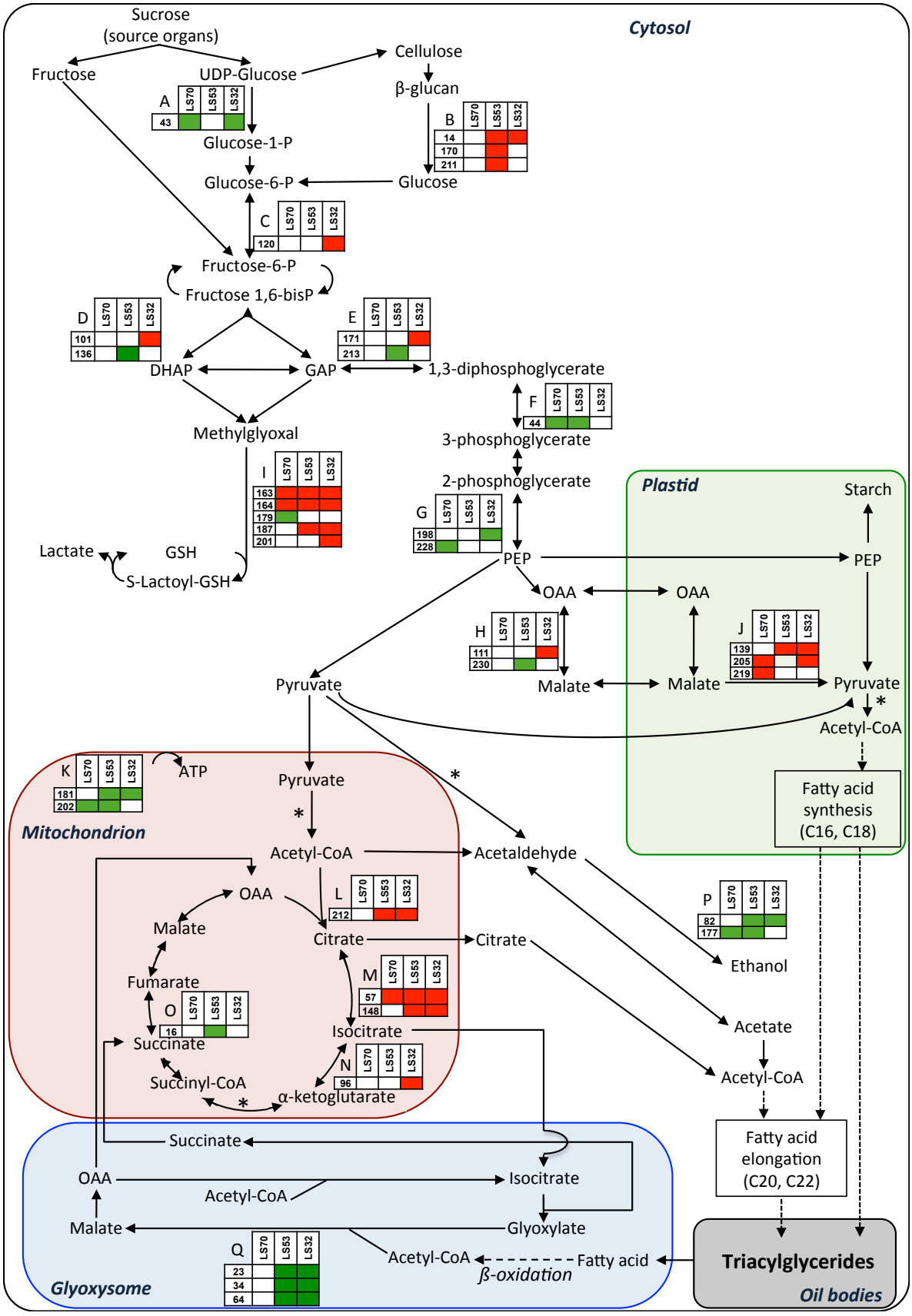


Figure V.7 Schematic representation of changes in accumulation of proteins of carbon metabolism and associated proteins in mature LS70, LS53 and LS32 seeds compared to Control seeds.

Significantly up- and down-regulated proteins are shown in red and green, respectively. *: Thiamine Pyrophosphate dependent reaction; A: UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase; B: β-glucosidase; C: Cytosolic phosphoglucose isomerase; D: Fructose-bisphosphate aldolase; E: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; F: Phosphoglycerate kinase; G: Enolase; H: Cytosolic malate dehydrogenase; I: Glyoxalase I; J: NADP-Malic enzyme; K: ATP synthase CF1 β subunit; L: Citrate synthase; M: Aconitase; N: Isocitrate dehydrogenase; O: Succinate dehydrogenase; P: Alcohol dehydrogenase; Q: Glyoxysomal malate synthase. DHAP, Dihydroxyacetone phosphate; GAP, Glyceraldehyde 3-phosphate; GSH, reduced form of glutathione; OAA, Oxaloacetate.

(Higashi *et al.*, 2006), maybe due to a reduction of N remobilization from leaves, as previously reported by Dubousset *et al.* (2010), and/or N assimilation in seeds.

The decreased level of Cru4 (S-rich cruciferin) and the increased level of BnC1 (S-poor cruciferin) strongly indicate that SSP balance depends on S-amino acid availability in developing seeds. In contrast, the increased abundance of Cru1 (S-rich cruciferin) in S-limited seeds may help to maintain a reasonable amount of S in the form of proteins and suggests a specific fine-tuning of oilseed rape SSP expression (Table V.3, Figure V.5A,B). Interestingly, while the reduced accumulation of translational initiation factor (Spots n°108, 110 and 142) in LS70 and LS53 seeds suggests a decrease in protein synthesis, LS32 treatment causes rather a repression of spots related to protein elongation and degradation.

As reported by Yu *et al.* (2010), seed transcriptome analysis revealed that genes involved in S metabolism are expressed in *B. napus* seeds, assuming that S assimilation is functional in this organ. The present study suggests that sulphate assimilation during seed development is enhanced by S limitation since S-sulphate/S ratio is strongly reduced in LS53 and LS32 seeds and S-proteic/S ratio is significantly greater in LS70, LS53 and LS32 seeds compared to the control (Table V.2, Figure V.6B). Hence, sulphate assimilation is presumably activated during seed development to provide S compounds, such as Cys, Met and GSH. Notwithstanding, these observations could also be the result of an important metabolic sink strength for sulphur related to protein synthesis. Although the free cysteine content remains very low, it is significantly higher in LS53 and LS32 seeds compared to the control (Table V.2), which may suggest that cysteine availability is not limiting for S-rich SSP accumulation. However, this unexpected result might rather be related to a defect in cysteine incorporation into proteins during the final stages of seed development. In contrast, the repression of methionine synthase that could reduce methionine synthesis may result to a limitation of S-rich SSP accumulation.

D – 3 Proteins involved in plant stress response exhibit different responses depending on the severity of S limitation.

In contrast to *Arabidopsis*, *B. napus* seeds show a high myrosinase activity, consisting in the cleavage of GLS to aglucons and glucose. Depending on different parameters (i.e. the pH or the side chain of GLS), the aglucons decompose to form toxic products such as isothiocyanates, thiocyanates, nitriles, or epithionitriles, involved in defence mechanisms

against pathogens. Myrosinases are specifically expressed in the vacuoles of myrosin cells in *B. napus* embryo, whereas the different myrosinase binding proteins (MBP) that regulate myrosinase activity are present in others cell types (Andréasson *et al.*, 2001). Surprisingly, the low myrosinase abundance observed in LS53 and LS32 seeds suggests that GLS degradation is potentially reduced in seeds subjected to S limitation. Even though the cultivar studied is a double low oilseed rape, GLS accumulation still strongly decreases in S-limited seeds, indicating that GLS content in these seeds is principally regulated by their synthesis in pod walls during seed development, probably through reduction of S supply and the regulation of S assimilation. The inhibition of myrosinase also highlights the importance of maintaining GLS in mature seeds, probably for their role in defence against pathogens as demonstrated in leaves (Dubuis *et al.*, 2005), that could be significant during germination or seedling establishment. We could then assume that S-limited seeds, particularly LS53 and LS32 seeds, are more susceptible to pathogens attacks. Similar to the low GLS content in S-limited seeds, the repression of the thiazole biosynthetic enzyme THI1 could reduce the resistance of these seeds against pathogens attacks, since thiamine was shown to induce systemic acquired resistance in plants (Ahn *et al.*, 2005) and indicates that the secondary S metabolism is reduced under S limitation. Although the adaptation mechanisms are still unknown, our data suggest the involvement of a demand-driven control of sulphate assimilation to sustain protein accumulation through S-amino acids synthesis rather than secondary S compounds such as thiamine, acetyl-CoA and GLS.

The modulations of stress response associated proteins revealed different responses of the seeds to the three S limitation treatments. LS70 seeds exhibited reduced expression of DHAR and Mn-SOD, whereas LS53 and further LS32 seeds showed accumulation of DHAR and particularly Cu/Zn-SOD, as previously observed in *B. napus* young leaves (D'Hooghe *et al.*, 2013b) and *A. thaliana* seeds (Higashi *et al.*, 2006). These inductions may be a response to oxidative stress due to a lower content of GSH under low S availability. Similarly, to compensate the low GSH content that conducts to a lower capacity to detoxify harmful molecules produced during seed development such as methylglyoxal, an induction of glyoxalase I was observed in S-limited seeds. The accumulation of glyoxylase I in LS53 and LS32 seeds could facilitate methylglyoxal detoxification despite of decrease in GSH (Figure V.7). This could be particularly important in LS32 seeds where the reduced accumulation of fatty acids and the induction of β-glucosidase, phosphoglucose isomerase, and fructose

bisphosphate aldolase, suggest an accumulation of carbohydrates such as GAP or DHAP, that could increase nonenzymatic methylglyoxal formation, as previously shown in *A. thaliana* leaves (Nikiforova *et al.*, 2005b). Interestingly, the maintenance of GSH content in LS70 seeds, and the reduced accumulation of DHAR and Mn-SOD suggest that GSH may be efficiently used for ROS detoxification as in control seeds.

D – 4 Numerous protein modulations could have negative impacts on germination and seedling development.

Other proteomic changes suggest that germination and seedling development of S-limited seeds may be impaired. For instance, the low abundance of glyoxysomal malate synthase, which is essential for the use of fatty acids during seedling establishment, could result in a default in these critical stages of development (Eastmond & Graham, 2001). The modulations of actins, β-tubulin and β-glucosidase that could affect cellular development, or the reduction of myrosinase and GLS accumulation which could prevent a good defence against pests, are also potentially negative for efficient germination, seedling establishment and growth.

If S reserves are sufficient, *B. napus* seeds are able to employ specific metabolic compensations to maintain seed yield and/or quality in case of S limitation. Moreover, the proteome study revealed metabolic processes that could contribute to the reduction of fatty acid accumulation and to the alteration of lipid composition in S-limited plants. Further investigations will be necessary (i) to study the impact of S limitation on seed development and (ii) to verify if seeds produced by LS plants are more susceptible to biotic/abiotic stress and/or an alteration of germination and seedling development.

Funding

This work was supported by the national SERAPIS program (Optimization of the sulphur fertilization: Development of innovative fertilizers and indicators of sulphur nutrition in plants). The program SERAPIS is coordinated by the private company TIMAC AGRO INTERNATIONAL – ROULLIER Group and benefits of financial supports from the Région Basse-Normandie, Région Bretagne, Région Pays-de-la-Loire, FEDER Basse-Normandie, Fonds Unique Interministériel, Roullier, Angers Loire Métropole. This work was also supported by a Ph.D. grant to Philippe D'Hooghe from the French Ministry of Research.

Acknowledgements

The authors thank Mrs Nathalie Nesi and Véronique Gautier for their help in seed composition analysis, Mrs Delphine Aimé for her assistance in the achievement of 2-DE, Mr Laurent Coquet for LC/MS-MS analyses and Mr Olivier Langella for PROTICdb assistance.

Chapitre VI

Demonstration of the ability to assimilate sulphate in *Brassica napus* developing seeds and pod walls and impact of S restriction on seed development and seed S metabolism

Hypothèses : La graine et le péricarpe sont capables d'assimiler le sulfate pour synthétiser des acides aminés soufrés qui seront incorporés dans les protéines de la graine. La capacité d'assimilation du sulfate par ces organes pourrait être modulée par la disponibilité en S. Afin de garantir la présence de composés soufrés réduits, les processus d'assimilation du sulfate apporté aux siliques pourraient en effet être induits au sein du péricarpe et de la graine de colza, comme observé au niveau foliaire chez *Arabidopsis thaliana*. Malgré de telles adaptations métaboliques, la restriction en sulfate pourrait entrainer une réduction de l'accumulation de S sous forme protéique au niveau de la graine.

Objectifs : Un premier objectif consistait à mettre en évidence la capacité d'assimilation du sulfate au sein de péricarpes et de graines issus de plantes bien alimentées en sulfate et ayant subi une restriction en sulfate, prélevés au cours du remplissage des graines (Chapitre VIA). Un second objectif consistait à étudier, sur deux génotypes de colza d'hiver – Aviso et Capitol – et en relation avec les flux de S à l'échelle de la plante entière, l'effet de restrictions en sulfate sur le développement de la graine, sa composition (teneur en S, sulfate, protéines, soufre protéique, composés soufrés réduits), et l'activité de deux enzymes clés du métabolisme soufré, l'ATPS et l'APR (Chapitre VIB).

Démarche expérimentale : Chapitre VIA : Du sulfate marqué au ^{34}S a été apporté pendant 24 heures à des graines et des péricarpes isolés prélevés au cours du développement de la graine (5 semaines après la floraison) sur des plantes du génotype Capitol bien alimentées et limitées en S à partir du stade GS53. Le marquage du sulfate et des protéines a ensuite été mesuré. *Chapitre VIB :* une étude comparative des flux de S en relation avec l'évolution des principaux composés soufrés et des activités des enzymes ATPS et APR de la graine a été réalisée sur 2 génotypes de colza d'hiver, Aviso et Capitol, soumis à des restrictions de l'apport de sulfate aux stades GS53 (inflorescence principale dégagée) et GS70 (chute des premiers pétales).

Résultats : Chapitre VIA : Les 24 heures d'apport de solution nutritive contenant du ^{34}S-sulfate conduisent à une production importante de protéines dans les graines HS et LS, associée à une diminution de la teneur de nombreux acides aminés. Le traitement conduit également à une incorporation de ^{34}S dans les protéines des graines et des péricarpes HS et LS. Alors que le niveau d'incorporation de ^{34}S dans les protéines des graines HS et LS n'a pas montré de différence, l'incorporation de ^{34}S dans les protéines des péricarpes LS était plus faible que dans les péricarpes HS, associé à une incorporation plus importante dans les autres composés organiques soufrés. *Chapitre VIB :* L'indice de récolte en S (SHI) n'est pas différent entre Aviso et Capitol dans des conditions non limitantes en S. Cependant, une absorption et une redistribution plus importante de S aux organes reproducteurs sont observées au cours des premières étapes du développement des graines chez Aviso en réponse à une restriction en S. Le traitement LS53 provoque une réduction de l'indice de récolte en N (NHI) sans altérer l'accumulation de protéines dans la graine. Le rendement grainier et la qualité des graines (estimée par le rapport N/S de leurs protéines) sont moins affectés par les restrictions en S chez Aviso que chez Capitol. Une plus forte activité APR a été observée dans les graines du génotype Capitol en réponse aux traitements, mais l'accumulation de S dans les protéines apparaît principalement régulée par la synthèse protéique.

Chapitre VI : Demonstration of the ability to assimilate sulphate in *Brassica napus* developing seeds and pod walls and impact of S restriction on seed development and seed S metabolism

VIA : A specific method of ^{34}S labelling provides evidence that sulphate assimilation occurs in developing seeds and pod walls of *Brassica napus* L.

D'Hooghe Philippe[1,2,3], Bataillé Marie-Paule[1,2,3], Trouverie Jacques[1,2,3], Avice Jean-Christophe[1,2,3]

[1] Normandie Univ, France

[2] UCBN, UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France

[3] INRA, UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France

Key words: ^{34}S labelling, sulphate assimilation, seeds, pod walls, oilseed rape

Running title: Sulphate assimilation in developing *Brassica napus* seeds and pod walls

Abstract

Rationale: Seeds from different species actively assimilate sulphur (S) from sulphate. This has never been proved for *Brassica napus* L., a high S demanding plant, especially with regard to S limitation. The role of pod walls in assimilation and allocation of S in well fed and sulphate-limited conditions deserve also to be clarified.

Methods: Freshly harvested seeds and pod walls from plants well-supplied (HS) or limited with sulphate (LS) from the "visible buds" stage were subjected to nutrient solution containing ^{34}S-sulphate (10 atom% excess) for 24 hours. The ^{34}S labelling of sulphate and protein fractions was determined with an elemental analyser connected to a continuous flow isotope ratio mass spectrometer. The amino acids profiles of seeds and pod walls were also determined by ion-exchange chromatography.

Results: The 24 hours of ^{34}S-sulphate feeding treatment leads to an important production of proteins in HS and LS seeds, associated with a decrease in numerous amino acids contents. The treatment also leads to an incorporation of ^{34}S in seeds and pod walls proteins in both HS and LS conditions. The incorporation of ^{34}S in proteins was not different between HS and LS seeds, but was lower in LS than in HS pod walls, related to a higher incorporation in the other organic S compounds.

Conclusions: This study provide evidence that *Brassica napus* seeds and pod walls are able to assimilate sulphate in HS and LS conditions, and that LS condition leads to enhance the sulphate assimilation capacity of pod walls, which may be of crucial importance for allocation of S to developing seeds.

A Introduction

Considering its high demand for sulphur (S) compared to other crops such as cereals or legumes, oilseed rape (*Brassica napus* L.) is particularly sensitive to S limitation (Zhao *et al.*, 1997). In non-limited condition, S is principally transported to growing organs as sulphate (Hawkesford & De Kok, 2006; Davidian & Kopriva, 2010), but also as methionine (Balint & Rengel, 2011a), glutathione (Foyer *et al.*, 2001; Cairns *et al.*, 2006) and *S*-methyl methionine (Bourgis *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2008) in *Brassicaceae* species. In oilseed rape, S limitation leads to an increase of root sulphate uptake capacity and to the remobilization of endogenous S from mature leaves to growing organs (Buchner *et al.*, 2004b), as young leaves during vegetative stage or stem, flowers and pods at reproductive stages (Dubousset *et al.*, 2009; 2010). These processes are associated with the up-regulation of genes encoding for sulphate transporters specifically involved in (i) the absorption of sulphate in roots, (ii) the efflux of sulphate from tonoplast in mature leaves, and (iii) the distribution of sulphate to the different growing organs (Buchner *et al.*, 2004b,a; Dubousset *et al.*, 2009). Then, S appeared to be actively transported to seeds as sulphate toward the vascular system, as observed in wheat (Fitzgerald *et al.*, 2001) and lupin (Tabe & Droux, 2001). Yu *et al.* (2010) have previously shown that the genes encoding for enzymes involved in S assimilation are expressed in oilseed rape developing seeds. These results suggests that seeds of oilseed rape are able to assimilate S from sulphate and to incorporate this S into proteins, as previously proved in other species such as soybean (Sexton & Shibles, 1999) lupin (Tabe & Droux, 2001) and wheat (Fitzgerald *et al.*, 2001). It could be also hypothesized that seed S assimilation capacity increases in response to S-limited conditions with a concomitant increase of key enzymatic activities involved in the reductive sulphate assimilation pathway such as ATP-sulfurylase (ATPS) or adenosine 5'-phosphosulphate reductase (APR), as previously observed in *Arabidopsis thaliana* leaves (for review see Davidian & Kopriva, 2010). The S demand of developing seeds can then potentially be satisfied through supply of sulphate or by a phloem-mobile reduced S-compound. By feeding pods of winter oilseed rape with ^{35}S-sulphate, previous works (Zhao *et al.*, 1993a) have demonstrated that S was transported to the pod walls before entering to seeds. These authors also observed that S was accumulated as sulphate in pod walls of a double low variety in non-limited conditions, but the role of pod

wall in the assimilation of S and in the allocation of S-compounds during the filling process of seeds in S-limited conditions is not well known.

Then, our study aims to verify if seeds and pod walls of oilseed rape subjected to sulphate limitation are able to assimilate S from sulphate and incorporate this element into proteins. To achieve these objectives, an experimental design based on an original method of ^{34}S sulphate feeding was performed on separate seeds and pod walls, freshly harvested during seed development of plants well-supplied or limited with sulphate from the end of bolting stage. This experiment was combined with a biochemical fractionation (determination of sulphate, amino acids, proteins, S-proteic contents, and ^{34}S labelling incorporated into sulphate and protein fractions) in order to determine the S assimilation capacity in pod walls and seeds of oilseed rape in response to S-limitation.

B Experimental

B – 1 Experimental treatments and tissue sampling

The experimental design is shown in Figure VIA.S1. Seeds from double low winter oilseed rape (cv. Capitol) were germinated with a thermoperiod of 20 °C (day 16 h) and 15 °C (night 8 h), for 60 d on 25% Hoagland nutrient solution consisting of 1.25 mM $Ca(NO_3)_2,4H_2O$, 1.25 mM KNO_3, 0.5 mM $MgSO_4$, 0.25 mM KH_2PO_4, 0.2 mM Fe–Na EDTA, 14 µM H_3BO_3, 5 µM $MnSO_4$, 3 µM $ZnSO_4$, 0.7 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 0.7 µM $CuSO_4$, 0.1 µM $CoCl_2$. The plants were then submitted to 8 °C (day 10 h) and 4 °C (night 14 h) during 69 d for vernalization with the same nutrient solution (Figure VIA.S1). After vernalization, each plant was transferred to individual 4 L pots containing mixed 1/3 vermiculite and 2/3 perlite and submitted to a thermoperiod of 20 °C (day) and 15 °C (night). In order to determine the contribution of endogenous S reserves accumulated in vegetative organs to the S recovered in seeds, a long term pulse-chase ^{34}S labelling ($^{34}SO_4^{2-}$) was applied. For this purpose, plants were supplied with 508.7 µM $^{34}SO_4^{2-}$ (2 atom% excess) from the bolting stage until the "visible buds" stage to obtain plants with homogeneous ^{34}S labelling (pulse period). When plants attained "visible buds" stage, ^{34}S labelling was stopped and unlabelled-sulphate was supplied in the nutrient solution up to the final stage of development (chase period). Plants were then subjected to mineral S restriction (LS: limitation of S corresponding to 8.7 µM SO_4^{2-}) and ample S nutrition (HS: high S availability with 508.7 µM SO_4^{2-}) from "visible buds" stage until harvest (Figure VIA.S1). Seed development lasted 12 weeks from the end of

flowering until the "mature seeds" stage. Developing pods were harvested 5 weeks after flowering on LS and HS plants (*n* = 3). Freshly collected pods were directly separated and an aliquot of each pod walls and seeds sample was stored at -80 °C for extraction and quantification of proteins, S-proteic and ^{34}S-proteic fractions (Control). A further aliquot of each sample was freeze-dried for the determination of total S content and ^{34}S labelling as well as for the determination of sulphate and ^{34}S-sulphate (Control).

B – 2 $^{34}SO_4^{2-}$ feeding method for testing S assimilation in isolated pod walls and seeds

Regardless to the pulse-chase labelled experiment, freshly isolated pod walls and seeds were fed with $^{34}SO_4^{2-}$ for testing S assimilation in these organs (Figure VIA.S1). Briefly, pod walls and seeds from freshly collected pods were directly separated and placed on a Whatman paper (10 cm x 10 cm) soaked with 10 mL of 25% Hoagland nutrient solution with $^{34}SO_4^{2-}$ (10 atom% excess) for 24 h inside a growth chamber at 20 °C with a photon flux density of 250 µmol.m^{-2}.s^{-1} (Figure VIA.S1). After this period, seeds and pod walls were collected and profusely rinsed with water for 1 min. An aliquot of each pod walls and seeds sample was stored at -80 °C for extraction and quantification of proteins, S-proteic and ^{34}S-proteic fractions (+$^{34}SO_4^{2-}$). A further aliquot of each sample was freeze-dried for the determination of total S content, ^{34}S labelling, sulphate and ^{34}S-sulphate after application of $^{34}SO_4^{2-}$ feeding (+$^{34}SO_4^{2-}$).

B – 3 Determination of total S, S-proteic content and corresponding ^{34}S labelling.

Total S content and total ^{34}S labelling were obtained from 4 mg of freeze–dried pod walls or seeds previously ground to a fine powder.

For S-proteic content and ^{34}S-proteic labelling determination, soluble proteins were extracted by grinding 30 mg fresh weight (FW) of seeds in 0.5 mL of citrate Na-phosphate buffer (20 mM citrate and 160 mM Na_2HPO_4, pH 6.8). The homogenate was centrifuged at 12 000 *g*, 4 °C for 1 h and the resulting supernatant was used to determine the concentration in soluble proteins by protein-dye staining (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard. Proteins were then precipitated by adding four volumes of acetone/trichloroacetic acid 10% to one volume of extract. After storage at -20 °C overnight, the extract was centrifuged at 12 000 *g*, 4 °C, for 20 min. The resulting pellet was then washed twice with 1 mL acetone 80%, and centrifuged at 16 000 *g*, 4 °C, for 3 min. Residual acetone was then evaporated under vacuum at 45 °C (Speedvac Concentrator 5301,

Eppendorf, LePecq, France). The resulting pellet was re-suspended in 0.1 mL of ultra pure water, placed into tin capsule and then evaporated under vacuum at 45 °C before S and ^{34}S quantification.

Total S and S-proteic contents and ^{34}S labelling in total S and protein fractions were determined with an elemental analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy) connected to a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (Isoprime GV Instruments, Manchester, UK).

B – 4 Determination of sulphate content and ^{34}S-sulphate labelling

Sulphate was extracted from 45 mg dry weight (DW) of seed samples ground to a fine powder, incubated twice with 2 mL of ethanol 50%, at 40 °C for 1 h, centrifuged at 10 000 *g* for 20 min and then incubated twice with 2 mL water, at 95 °C for 1 h, centrifuged at 10 000 *g* for 20 min. The supernatants were pooled and evaporated under vacuum (Concentrator Evaporator RC 10.22, Jouan, Saint- Herblain, France). The dry residue was suspended in 2 mL of ultra-pure water and the sulphate was purified using a DOWEX 50W (H+) column (6 cm high and 1.6 cm in diameter; Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). After elution of the samples with 7.5 mL of water, the sulphate concentration was determined by high performance liquid chromatography (HPLC, ICS3000, Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA).

For each sample, the volume corresponding to 10 µg of S was evaporated under vacuum and re-suspended in 50 µL of ultra pure water. These extracts were then placed into tin capsules, evaporated under vacuum at 45 °C (Speedvac Concentrator 5301), and ^{34}S labelling was determined by isotope ratio mass spectrometry (IRMS) as described above.

B – 5 Analysis of amino acids profiles in pod walls and seeds

Amino acids extraction was carried from 30 mg of freeze dried material, homogenized in 80% ethanol and incubated for 1 h at 4 °C. After centrifugation (20 800 *g*, 5 min, 4 °C), the pellet was homogenized with 0.5 mL of 50% ethanol, incubated for 1 h at 4 °C and centrifuged (20 800 *g*, 5 min, 4 °C). The pellet was homogenized with 0.5 mL of water, and incubated for 1 h at 4 °C. The three collected supernatants were pooled and dried at room temperature under vacuum (Speedvac Concentrator 5301), and re-suspended in 1 mL of citrate buffer (pH 2.98; P-21, 1st Lithium Citrate Buffer, JEOL Europe, Croissy sur Seine, France). Individual amino acid content was determined by ion-exchange chromatography

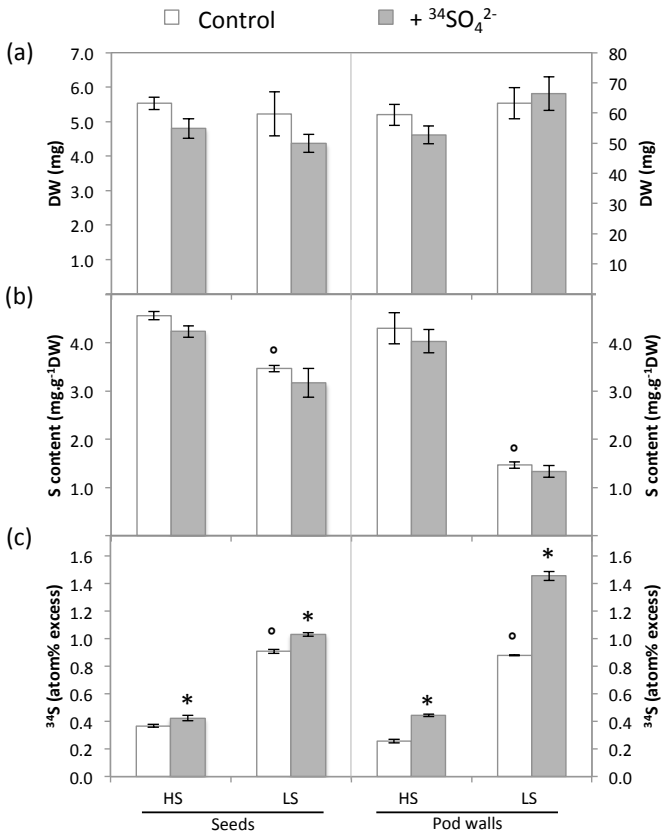


Figure VIA.1 Impacts of 24h feeding with $^{34}SO_4^{2-}$ (10 atom% excess) on dry weight (a), sulphur content (b), and ^{34}S labelling (c) of HS and LS seeds and pod walls.

Data represent means ± standard error (SE, *n* = 3). *: Significant difference between control and $+^{34}SO_4^{2-}$ ($p < 0.05$). °: Significant difference between HS and LS control values ($p < 0.05$). DW: dry weight; S: sulphur.

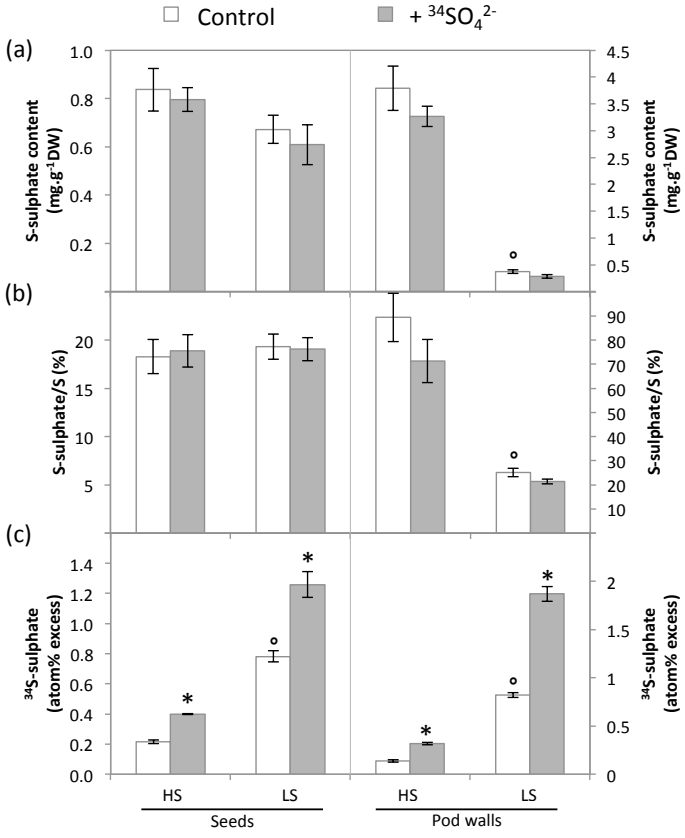


Figure VIA.2 Impacts of 24h feeding with $^{34}SO_4^{2-}$ (10 atom% excess) on S-sulphate content (a), S-sulphate/S ratio (b), and ^{34}S-sulphate labelling (c) of HS and LS seeds and pod walls.

Data represent means ± SE (*n* = 3). *: Significant difference between control and $+^{34}SO_4^{2-}$ ($p < 0.05$). °: Significant difference between HS and LS control values ($p < 0.05$). DW: dry weight; S: sulphur.

using the AminoTac JLC-500/V amino acid analyser according to the instructions of the manufacturer (JEOL Europe).

B – 6 Statistics

The results were expressed by the mean values ± the standard error (SE) for all biological replicates (*n* = 3). The data obtained from HS and LS seeds and pod walls samples fed for 24 h with 25% Hoagland labelled with $^{34}SO_4^{2-}$ (HS or LS +$^{34}SO_4^{2-}$) were compared to their respective freshly harvested samples (HS or LS Control) with the Student t test ($p<0.05$). This test was also used to compare HS with LS and HS+$^{34}SO_4^{2-}$ with LS+$^{34}SO_4^{2-}$.

C Results

C – 1 Seed and pod walls status before $^{34}SO_4^{2-}$ feeding

Dry weight was similar between HS and LS seeds and pod walls before $^{34}SO_4^{2-}$ application (Control), as shown in Figure VIA.1(a) and table VIA.S1. Compared to HS seeds and pod walls, S content was significantly lower in LS seeds and pod walls (Figure VIA.1(b), table VIA.S1). The S-sulphate content and the S-sulphate/S ratio were similar between HS and LS seeds, but they were significantly lower in LS than in HS pod walls (Figure VIA.2(a) and (b), table VIA.S1). It is worth noting that sulphate represented 89% of total S in HS pod walls *versus* 25% in LS pod walls (Figure VIA.2(b); table VIA.S1). While the protein content remains similar in HS and LS seeds and pod walls, the S-proteic content and the S-proteic/S ratio were significantly lower in LS than in HS seeds (-1.35 fold) and pod walls (-4.11 fold) (Figure VIA.3(b) and (c), table VIA.S1). The levels of ^{34}S labelling expressed as atom% excess in total S, S-sulphate and S-proteic fractions were significantly higher in LS than in HS seeds and pod walls (Figures VIA.1(c), 2(c), 3(d), table VIA.S1). This was also observed for the contents of ^{34}S in total S, sulphate, protein and other organic S-compounds between LS and HS seeds and pod walls (Figure VIA.4, table VIA.S1), indicating that the S reserves previously accumulated in vegetative organs at the "visible buds" stage was more efficiently remobilized towards reproductive organs in response to sulphate restriction. The S content in proteins was significantly lower in LS than in HS seeds and pod walls (Figure VIA.5, table VIA.S1).

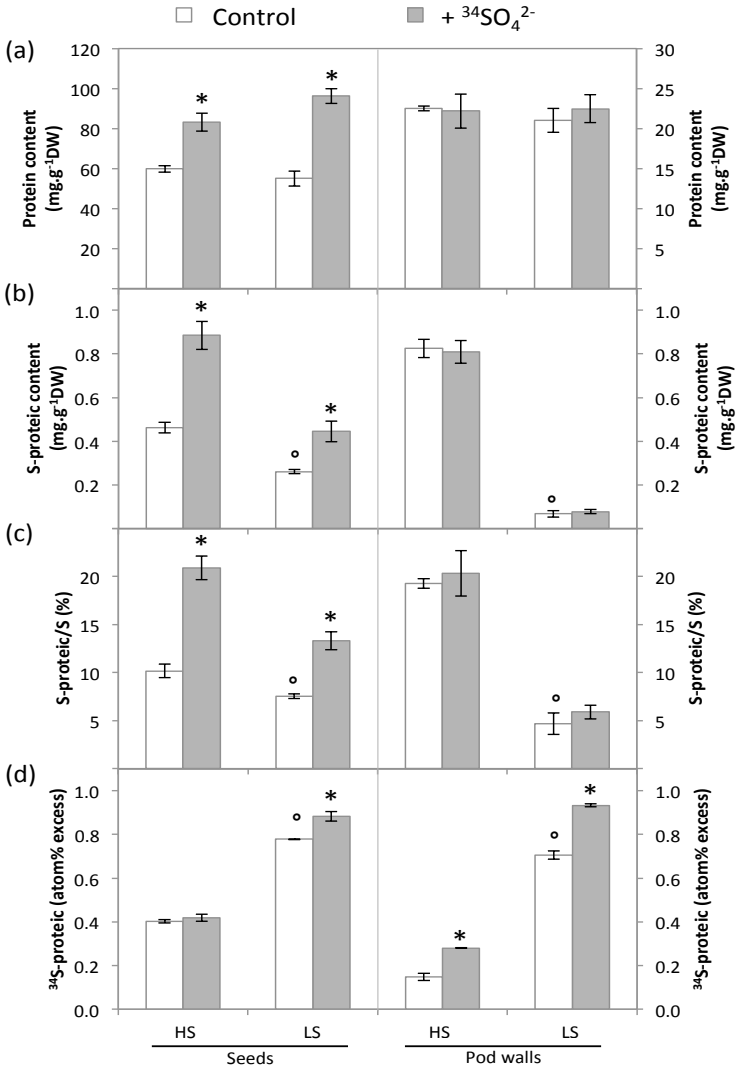


Figure VIA.3 Impacts of 24h feeding with $^{34}SO_4^{2-}$ (10 atom% excess) on soluble protein content (a), S-proteic content (b), S-proteic/S ratio (c) and ^{34}S-proteic labelling (d) of HS and LS seeds and pod walls.

Data represent means ± SE (*n* = 3). *: Significant difference between control and $+^{34}SO_4^{2-}$ ($p < 0.05$). °: Significant difference between HS and LS control values ($p < 0.05$). DW: dry weight; S: sulphur.

C – 2 Impacts of 24h-$^{34}SO_4^{2-}$ feeding on biomass, S contents and ^{34}S labelling in isolated pod walls and seeds

As expected, the $^{34}SO_4^{2-}$ feeding treatment applied for 24 h did not significantly modify the dry masses (Figure VIA.1(a)), but also the S content (Figure VIA.1(b)) of HS or LS seeds and pod walls. Conversely, the level of ^{34}S labelling (atom% excess; Figure VIA.1(c)) in both organs harvested from HS and LS plants significantly increased after 24h of $^{34}SO_4^{2-}$ feeding. The increased of labelling was particularly high for pod walls, which were approximately 1.7 times more labelled after $^{34}SO_4^{2-}$ application (Figure VIA.1(c)). Similarly, the content in total ^{34}S (Figure VIA.4) was significantly increased in HS and LS seeds and pod walls after the $^{34}SO_4^{2-}$ feeding treatment.

C – 3 Effects of 24h-$^{34}SO_4^{2-}$ feeding on S-sulphate contents and ^{34}S-sulphate labelling

As for S content, the S-sulphate contents did not significantly change in HS and LS seeds and pod walls after $^{34}SO_4^{2-}$ feeding (Figure VIA.2(a)). Whatever the organs, the S-sulphate/S ratio remained stable (Figure VIA.2(b)), but the ^{34}S-sulphate labelling (Figure VIA.2(c)) and the content of ^{34}S-sulphate (Figure VIA.4) significantly increased after the $^{34}SO_4^{2-}$ feeding treatment.

C – 4 Impacts of 24h-$^{34}SO_4^{2-}$ feeding on protein, S-proteic contents and ^{34}S-proteic labelling

While the protein and S-proteic contents remained unchanged after the $^{34}SO_4^{2-}$ feeding treatment in HS and LS pod walls, they increased significantly in HS (respectively +1.39 and +1.62 fold) and LS seeds (respectively +1.75 and +1.70 fold; Figure VIA.3(a) and (b)). Similarly, the S-proteic/S ratio was significantly increased in HS and LS seeds and was not affected in HS and LS pod walls (Figure VIA.3(c)). The ^{34}S labelling of the protein fraction was significantly increased in LS seeds and in HS and LS pod walls, but not in HS seeds (Figure VIA.3(d)). Notwithstanding, the $^{34}SO_4^{2-}$ feeding treatment led to an increase in ^{34}S-proteic content in HS seeds (+1.67 fold), LS seeds (+2.35 fold), HS pod walls (+1.86 fold) and LS pod walls (+1.52 fold; Figure VIA.4). The relative S content in proteins of seeds and pod walls proteins remained unchanged after 24h of $^{34}SO_4^{2-}$ application (Figure VIA.5).

C – 5 Effects of 24h-$^{34}SO_4^{2-}$ feeding on amino acids patterns

Overall, the 24h of $^{34}SO_4^{2-}$ application led to a significant decrease in total proteinogenic amino acid contents in HS seeds (-67%) and LS seeds (-59%), but not in HS and LS pod walls

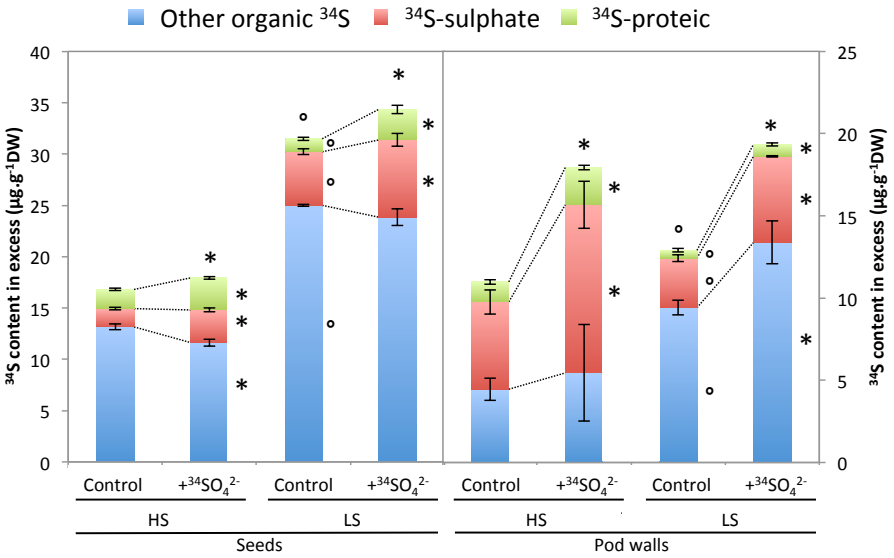


Figure VIA.4 Impacts of 24h feeding with $^{34}SO_4^{2-}$ (10 atom% excess) on the ^{34}S content of sulphate, protein and other organic compounds fractions of HS and LS seeds (a) and pod walls (b).

Data represent means ± SE (*n* = 3). *: Significant difference between control and $+^{34}SO_4^{2-}$ ($p < 0.05$). °: Significant difference between HS and LS control values ($p < 0.05$). S: sulphur.

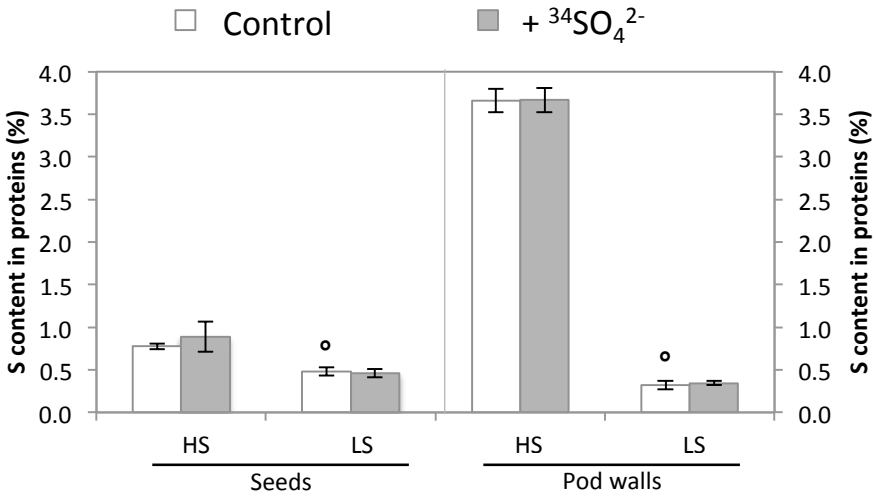


Figure VIA.5 Impacts of 24h feeding with $^{34}SO_4^{2-}$ (10 atom% excess) on the relative S content of soluble proteins of HS and LS seeds and pod walls.

Data represent means ± SE (*n* = 3). °: Significant difference between HS and LS control values ($p < 0.05$). S: sulphur.

(Table VIA.1). The contents in numerous amino acids, such as glutamine, glutamate or histidine decreased in HS and LS seeds after treatment application. The contents in some amino acids, as serine, isoleucine or tyrosine was not affected in HS and LS seeds, and few of them accumulated, as leucine in both HS and LS seeds, or phenylalanine in HS seeds (Table VIA.1). While the glutamine and glycine contents were increased respectively in HS and LS pod walls, and the aspartate, tyrosine and proline contents decreased in LS pod walls, the contents of the majority of amino acids remained unchanged in HS and LS pod walls after the $^{34}SO_4^{2-}$ treatment (Table VIA.1).

D Discussion

D – 1 S status of seeds and pod walls are differently impacted by sulphate restriction applied at visible buds stage.

The restriction of S applied at "visible buds" stage (LS treatment) leads to a significant reduction of S contents in seeds (-24%) and pod walls (-66%) without changes in dry masses (Figure VIA.1(a) and (b), table VIA.S1), showing that less S is provided to reproductive organs in LS conditions. Interestingly, the S-sulphate content and the S-sulphate/S ratio are significantly lower in LS than in HS for pod walls (-90% and -72% respectively), but not for seeds (Figure VIA.2(a) and (b), table VIA.S1), suggesting specific response of these two organs to S restriction. The strong S-sulphate/S ratio in HS pod walls (89.4%) could be related to a sequestration of sulphate in vacuoles as observed in leaves (Dubousset *et al.*, 2009). In LS condition, instead of being stored as sulphate in pod walls, S provided to developing pods could be used to satisfy the demand of seeds as far as possible. This hypothesis is supported by the results obtained for total S, S-sulphate and S-proteic contents that are less affected in seeds than in pod walls by LS treatment (Figures VIA.1(b), 2(a), 3(a), table VIA.S1). The higher ^{34}S labelling of total S (Figure VIA.1(c)), S-sulphate (Figure VIA.2(c)) and S-proteic fractions (Figure VIA.3(d)) are higher in LS than in HS seeds and pod walls. This could be related to the fact that remobilization of endogenous S previously stored in leaves is more efficient in LS condition, as extensively described in a recent work (Dubousset *et al.*, 2010).

D – 2 Seeds are able to rapidly incorporate S as SO_4^{2-} independently of their initial S status.

While the sulphate content did not change between untreated (Control) and labelled ($+^{34}SO_4^{2-}$) HS and LS seeds (Figure VIA.2(a)), the significant increase in ^{34}S-sulphate labelling

Table VIA.1 Amino acids contents in HS, LS, HS+$^{34}SO_4^{2-}$ and LS+$^{34}SO_4^{2-}$ seeds and pod walls.

		Seeds				Pod walls			
		HS		LS		HS		LS	
		Control	+ $^{34}SO_4^{2-}$	Control	+ $^{34}SO_4^{2-}$	Control	+ $^{34}SO_4^{2-}$	Control	+ $^{34}SO_4^{2-}$
Basic	His	0.14 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0 ± 0	**2.14 ± 0.17**	1.64 ± 0.8	**0.71 ± 0.15**	0.5 ± 0.16
	Lys	0.82 ± 0.03	0.2 ± 0.03	0.75 ± 0.21	0.34 ± 0.05	**0.49 ± 0.03**	0.36 ± 0.2	**0.2 ± 0.02**	0.19 ± 0.03
	Arg	1.04 ± 0.12	0.39 ± 0.1	1 ± 0.35	0.44 ± 0.17	22.3 ± 4.92	24.1 ± 8.16	14.36 ± 2.05	8.78 ± 2
Acidic	Glu	16.45 ± 0.72	5.65 ± 0.47	19.8 ± 2.75	6.43 ± 0.15	20.34 ± 1.46	19.53 ± 2.6	16.62 ± 1.34	11.51 ± 2.54
	Asp	3.07 ± 0.02	0.76 ± 0.05	3.43 ± 0.58	0.78 ± 0.04	14.16 ± 1.07	13.89 ± 2.61	13.52 ± 1.13	7.1 ± 1.49
Polar	Gln	12.67 ± 1.06	1.28 ± 0.4	12.31 ± 2.69	1.46 ± 0.58	**203.07 ± 17.13**	266.29 ± 23.89	**121.99 ± 19.14**	91.98 ± 27.8
	Asn	1.08 ± 0.03	0.55 ± 0.05	1.18 ± 0.29	0.86 ± 0.08	9.51 ± 2.12	12.27 ± 4.93	5.12 ± 1.4	2.23 ± 0.86
	Thr	0.8 ± 0.06	0.37 ± 0.02	1.17 ± 0.31	0.6 ± 0.01	9.66 ± 0.46	10.74 ± 0.84	8.22 ± 0.57	7.37 ± 1.33
	Ser	0.94 ± 0.08	0.83 ± 0.05	1.2 ± 0.19	1.43 ± 0.13	4.24 ± 0.44	4.68 ± 0.79	4.28 ± 0.31	4.21 ± 0.95
Hydrophobic	Trp	#NA	#NA	#NA	#NA	#NA	#NA	#NA	#NA
	Ala	2.35 ± 0.03	2.02 ± 0.19	2.48 ± 0.58	2.4 ± 0.19	**2.26 ± 0.21**	2.54 ± 0.31	**1.6 ± 0.12**	2.24 ± 0.55
	Val	1.18 ± 0.07	0.68 ± 0.11	1.16 ± 0.3	1.14 ± 0.09	2.74 ± 0.65	2.98 ± 0.64	2.3 ± 0.58	1.64 ± 0.39
	Ile	0.34 ± 0.04	0.39 ± 0.07	0.43 ± 0.14	0.55 ± 0.05	0.93 ± 0.3	1.12 ± 0.4	0.67 ± 0.23	0.46 ± 0.14
	Leu	0.17 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.18 ± 0.04	0.48 ± 0.01	0.5 ± 0.1	0.44 ± 0.15	0.38 ± 0.11	0.27 ± 0.08
	Phe	**0.3 ± 0.02**	0.43 ± 0.05	**0.38 ± 0.03**	0.39 ± 0.01	0.91 ± 0.09	0.95 ± 0.12	**0.59 ± 0.09**	0.53 ± 0.1
	Tyr	0.13 ± 0	0.1 ± 0.02	0.14 ± 0.05	0.18 ± 0.01	0.24 ± 0.08	0.24 ± 0.13	0.24 ± 0.07	0.07 ± 0.04
	Met	0.06 ± 0.01	0 ± 0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Special cases	Cys	0.08 ± 0.01	0 ± 0	0.09 ± 0.03	0 ± 0	0.15 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.11 ± 0.02
	Pro	1.36 ± 0.09	0 ± 0	1.68 ± 0.23	0 ± 0	24.01 ± 1.85	23.24 ± 2.83	28.97 ± 2.45	18.17 ± 2.73
	Gly	0.28 ± 0.03	0.26 ± 0.05	0.25 ± 0.07	0.3 ± 0.01	1.65 ± 0.96	2.68 ± 0.98	0.52 ± 0.06	2.85 ± 0.66
Total proteinogenic amino acids		43.25 ± 0.82	14.25 ± 1.06	47.77 ± 8.81	17.77 ± 0.88	**319.29 ± 19.35**	387.88 ± 47.45	**220.43 ± 26.2**	160.22 ± 40.8
Non-proteinogenic	Citrulline	nd	nd	nd	nd	0.09 ± 0.01	0 ± 0	0.04 ± 0.02	0 ± 0
	Eth	1.68 ± 0.02	1.27 ± 0.18	1.92 ± 0.28	1.56 ± 0.04	4.9 ± 2.04	8.89 ± 1.04	8.28 ± 2.31	3.16 ± 0.7
	NH3	4.68 ± 0.46	1.94 ± 0.34	6.32 ± 2.18	3.22 ± 0.3	4.9 ± 0.73	9.02 ± 0.66	5.05 ± 0.72	3.04 ± 0.84
	1 Methyl Histidine	0.47 ± 0.08	0.07 ± 0.04	0.28 ± 0.14	0 ± 0	nd	nd	nd	nd
	Aminoadipic Acid	**0.69 ± 0.13**	0 ± 0	**0.28 ± 0.09**	0 ± 0	nd	nd	nd	nd
	Aminobutiric Acid	0.03 ± 0	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0 ± 0	0.07 ± 0.03
	GABA	5.11 ± 0.49	1.14 ± 0.09	4.08 ± 0.54	1.41 ± 0.14	1.23 ± 0.3	1.52 ± 0.22	1.69 ± 0.36	0.87 ± 0.17
Total		55.91 ± 1.32	18.69 ± 1.5	60.66 ± 11.87	24 ± 1.03	**330.45 ± 21.44**	407.41 ± 47.84	**235.49 ± 29.53**	167.35 ± 42.49

Values are given as the mean ± SE expressed as µmol.g^{-1}DW. Significant decreased and increased contents with the $^{34}SO_4^{2-}$ feeding are respectively annotated in green and red. Significant differences between HS and LS control seeds and pod walls are annotated in bold.

(Figure VIA.2(c)) and in ^{34}S-sulphate content after 24 h of $^{34}SO_4^{2-}$ feeding (Figure VIA.4) confirmed that the S enters within HS and LS seeds as sulphate. Additionally, the increase of ^{34}S labelling and ^{34}S contents in both HS and LS seeds indicates that the experimental conditions are appropriate to investigate the incorporation of ^{34}S into proteins. The significant increase in protein contents (Figure VIA.3(a)) clearly indicates that proteins are highly synthesized and accumulated during the 24 h of $^{34}SO_4^{2-}$ application in HS and LS seeds. These results suggest that the exposure to the nutrient solution used for the $^{34}SO_4^{2-}$ application, and/or the presence of some mineral elements supplied during the $^{34}SO_4^{2-}$ feeding – such as nitrate as reported in Arabidopsis (Scheible *et al.*, 2004) – may have a role on the stimulation of protein synthesis.

During the $^{34}SO_4^{2-}$ feeding, S is actively integrated in proteins of HS and LS seeds, since the S-proteic content (Figure VIA.3(b)) and the S-proteic/S ratio (Figure VIA.3(c)) significantly increase. The increase in ^{34}S-proteic labelling (Figure VIA.3(d)) and in ^{34}S-proteic content (Figure VIA.4) in LS seeds demonstrates that some of the ^{34}S provided as sulphate is rapidly incorporated into LS seed proteins. For HS seeds, ^{34}S-proteic labelling (Figure VIA.3(d)) is not different between control and $^{34}SO_4^{2-}$ fed seeds, while the ^{34}S-proteic content increases in response to the $^{34}SO_4^{2-}$ feeding (Figure VIA.4). This apparent discrepancy is explained by the huge differences in S-proteic contents that tend to increase the differences in ^{34}S-proteic content between control and $^{34}SO_4^{2-}$ fed seeds. Consequently, the amounts of ^{34}S that are transferred into proteins in HS seeds (+1.25 ± 0.23 $\mu g.g^{-1}DW$) that tends to be higher in LS seeds (+1.71 ± 0.32 $\mu g.g^{-1}DW$), are not significantly different. This result suggests that the S assimilation and protein synthesis in seeds are not affected by S limitation in our experimental conditions. The decreased contents in total amino acids, especially glutamate, aspartate and glutamine observed in HS and LS seeds (Table VIA.1), are consistent with the accumulation of protein measured after the $^{34}SO_4^{2-}$ feeding. The decrease of cysteine and methionine contents (Table VIA.1) and of ^{34}S content of other organic compounds in HS seeds after $^{34}SO_4^{2-}$ feeding (Figure VIA.4) suggests that the incorporation of cysteine and methionine into proteins would be partially responsible for the increase in S-proteic content in HS seeds. The assimilation of sulphate into these amino acids that are incorporated into proteins also appears to be responsible for the increase in S-proteic content, particularly for LS seeds, wherein methionine was not detected (Table VIA.1). Interestingly, the short experiment timing does not allow an adaptation of the protein content to this new S

availability, since the S contents in proteins remain unchanged after the $^{34}SO_4^{2-}$ feeding in HS and LS seeds (Figure VIA.5).

D – 3 Pod walls proteins undergo a turnover in HS and LS conditions.

Exogenous $^{34}SO_4^{2-}$ feeding indicated that pod walls, as seeds, are able to rapidly incorporate S as SO_4^{2-} form. The observations made for pod walls should be taken with caution since this experiment was performed in the absence of seeds, which are important sinks of S and therefore influence the S metabolism in pod walls. Nevertheless, while the protein (Figure VIA.3(a)) and S-proteic (Figure VIA.3(b)) contents remain unchanged in HS and LS pod walls after $^{34}SO_4^{2-}$ application, this organ possesses the capacity to assimilate S from sulphate into proteins, since the ^{34}S-proteic labelling (Figure VIA.3(d)) and the ^{34}S-proteic content (Figure VIA.4) significantly increase after the $^{34}SO_4^{2-}$ feeding. The maintenance of protein, S-proteic and most of amino acids (Table VIA.1) contents also suggest that proteins undergo a turnover in developing pod walls in both HS and LS conditions. As for seeds, no adaptation of the protein content of HS and LS pod walls to the $^{34}SO_4^{2-}$ feeding was observed.

In HS pod walls, the increase of ^{34}S content is mainly related to an increase in ^{34}S-sulphate and ^{34}S-proteic fractions (Figure VIA.4). These results are consistent with the strong S-sulphate/S ratio in HS pod walls (Figure VIA.2(b)). Based on these data and on the fact that HS plants, which received high sulphate nutrition, are probably able to provide sulphate, S-amino acids and other S compounds to the reproductive organs and fully satisfy the demand for S in pods and developing seeds, it could be hypothesized that the assimilation of sulphate is low in HS pod walls and tends to a sulphate accumulation.

In LS conditions, the increase of ^{34}S content in pod walls is related to an increase in ^{34}S-sulphate, ^{34}S-proteic contents but also, in ^{34}S in the other organic S compounds fraction (Figure VIA.4). This result is consistent with the low S-sulphate/S (Figure VIA.2(b)) and S-proteic/S (Figure VIA.3(c)) ratio observed in LS pod walls, and suggests that S-assimilation is induced, and that incorporation of S into proteins is reduced in LS pod walls compared to HS pod walls. Interestingly, the S content in proteins (Figure VIA.5) is significantly lower in LS (0.32%) than in HS pod walls (3.66%) supporting the assumption that S-amino acids are very weakly incorporated into pod walls proteins in LS condition. This significant difference is less important between LS seeds (0.48%) and HS seeds (0.77%) (Figure VIA.5), which also suggest

that the provision of S to developing seeds is prioritized in LS conditions at the expense of other organs such as pod walls. In LS conditions, the induction of sulphate assimilation and the reduction of S accumulation into proteins and sulphate could allow a better S supply to developing seeds, relative to the smaller amount of S provided to developing pods.

E Conclusion

The $^{34}SO_4^{2-}$ labelling method used in the present study highlights different physiologic behaviours of seeds and pod walls with respect to S and relative to their specific role in seed development. The stimulation of both proteins synthesis and S incorporation into proteins in response to the $^{34}SO_4^{2-}$ feeding on isolated seeds constitute an original and unexpected result provided in this study. This will deserve further developments in order to identify the factors that are implicated in the activation of *de novo* protein synthesis after the exposure of *B. napus* seeds to water or nutrient solution with different mineral compositions. We also conclude that in oilseed rape, seeds and pod walls are site of sulphate assimilation in HS and LS conditions, and that S-limited conditions lead to enhance the sulphate assimilation capacity of pod walls. In S-limited conditions, in addition to the induction of sulphate remobilization from leaves to the developing pods [11], the modification of the management of S by pod walls is an adaptation mechanism of great interest to sustain seed protein synthesis and the accumulation of S into seed protein fraction. The involvement of reductive sulphate assimilation pathway in seeds and pod walls could be similar to its counterpart in *Arabidopsis* leaves, well-described by numerous studies (for review see Kopriva *et al.* 2012). Seeds are unable to produce glucosinolates, and in double low oilseed rape, pod walls produces very low amount of these compounds (Zhao *et al.*, 1993a). Then, sulphate assimilation in developing pod walls and seeds could be principally devoted to amino acids synthesis that are incorporated into seed proteins. A kinetic study of S assimilation in seeds and pod walls under different S nutrient conditions would be of great interest to study these issues.

VIB : S management by *Brassica napus* seeds in connection with S flows at the whole plant level. A comparative study of two genotypes exhibiting different number of seeds produced per plant.

D'Hooghe Philippe[1,2,3], Kopriva Stanislav[4], Avice Jean-Christophe[1,2,3], Trouverie Jacques[1,2,3].

[1]Normandie Univ, France

[2]UNICAEN, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France

[3]INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France

[4]John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich, NR4 7UH, UK.

Keys words: Oilseed rape, seed development, S limitation, S fluxes, S/N interactions, S assimilation.

Abstract

Oilseed rape (*Brassica napus* L.), the high sulphur (S) demanding crop, is principally cultivated for its seeds rich in oil and proteins. After the crushing process, the extracted oil, particularly rich in omega-3, is used for human nutrition, and the resulting meal, rich in S amino acids, is mainly used for animal feeding. The responses of Brassicaceae species to S restriction usually consist in increasing their S absorption and assimilation capacities. The very low oilseed rape S Utilization Efficiency (SUtE) in non-limiting condition is also enhanced – S reserves, principally stored as sulphate in mature leaves are actively remobilised and provide S to developing seeds – when S restriction occurs. The knowledge about S management by developing seeds is still scarce, particularly in relation to S restriction. To address this question, the impact of S restrictions applied at the "visible bud" stage (LS53 treatment) and the start of pod filling stage (LS70 treatment) was studied on two genotypes, Aviso and Capitol, that show similar seed yield but differ in their mature seed weight and their number of seeds per plant in non-limited condition. S flows at the whole plant level were studied using ^{34}S-sulfate tracer, and S management by developing seeds was followed by combination of biochemical analyses and measurements of ATP sulfurylase (ATPS) and adenosine 5'-phosphosulfate reductase (APR) activities. While S Harvest Index was not different between both genotypes in non-limiting conditions, higher S uptake and redistribution to reproductive organs during the first steps of seed growth was observed for Aviso in response to S restriction. The N Harvest Index was reduced in both genotypes in response to LS53 treatment without reducing seed protein accumulation. Seed yield and quality (estimated by the N/S ratio in seed proteins) was less affected by S restriction for Aviso than for Capitol. An higher seed APR activity was observed for Capitol in response to LS treatments, but did not appeared to be limiting for S accumulation into proteins.

A Introduction

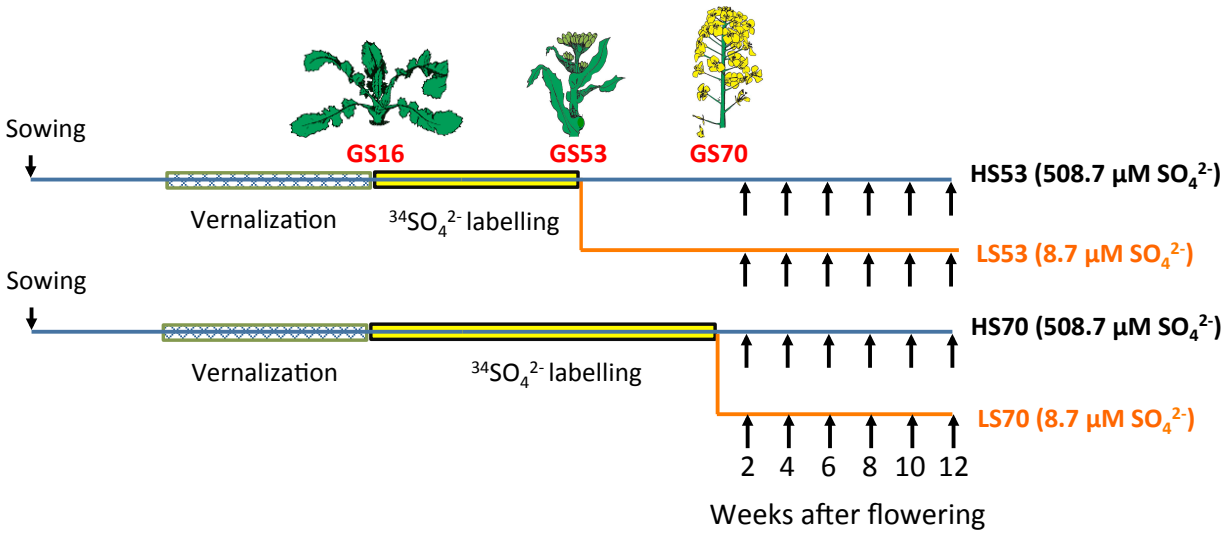
As the third worldwide oleoproteaginous crop, oilseed rape (*Brassica napus* L.) is principally cultivated for the high nutritional value of its seeds. Indeed, the extracted oil, particularly rich in omega 3, is of high quality for human nutrition and health. In addition, the meal residue obtained after the crushing process, principally used for animal feeding, is protein-rich and contains high contents of sulphur (S) amino acids, cysteine and methionine (Zhao *et al.*, 1993b). However, as a Brassicaceae, oilseed rape is high S demanding compared to other crops such as wheat or beet (Zhao *et al.*, 1997; Oenema & Postma, 2003), and is then particularly sensitive to S limitation. The risk of S restriction is increased since the reduction in S emissions from anthropogenic sources observed during the last three decades has resulted in a strong decline in S deposition into the soil, particularly in Western Europe (McNeill *et al.*, 2005).

In non-limiting S supply conditions, oilseed rape taken up large amounts of sulphate that is mainly assimilated in leaves and stored in vacuoles if metabolic needs are met. However, in case of high S availability, the S Utilization Efficiency (SUtE) of oilseed rape is low and especially related to a low S Remobilization Efficiency (SRE ; Dubousset *et al.*, 2009; 2010). A reduction in the sulphate supply leads to an up-regulation of genes encoding for specific transporters involved i) in sulphate uptake by roots, and ii) in sulphate remobilization at root and leaf levels (Parmar *et al.*, 2007; Dubousset *et al.*, 2009; Abdallah *et al.*, 2010). In *Arabidopsis thaliana*, S limitation also leads to an increase in the activity of enzymes specifically involved in S assimilation in leaves and roots, ATP-sulfurylase (ATPS) (EC: 2.7.7.4) catalysing the formation of adenosine 5'-phosphosulphate (APS) from sulphate and ATP, and APS reductase (APR) (EC: 1.8.99.2), the first enzyme of the reductive S assimilation pathway, which reduced APS to sulphite (Lappartient *et al.*, 1999; Koralewska *et al.*, 2009). These higher enzyme activities in S-limiting conditions are also associated with the up-regulation of the corresponding genes. Many proteins involved in S metabolism are additionally regulated at transcriptional and posttranscriptional levels (Yoshimoto *et al.*, 2007; Koprivova *et al.*, 2008), but S assimilation is primarily controlled at the steps of sulfate uptake and APS reduction (Vauclare *et al.*, 2002; Yoshimoto *et al.*, 2007; Scheerer *et al.*, 2010). In response to S restriction, the induction of S uptake, remobilization and assimilation capacities enables to support S requirements of growing organs and to supply the metabolism in reduced S compounds by the use of sulphate previously stored. The SRE and thus the SUtE are

therefore increased (Dubousset *et al.*, 2009; 2010). If the S reserves are not sufficient to fulfil the plant needs for growth and for the production and filling of its seeds, this results in an alteration of seed quality but also a reduction of seed yield (Zhao *et al.*, 1997; Dubousset *et al.*, 2010).

Sulphur can be transported by the vascular system to reproductive organs in reduced form such as methionine (Balint & Rengel, 2011a), glutathione (GSH; Foyer *et al.*, 2001) and SMM (Bourgis *et al.*, 1999). However, S is mainly transported as sulphate by specific transporters (Hawkesford *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2011a). In single low *B. napus* varieties (i.e. with low erucic acid and high glucosinolate contents), the sulphate transported to the pod is highly assimilated as glucosinolate in pod walls prior to be transported to seeds. In contrast, the double low varieties (i.e. with low erucic acid and glucosinolate contents) accumulate a large amount of S as sulphate in pod walls (Zhao *et al.*, 1993a). The sulphate provided to the pod may be assimilated by pod wall before being transported in a reduced form into seeds. However, in *Arabidopsis thaliana*, sulphate represents a significant part of total S found in mature seed (up to 15% of total S) and the sulphate transporter Sultr2;1 is specifically expressed in the funiculus (Awazuhara *et al.*, 2005), suggesting that S could be incorporated into developing seeds as sulphate. In addition, the genes involved in sulphate assimilation are expressed in *B. napus* developing seeds, and there expressions change during seed development (Yu *et al.*, 2010).

The ability of the seed to assimilate S as sulphate has been demonstrated in many species such as soybean, wheat, or lupine (Sexton & Shibles, 1999; Tabe & Droux, 2001; Fitzgerald *et al.*, 2001), and more recently in oilseed rape (D'Hooghe *et al.*, 2013a, in press). In soybean, seed represents the main site of sulphate assimilation during the reproductive stage (Sexton & Shibles, 1999). GSH synthesis is effective in *A. thaliana* embryo, and is essential for seed maturation (Cairns *et al.*, 2006). A lack of GSH synthesis at the seed level in a *gsh1* mutant does not affect the embryo development, suggesting that the provision of GSH to seeds by the vascular system is sufficient to ensure its smooth running, but has a negative impact on the phases of filling and maturation (Cairns *et al.*, 2006). GSH may also be actively catabolized in the seed as observed in wheat (Fitzgerald *et al.*, 2001), and thus constitutes a source of cysteine for the synthesis of seed storage proteins.



<u>Figure VIB.1</u> Schematic diagram of the experimental design.

Mineral S restriction [low S (LS)] was applied at GS53 (visible bud stage) for LS53, or at GS70 (start of pod filling) for LS70, until the end of the growth cycle. During different periods (from GS16 to GS53, or GS16 to GS70), the plants were supplied with $^{34}SO_4^{2-}$ (2 atom% excess) in order to obtain plants with homogeneous ^{34}S labelling before applying treatments. Plants were harvested at labelling end (GS53 or GS70) and at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 weeks after flowering.

In view of these findings, it could be hypothesized that seeds of double low oilseed rape have the ability to assimilate sulphate primarily by the reductive assimilation pathway since the non-reductive assimilation pathway is almost inactive (Zhao *et al.*, 1993a). The management of S by the seed is still little known, particularly in connection with sulphate limitation. The enzymes involved in sulphate assimilation at the seed level may also be regulated by sulphate availability, promoting the synthesis of reduced S compounds in case of lower S supply. To address these questions, this study aims to determine the response of double low oilseed rape to restrictions of sulphate applied at two stages of development: the "visible buds" stage (GS53) and the start of pod filling stage (GS70). This work was conducted in two genotypes, Aviso and Capitol, that exhibit similar seed yield in non limiting-condition, but are distinguished by the weight of their mature seed and by the number of seeds produced per plant. The impact of S restriction on the S flows was studied at the whole plant level by using ^{34}S-sulfate tracer and the S management by the developing seed was followed in kinetic by biochemical analyses in combination with measurements of ATPS and APR enzyme activities.

B Material and methods

B – 1 Experimental treatments and tissue sampling

The experimental design is shown in figure VIB.1. After surface sterilization, seeds from double low winter oilseed rape (cv. Aviso and Capitol) were germinated and grown with a thermoperiod of 20°C (day 16 h) and 15°C (night 8 h), for 60 d on 25% Hoagland nutrient solution consisting of 1.25 mM $Ca(NO_3)_2$,$4H_2O$, 1.25 mM KNO_3, 0.5 mM $MgSO_4$, 0.25 mM KH_2PO_4, 0.2 mM Fe–Na EDTA, 14 µM H_3BO_3, 5 µM $MnSO_4$, 3 µM $ZnSO_4$, 0.7 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 0.7 µM $CuSO_4$, 0.1 µM $CoCl_2$. Plants were then submitted to 8°C (day 10 h) and 4°C (night 14 h) during 69 d for vernalization with the same nutrient solution (Figure VIB.1). After vernalization, each plant was transferred to individual 4 L pot containing mixed 1/3 vermiculite and 2/3 perlite and submitted to a thermoperiod of 20°C (day) and 15°C (night). In order to determine the contribution of endogenous S reserves accumulated in vegetative organs to the S recovered in seeds, a long term pulse-chase ^{34}S labelling ($^{34}SO_4^{2-}$) was applied. For this purpose, during different periods of growth [from GS16 (rosette stage) to GS53 (visible bud stage), or GS70 (start of pod filling)], plants were supplied with 508.7 µM $^{34}SO_4^{2-}$ (2 atom% excess) to obtain homogeneous ^{34}S labelling (pulse period). When

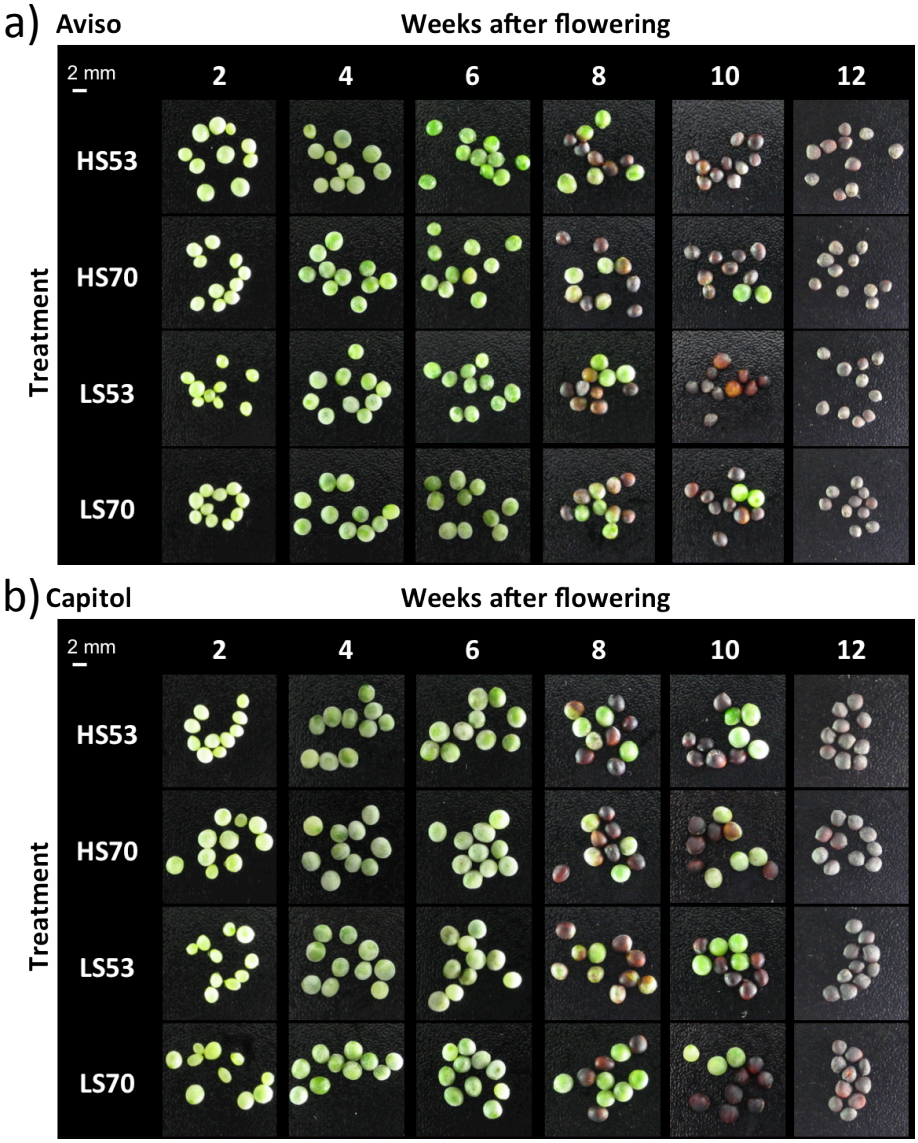


Figure VIB.2 *Brassica napus* developing seeds from Aviso (a) and Capitol (b) plants grown under HS53, HS70, LS53 and LS70 conditions and harvested at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 weeks after flowering.

Capitol seed dry weight was significantly higher than for Aviso. No difference in seed dry weight and seed water content (data not shown) was observed in response to LS treatments (Figure VIB.5a and b).

plants attained GS53 or GS70 stages, ^{34}S labelling was stopped and unlabelled-sulphate was supplied in the nutrient solution up to the final stage of development (chase period) (Figure VIB.1). Limitation of sulphate (LS treatments) corresponding to 8.7 µM SO_4^{2-} was applied at GS53 or GS70 until the end of the growth cycle, which corresponded to LS53 and LS70 treatments, respectively. In parallel, control plants continued to receive a nutrient solution with high sulphate concentration corresponding to 508.7 µM (HS53 and HS70 treatments, figure VIB.1). Each day, the nutrient solution 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. Seed development lasted 12 weeks from the end of flowering until the mature seed stage. Plants were harvested at the end of the pulse period (GS53 or GS70), and at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 weeks after flowering (WAF; n = 4). At each date of harvest, the different plant parts (roots, fallen leaves, green leaves, stem and flowers) were weighed, freeze-dried, and then ground to a fine powder for elemental and isotope analyses. Freshly collected pods over 6 cm were separated and an aliquot of each seeds sample (Figure VIB.2) was stored at -80°C for extraction and quantification of proteins, S-compounds (sulphate, sulphite, γ-EC, glutathione, S-proteic fraction) and determination of ATPS and APR activities. A further aliquot of each seed and pod walls sample was freeze-dried and then ground to a fine powder for elemental and isotope analyses. At final harvest (12 WAF), the number of mature seeds per plant was accurately determined for four replicates per treatment.

B – 2 S, N and ^{34}S analysis

Freeze-dried samples were ground to a fine powder, weighed and prepared into tin capsules for determination of total S and N contents using an elemental analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy) connected to a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (IRMS; Isoprime, GV Instruments, Manchester, UK). The IRMS analysis also provided the changes of the relative amount of ^{34}S in excess in each sample derived from the tracer fed to the plant.

B – 3 Calculation of S remobilisation

The calculation of S remobilisation was exactly performed according to Dubousset *et al.* (2010). Long periods of labelling allow a homogenous distribution of tracers in different organs and different biochemical fractions containing S. The calculations of flows of

remobilized S depend on the source or sink status of each organ. Source organs are characterized by a loss of ^{34}S amount between two dates. Conversely, sink organs are characterized by a gain of ^{34}S amount between two dates. The inflow of S taken up between two dates was calculated by subtracting the S derived from remobilization between these two dates from the change in total S amount for this period.

B – 4 Determination of seed yield components

At final harvest, seed yield and the number of mature seeds per plant were accurately determined. The thousand seed weights were estimated from the weights of one hundred seeds. The S and N Harvest Indexes (SHI and NHI, i.e. the S or N amount in seeds expressed as a percentage of the total S or N amount in plants at mature stage) and the S and N utilization efficiencies (SUtE and NUtE, expressed as seed dry weight (DW) produced per unit of S or N accumulated in vegetative shoots) were calculated at the mature seed stage using the data provided by mass spectrometry analyses, for four replicates per treatment.

B – 5 Extraction and quantification of proteins, S-proteic and N-proteic contents

Soluble proteins were extracted by grinding 30 mg fresh weight of seed in 0.5 mL of citrate Na-phosphate buffer (20 mM citrate and 160 mM Na_2HPO_4, pH 6.8). The homogenate was centrifuged at 12 000 *g*, 4°C for 1 h and the resulting supernatant was used to determine the concentration in soluble proteins by protein-dye standing using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976). Proteins were then precipitated by adding four volumes of 10% TCA in acetone to one volume of extract. After storage at -20°C overnight, the extract was centrifuged (12 000 *g*, 4°C, 20 min) and the resulting pellet was washed twice with 1 mL 80% acetone, and centrifuged (16 000 *g*, 4°C, 3 min). Residual acetone was evaporated under vacuum at 45°C, and the resulting pellet, resuspended in 0.1 mL of ultra-pure water, was placed into tin capsule. The water was then evaporated under vacuum at 45°C (Speedvac Concentrator 5301, Eppendorf, France) and dry protein extract was analysed for S and N contents using an elemental analyser combined to an IRMS as described above for total S and N contents.

B – 6 Quantification of sulphate amount

Sulphate was extracted from 45 mg dry weight (DW) of seed samples ground to a fine powder, incubated twice with 2 mL of 50% ethanol, at 40°C for 1 h, centrifuged (10 000 *g*, 20

Table VIB.1 Yield, thousand seed weight, number of seeds produced per plant, S harvest index (SHI), N harvest index (NHI), S utilization efficiency (SUtE, mg of mature seed DW per mg of S in shoots) and N utilization efficiency (NUtE, mg of mature seed DW per mg of N in shoots) at mature stage for Aviso and Capitol in HS, LS70 and LS53 conditions.

Genotype	Treatment	Seed yield ($gDW.plant^{-1}$)	Thousand seed weight (gDW)	Number of seeds per plant	SHI (%)	NHI (%)	SUtE	NUtE
Aviso	HS	7.46 ± 0.53	4.07 ± 0.15	1843 ± 139	21.3 ± 1.2	42.5 ± 1.8	80 ± 5	23 ± 2
	LS70	6.8 ± 0.79	3.68 ± 0.13	1869 ± 240	**39.3 ± 1.3†**	40.6 ± 1.5	**251 ± 14†**	21 ± 1
	LS53	5.8 ± 0.63	3.58 ± 0.13	1609 ± 126	**36.9 ± 0.7†**	**34.6 ± 0.7†**	**279 ± 23†**	**16 ± 1†**
Capitol	HS	8.34 ± 0.53	*6.36 ± 0.12**	*1313 ± 88**	24.7 ± 1.1	46.2 ± 2.5	95 ± 9	29 ± 5
	LS70	9.16 ± 0.58	5.73 ± 0.03	1599 ± 107	**39.4 ± 3.6†**	46.9 ± 2.7	**317 ± 49†**	30 ± 4
	LS53	**6.08 ± 0.15†**	5.92 ± 0.15	**1027 ± 25†**	**33.7 ± 1.6†**	**33.5 ± 1.1†**	**285 ± 13†**	**17 ± 1†**

Details of HS and LS treatments are given in Figure VIB.1. The values correspond to the mean ± SE (n = 8 for HS and n = 4 for LS70 and LS53). *: significant difference between Aviso and Capitol, indicated in italic ($p < 0.05$). †: significant differences from the control (HS) value, indicated in bold ($p < 0.05$).

min), incubated twice with 2 mL of water, at 95°C for 1 h, and centrifuged (10 000 *g*, 20 min). The supernatants were pooled and evaporated under vacuum (Concentrator Evaporator RC 10.22, Jouan, Saint-Herblain, France). The dry residue was resuspended 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) as previously described by D'Hooghe *et al.* (2013a, in press).

B – 7 Quantification of sulphite, γ-glutamylcysteine (γ-EC) and total glutathione amounts by HPLC

Thiols were extracted by grinding 10 mg dry weight of seed in 0.2 mL of 0.1 M HCl. After centrifugation (20 000 *g*, 10 min), the supernatant was used to measure the content of total sulphite, γ-EC and total glutathione after reduction with dithiothreitol (DTT) by HPLC using the monobromobimane derivatization method as described by Koprivova *et al.* (2008).

B – 8 Determination of ATPS and APR activities

APR activity was determined as the production of [^{35}S]sulphite, assayed as acid-volatile radioactivity formed in the presence of [^{35}S]APS with DTT as reductant (Koprivova *et al.*, 2008). ATPS was measured as the APS and pyrophosphate-dependent formation of ATP (Burnell, 1984). The protein concentrations were determined by protein-dye staining using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

B – 9 Statistics

The variability of the results is expressed by the average values for all biological replicates ± standard error (SE; n = 3 or 4). The effects of LS70 and LS53 treatments compared to their respective controls (HS70 and HS53) were subjected to statistical analysis using Microsoft® Excel 2011/XLSTAT©-Pro (Version 2013.3.01, Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA). With a statistical significance postulated at $p < 0.05$, Mann-Whitney's test were done to compare data obtained for LS and HS conditions. Data obtained for Aviso and Capitol in HS conditions were also compared using the same test.

C Results

C – 1 Seed yield, yield components, SHI, NHI, SUtE and NUtE

Seed yield and number of pods in control (HS) conditions were not different between Aviso and Capitol, but the thousand seed weight for Capitol was significantly higher (6.36 ±

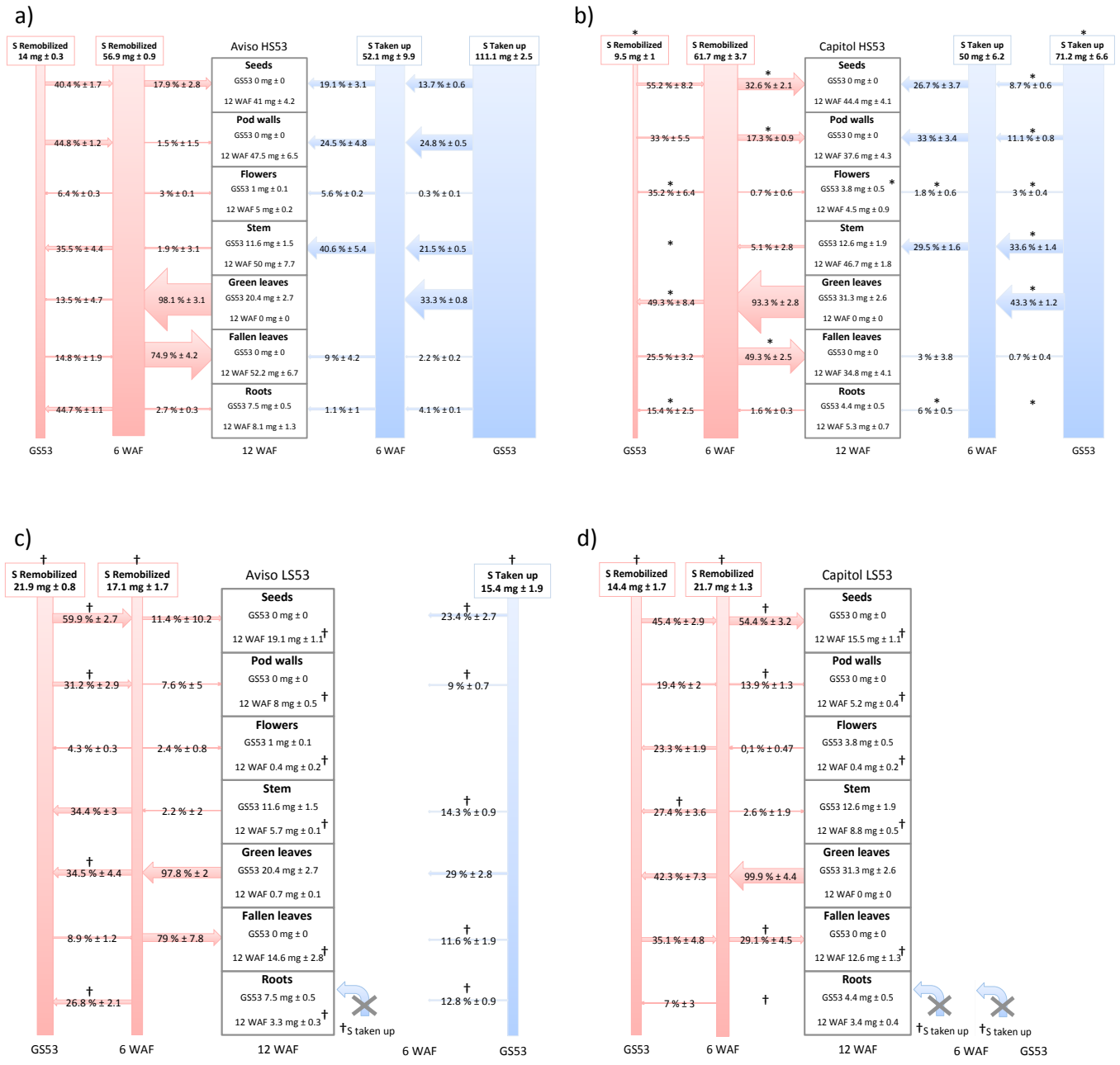


Figure VIB.3 Sulphur flows of remobilized S (determined on the basis of ^{34}S enrichment; see Materials and methods for details, red arrows) and S taken up (estimated from the unlabeled S, blue arrows), and the S amount present at labelling end (GS53) and mature stage (12 weeks after flowering, WAF) in seeds (in mg in seeds), pod walls, flowers, stem, green leaves, fallen leaves and roots of oilseed rape for Aviso (a and c) and Capitol (b and d), HS53 (a and b) and LS53 plants (c and d) from labelling end (GS53) to 6 WAF and from 6 WAF until mature stage (12 WAF).

Values are given as the mean ± SE (n = 4). The thickness of the arrows represents the amount of S remobilized. †: significant difference from the control ($p < 0.05$). *: significant difference between Aviso and Capitol under HS53 condition ($p < 0.05$).

0.12 g DW) than Aviso (4.07 ± 0.15 g DW; table VIB.1). At mature stage, Capitol showed a lower number of seeds produced per plant (1313 ± 88) than Aviso (1843 ± 139; table VIB.1). The S Harvest Index (SHI) was 21.3 ± 1.2% for Aviso in HS condition and was not different from that of Capitol (24.7 ± 1.1%; table VIB.1). A similar NHI was also observed for these two genotypes in HS condition (Table VIB.1). SUtE and NUtE were also not significantly different between the two genotypes in HS conditions (Table VIB.1).

No difference in seed yield, thousand seed weight and number of seeds produced per plant was observed for Aviso in response to the LS treatments (Table VIB.1). Seed yield and number of seeds produced per plant were significantly affected for Capitol in LS53 condition by 27% and 22% compared to the HS53 respectively, but not by the LS70 treatment (Table VIB.1). The two LS treatments led to an increase in SHI for both genotypes suggesting a better targeting of S mobilization to seeds in LS conditions with, for instance, 39.3 ± 1.3% of total plant S contained in Aviso LS70 seeds *versus* 21.3 ± 1.2% in HS (Table VIB.1). The LS53 treatment decreased the NHI from 42.5 ± 1.8% to 34.6 ± 0.7% for Aviso and from 46.2 ± 2.5% to 33.5 ± 1.1% for Capitol. The highest values of SUtE were obtained in LS53 and LS70 conditions in both genotypes (Table VIB.1). Compared with control, the NUtE was significantly reduced in LS53 conditions (Table VIB.1).

C – 2 Changes in S remobilization and S allocation flows

Under HS conditions, the S amounts at the whole plant level and in the different parts of the plant were not significantly different between Aviso and Capitol at GS53 and GS70, except for the S amount in flowers which was higher for Capitol (3.8 ± 0.5 mg) than Aviso 1 ± 0.1 mg) at GS53 (Figures VIB.3a, 3b, 4a and 4b). In HS condition, S remobilisation and allocation observed between labelling end (GS53 or GS70) and mature stage (12 weeks after flowering, WAF) were not different between Capitol and Aviso (data not shown) but differences are revealed when the flows are separately calculated between labelling end and 6 WAF and between 6 and 12 WAF (Figure VIB. 3a, 3b, 4a and 4b). Thus, S uptake and allocation appeared to be more efficient for Aviso than Capitol from GS53 and GS70 until 6 WAF. For both genotypes, the allocation of the S taken up was principally targeted to leaves and stem between GS53 and 6 WAF, and also more to seeds for Aviso than Capitol. The amount of S remobilized at the whole plant level is also significantly higher for Aviso than Capitol between GS53 or GS70 and 6 WAF in HS condition (Figure VIB. 3a, 3b, 4a and 4b).

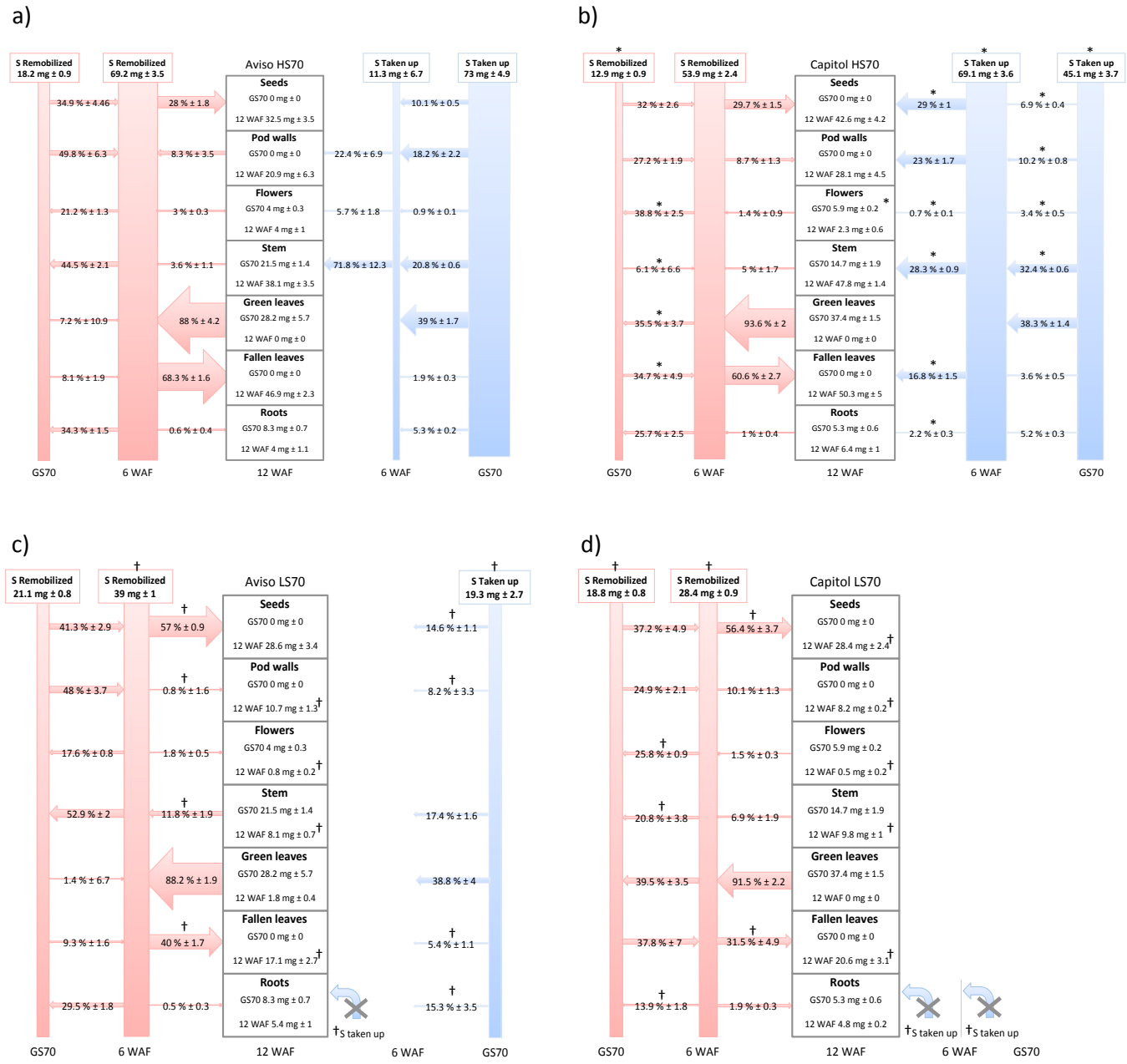


Figure VIB.4 Sulphur flows of remobilized S (determined on the basis of ^{34}S enrichment; see Materials and methods for details, pink arrows) and S taken up (estimated from the unlabeled S, blue arrows), and the S amount present at labelling end (GS70) and mature stage (12 weeks after flowering, WAF) in seeds (in mg in seeds), pod walls, flowers, stem, green leaves, fallen leaves and roots of oilseed rape for Aviso (a and c) and Capitol (b and d), HS70 (a and b) and LS70 plants (c and d) from labelling end (GS70) to 6 WAF and from 6 WAF until mature stage (12 WAF).

Values are given as the mean ± SE (n = 4). The thickness of the arrows represents the amount of S remobilized. †: significant difference from the control ($p < 0.05$). *: significant difference between Aviso and Capitol under HS70 condition ($p < 0.05$).

The S remobilized until 6 WAF was principally provided to seeds and pod walls, but also more significantly to flowers for Capitol than Aviso. The stem appeared to be a net source of remobilized S for Aviso until 6 WAF, but not for Capitol. The amount of S remobilized from roots was also significantly higher for Aviso than for Capitol until 6 WAF (Figure VIB. 3a, 3b, 4a and 4b). Between 6 WAF and seed mature stage (12 WAF), leaves represented the major source for S remobilized to seeds. When leaves fell down due to monocarpic senescence, these organs contained high amount of S, which represented for instance about 32% and 28% of total plant S for Aviso HS70 and Capitol HS70, respectively (Figure VIB. 3a, 3b, 4a and 4b).

In response to S limitation, the needs for S are fully satisfied through remobilization of endogenous S reserves in Capitol, while Aviso still absorbs a little amount of S up to 6 WAF (Figures VIB.3c, 3d, 4c and 4d). The allocation of this neo-absorbed S contributed significantly to S provision in developing seeds (3.7 mg ± 0.6 in LS53 conditions). Interestingly, LS53 treatment increased the amounts of S remobilized at the whole plant level for Aviso and Capitol until 6 WAF, and enhanced S remobilization from leaves to seeds in Aviso, at the expense of pod walls (Figure VIB.3c and d). The stem also appeared to be a significant source of remobilized S for Capitol between GS53 and 6 WAF in LS condition (Figure VIB.3d). Between 6 and 12 WAF, the amounts of S remobilized were significantly reduced in both genotypes due to the S restriction applied from GS53 when compared to HS condition. Nevertheless, the percentage of S remobilized to seeds increased for Capitol at the expense of fallen leaves (Figure VIB.3d). The LS70 treatment increased the amount of S remobilized from GS70 to 6 WAF only for Capitol, related to a higher remobilization from the stem (Figure VIB.4c and d), as previously observed in response to the LS53 treatment (Figure VIB.3c and d). Between 6 and 12 WAF, the LS70 treatment led to a higher remobilization of S from leaves to seeds (Figure VIB.4c and d), as previously observed by Dubousset *et al.* (2010).

C – 3 Evolution of seed dry weight, S, N and N/S ratio in developing seeds

Seed dry weight was significantly higher for Capitol than for Aviso since 2 WAF for the HS70/LS70 experiment and since 4 WAF for the HS53/LS53 experiment until mature stage (12 WAF; Figure VIB.5a and b). Hence, the amounts of S and N per seed were usually lower in Aviso than Capitol in HS condition (Figure VIB.5c, d, e, f). The differences between these

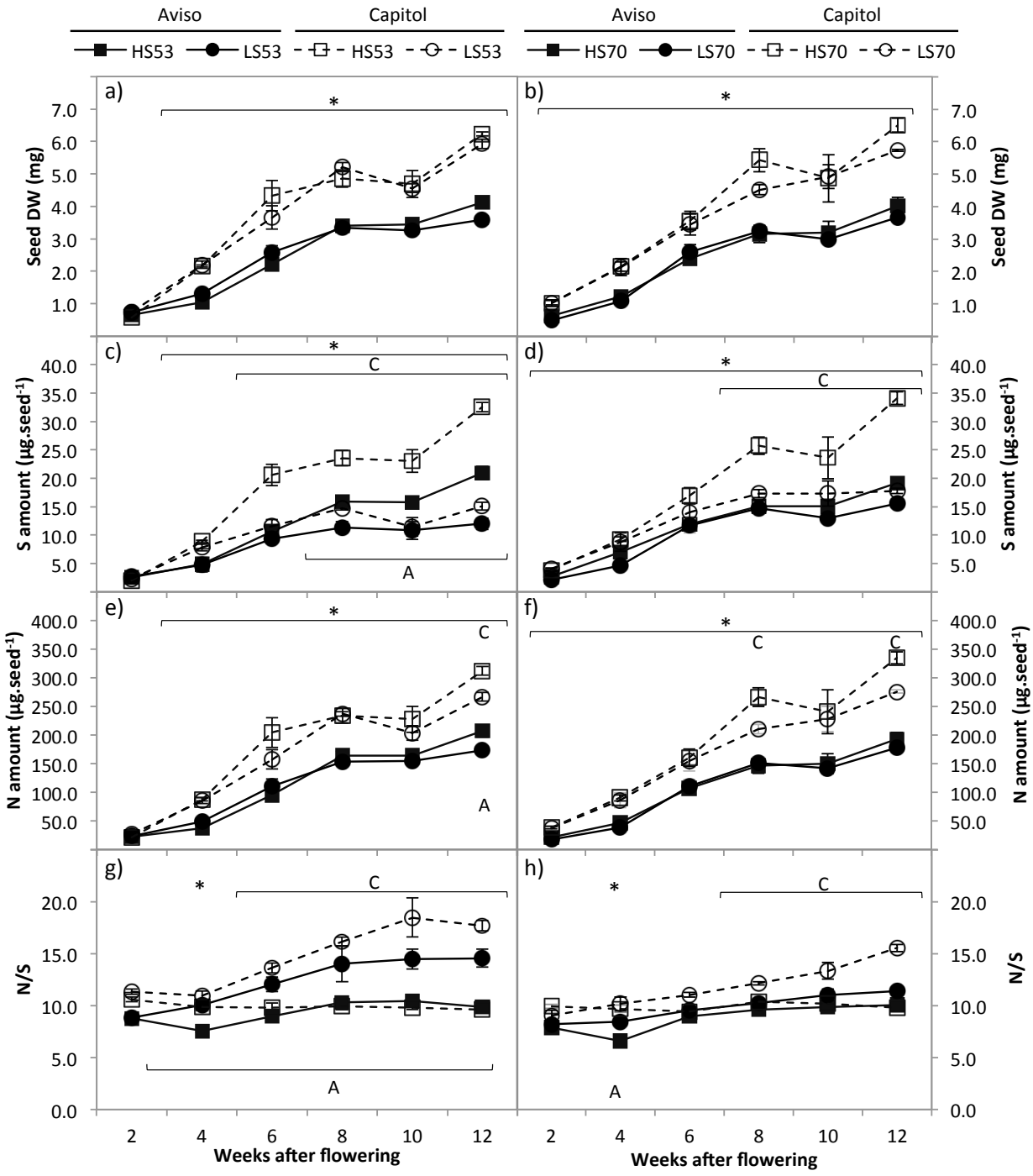


Figure VIB.5 Evolution of seed dry weight (DW, a and b), S (c and d) and N (e and f) amounts and N/S ratio (g and h) in Aviso (solid line and closed symbols) and Capitol (dotted line and open symbols) seeds in HS (squares) and LS (circles) conditions from 2 weeks after flowering until mature stage (12 weeks after flowering).

Values are given as the mean ±SE (n = 4). *: Significant differences between Aviso and Capitol in HS condition ($p < 0.05$). A: Significant differences between HS and LS condition for Aviso ($p \leq 0.05$). C: Significant differences between HS and LS condition for Capitol ($p < 0.05$).

two genotypes are usually less noticeable when the results are expressed as contents, such as for the S and S-sulphate contents (Figure VIB.S1). The S and N amounts in seeds increased from 2 to 12 WAF for both genotypes in HS condition (Figure VIB.5c, d, e and f). The LS53 treatment significantly reduced S accumulation in seeds from 8 WAF for Aviso and from 6 WAF for Capitol until mature stage (Figure VIB.5c). The LS70 treatment did not change S accumulation in seeds for Aviso, but it led to a significant reduction of S accumulation in Capitol seeds from 8 to 12 WAF compared to HS condition (Figure VIB.5d). The accumulation of N was not significantly affected by the LS treatments for Aviso, but it was significantly reduced in Capitol seeds at 12 WAF in response to LS70 and LS53 treatments (Figure VIB.5e and f). The seed N/S ratio was similar in HS condition between both genotypes except at 4 WAF where seed N/S ratio was significantly lower for Aviso than for Capitol (Figure VIB.5g and h). In response to LS53 treatment, the seed N/S ratio in seeds increased from 2 to 12 WAF for Aviso (from 8.8 to 14.6) and from 4 to 12 WAF for Capitol (from 10.9 to 17.7; figure VIB.5g). The seed N/S ratio was higher in response to LS70 treatment at 4WAF for Aviso, and from 8 to 12 WAF for Capitol (Figure VIB.5h).

C – 4 Changes in S-sulphate amounts and S-sulphate/S ratio in developing seeds

The S-sulphate amounts increased from 2 to 6 WAF and from 10 to 12 WAF, but remained stable from 6 to 10 WAF for both genotypes in HS conditions (Figure VIB.6a and b). The LS53 treatment significantly reduced the S-sulphate amount in seeds since 6 WAF in both genotypes (Figure VIB.6a). The LS70 treatment also significantly reduced the seed S-sulphate amount, from 10 WAF for Aviso and from 8 WAF for Capitol until mature stage (Figure VIB.6b). The S-sulphate/S ratio tended to increase between 2 and 4 WAF, and then decreased significantly from 4 to 6 WAF for both genotypes in HS conditions (Figure VIB.6c and d). This ratio was slightly but significantly higher in Capitol seeds at the end of seed growth (12% at 12 WAF) compared to Aviso (10% at 12 WAF). In response to LS treatments, a significantly higher S-sulphate/S ratio was observed at 4 WAF for Aviso and Capitol (Figure VIB.6c and d). The S-sulphate/S ratio was significantly reduced at 6, 10 and 12 WAF in Aviso seeds and from 8 to 12 WAF in Capitol seeds in response to LS53 treatment (Figure VIB.6c). The S-sulphate/S ratio was also significantly reduced at 12 WAF in Aviso seeds and at 10 and 12 WAF in Capitol seeds in response to LS70 treatment (Figure VIB.6d).

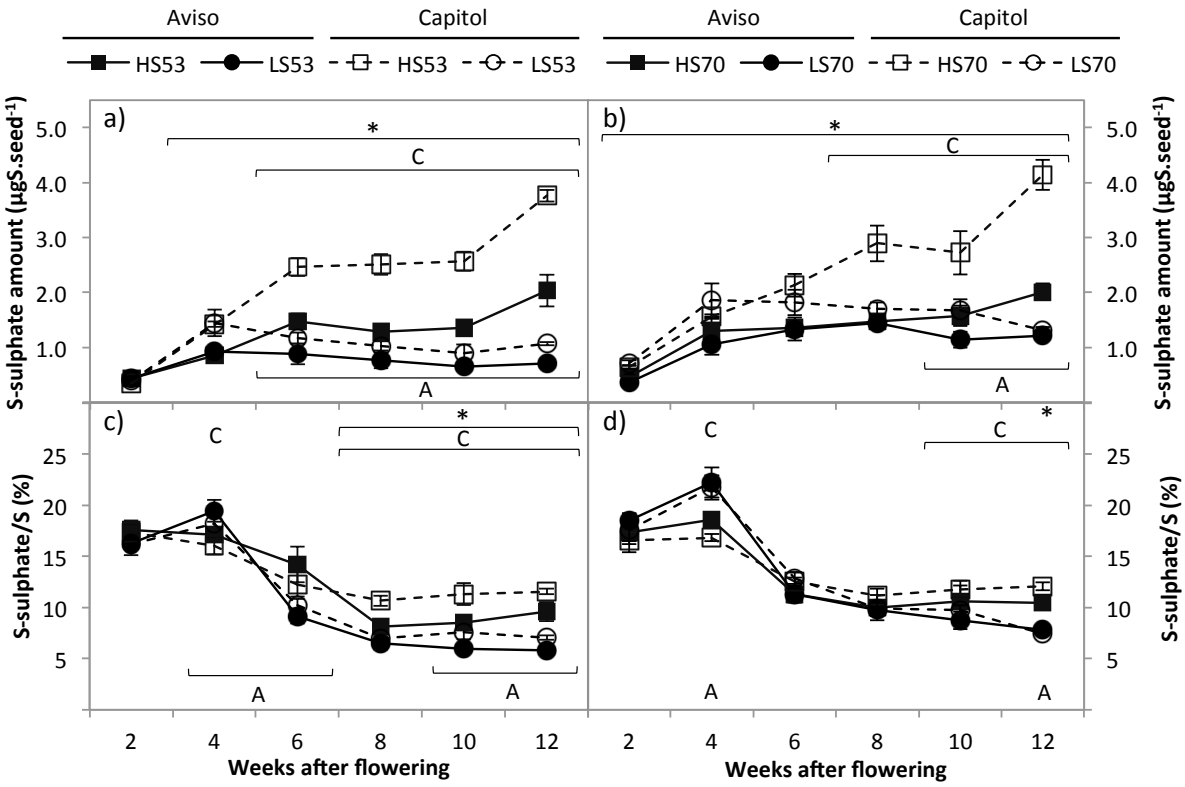


Figure VIB.6 Evolution of S-sulphate amount (a and b) and S-sulphate/S ratio (c and d) in Aviso (solid line and closed symbols) and Capitol (dotted line and open symbols) seeds in HS (squares) and LS (circles) conditions from 2 weeks after flowering until mature stage (12 weeks after flowering).

Values are given as the mean ±SE (n = 4). *: Significant differences between Aviso and Capitol in HS condition ($p < 0.05$). A: Significant differences between HS and LS condition for Aviso ($p \leq 0.05$). C: Significant differences between HS and LS condition for Capitol ($p < 0.05$).

C – 5 Evolution of protein, S-proteic amounts, S-proteic/S and N/S_p ratio

Seed protein amount increased between 2 and 12 WAF for Aviso and Capitol and was not affected by LS treatments, except at 8 WAF for Capitol LS70 (-21%) and at 10 WAF for Aviso LS70 (-32%; figure VIB.7a and b). Similarly, the S-proteic amount increased between 2 and 12 WAF, but was significantly reduced by the LS53 treatment at 10 and 12 WAF for Capitol and by the LS70 treatment from 8 to 12 WAF (Figure VIB.7c and d). The LS53 treatment also resulted in a reduced seed S-proteic amount for Aviso at 12 WAF. Interestingly, the LS53 treatment increased the S-proteic/S ratio in seeds at 8 and 12 WAF for Capitol and at 10 and 12 WAF for Aviso to reached 54.7% and 38.4% of total S in seeds respectively (Figure VIB.7e). This S-proteic/S ratio was maintained for Aviso and Capitol subjected to the LS70 treatment until 10 WAF, and increased at 12 WAF (Figure VIB.7f). As an indicator of seed protein quality (Zhao *et al.*, 1997), the N/S ratio in seed proteins (N/S_p) was also estimated by IRMS. This ratio decreased from approximately 24 to 12 between 2 and 12 WAF in HS conditions, while protein accumulate (Figure VIB.7g and h). The LS53 treatment increased the N/S_p ratio for Aviso and Capitol from 10 to 12 WAF and from 8 to 12 WAF, respectively (Figure VIB.7g). In response to the LS70 treatment the seed N/S_p ratio was not significantly affected for Aviso but increased at 10 and 12 WAF for Capitol (Figure VIB.7h).

C – 6 Changes in thiols amounts

The sulphite amount increased at the beginning of seed growth and then decreased until 12 WAF in both genotypes (Figure VIB.8a and b). Differently, γ-EC amount, that remained stable from 2 to 6 WAF, increased from 6 to 12 WAF in Capitol seeds while it remains relatively stable in Aviso seeds in HS condition (Figure VIB.7c and d). The accumulation profile of glutathione was different between Aviso and Capitol: while glutathione amount increased from 2 to 10 WAF in Aviso seeds, and then remained stable, a decrease in glutathione amount was observed between 8 and 10 WAF, followed by an increase between 10 and 12 WAF in Capitol seeds (Figure VIB.8e and f). The S restriction treatments lead to a reduction of thiols accumulation at the end of seed growth and particularly for Capitol (Figure VIB.8).

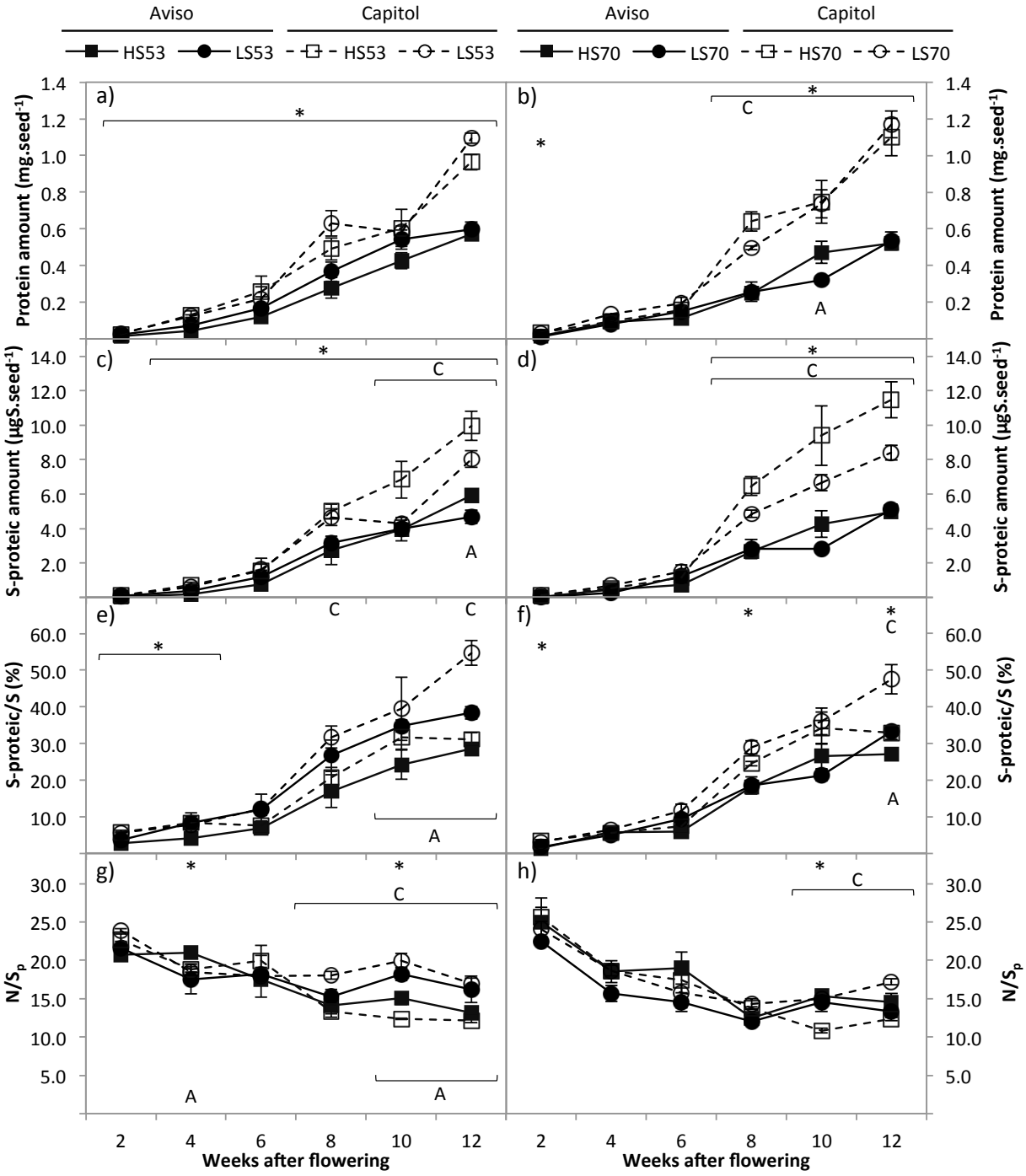


Figure VIB.7 Evolution of protein amount (a and b), S-proteic amount (c and d), S-proteic/S ratio (e and f) and N/S ratio of proteins (g and h) in Aviso (solid line and closed symbols) and Capitol (dotted line and open symbols) seeds in HS (squares) and LS (circles) conditions from 2 weeks after flowering until mature stage (12 weeks after flowering).

Values are given as the mean ±SE (*n* = 3). *: Significant differences between Aviso and Capitol in HS condition ($p < 0.05$). A: Significant differences between HS and LS condition for Aviso ($p < 0.05$). C: Significant differences between HS and LS condition for Capitol ($p < 0.05$).

C – 7 Evolution of ATPS and APR activities

A different ATPS activity profile was observed during seed growth of both genotypes (Figure VIB.9a and b). Whereas ATPS activity increased from 2 to 6 WAF and decreased then in Capitol seeds, the ATPS activity in Aviso seeds, that was higher than for Capitol at 2 WAF, decreased with seed growth until 12 WAF. ATPS activity has been affected by none of the S restriction treatments (Figure VIB.9a and b). The APR activity, high at 2 WAF in Aviso and Capitol seeds, decreased until 12 WAF for both genotypes. This activity was not affected in Aviso seeds by the LS treatments, but it was significantly higher in Capitol seeds from 4 to 10 WAF in response to LS53 treatment as compared to HS53 and from 6 to 10 WAF in response to LS70 treatment as compared to HS70 (Figure VIB.9c and d).

D Discussion

D – 1 S restriction reduced seed yield of Capitol by affecting the number of seeds produced per plant

Under optimal sulphate availability (HS conditions), Aviso and Capitol have similar seed yield but different seed production strategies. Indeed, Aviso has higher number of seeds per plant but a lower seed dry weight than Capitol. While seed yield is not significantly affected by S restriction applied at GS53 (LS53 treatment) for Aviso and at GS70 (LS70 treatment) for Aviso and Capitol, it is significantly reduced by the LS53 treatment for Capitol. This decline of seed yield is principally associated to a reduced number of seeds per plant (Table VIB.1). Indeed, these two parameters are correlated, especially for Capitol (r=0.95 for Capitol and r=0.89 for Aviso).

As previously demonstrated by Dubousset *et al.* (2010), the increase in SHI for both genotypes in LS conditions shows that S mobilization to seeds is more efficient than in HS condition. In comparison with HS conditions, the reductions of NHI and NUtE in response to the LS53 treatment for both genotypes, as previously observed by Dubousset *et al.* (2010), lead to reduced N amounts in mature seeds (Table VIB.1 and figure VIB.5) but has no effect on the protein amounts (Figure VIB.7). These results indicate that an S restriction occurring at the visible bud stage (GS53) is early enough to cause profound changes in N management at the whole plant level, without any impact on seed protein accumulation. It is commonly accepted that an S limitation can significantly reduce NUtE (Fismes *et al.*, 2000), impacting negatively on the nitrate absorption and assimilation capacities (Kopriva & Rennenberg,

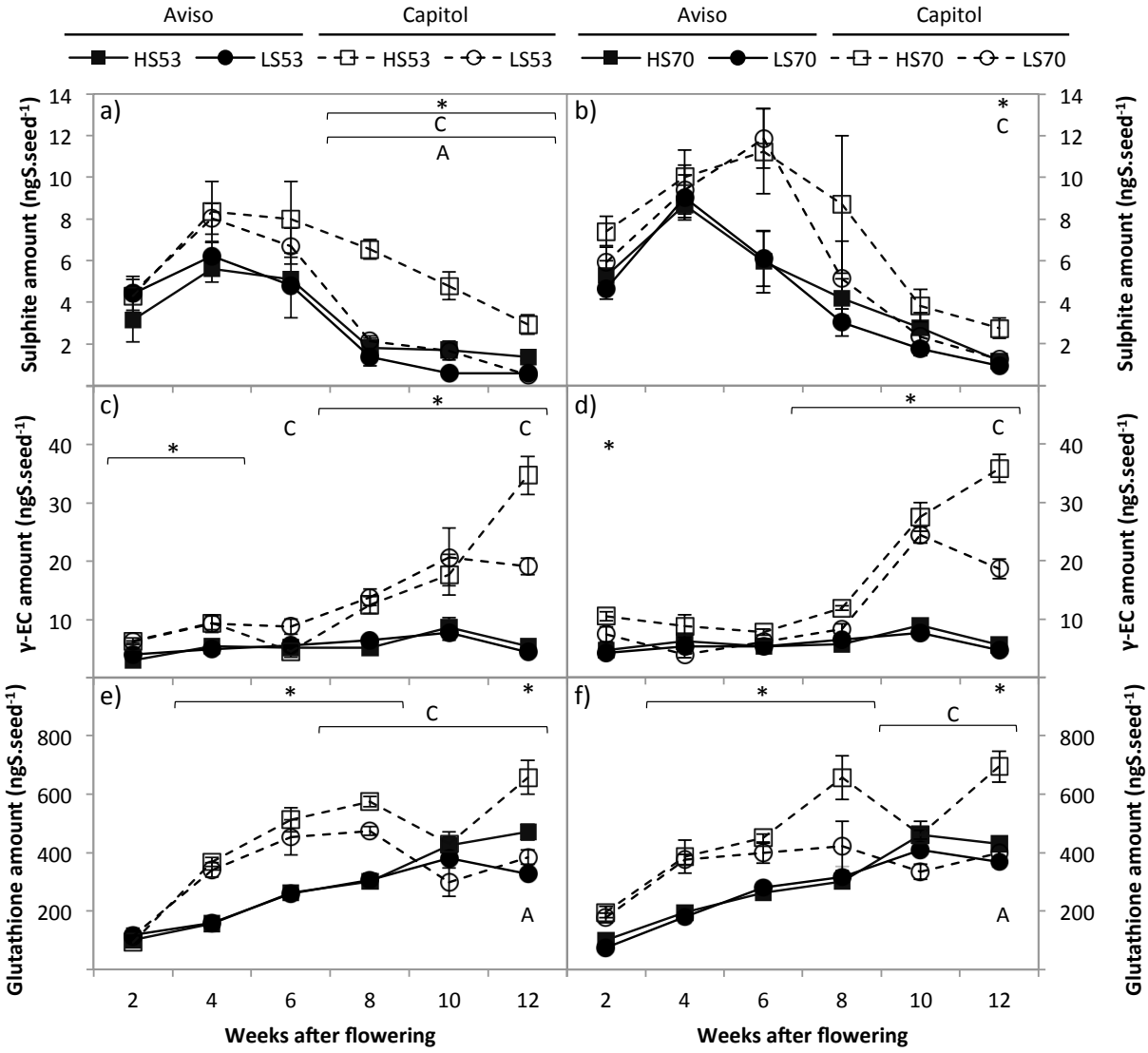


Figure VIB.8 Evolution of sulphite (a and b), γ-glutamylcysteine (γ-EC, c and d) and glutathione (e and f) amounts in Aviso (solid line and closed symbols) and Capitol (dotted line and open symbols) seeds in HS (squares) and LS (circles) conditions from 2 weeks after flowering until mature stage (12 weeks after flowering).

Values are given as the mean ±SE (n = 4). *: Significant differences between Aviso and Capitol in HS condition ($p \leq 0.05$). A: Significant differences between HS and LS condition for Aviso ($p < 0.05$). C: Significant differences between HS and LS condition for Capitol ($p < 0.05$).

2004). An earlier S restriction could decrease both the NUtE and the seed protein amount, as observed by Dubousset *et al.* (2010) in response to an S restriction applied at the bolting stage (GS32). In *Arabidopsis thaliana*, an S restriction leads to a reduced seed protein amount related to a lower accumulation of S-rich seed storage proteins (SSP; Higashi *et al.*, 2006). For oilseed rape, the increase in N/S_p ratio and the maintenance of the protein amount in LS condition suggests a compensation of the protein accumulation in favour to S-poor seed storage proteins.

D – 2 S remobilisation in LS treated plants is enhanced earlier for Aviso than for Capitol.

As previously observed in previous studies, oilseed rape leaves are the major source of remobilized S, but these organs fall down with an important amount of S in HS condition for both genotypes (Figure VIB.3a, 3b, 4a and 4b ; Dubousset *et al.*, 2010). Nevertheless, the genotypes Aviso and Capitol show differences in S management, notably until 6 WAF. In HS condition, sulphate absorption and allocation to seeds and pod walls are more substantial for Aviso than for Capitol, and roots also appeared to be a substantial source of remobilized S until 6 WAF for Aviso, but not strikingly for Capitol. This contrast with the results obtained by Balint & Rengel (2011b), that aimed to compare S uptake and remobilisation in spring oilseed rape genotypes with varied SUtE. These authors showed that the genotype Karoo appeared to be less efficient than Surpass 402 CL in taking up S, but was more efficient in remobilising S from leaves and stems to reproductive organs. The induction of S remobilisation to seeds in LS conditions is not different between GS53 and mature stage (12 WAF) or between GS70 and mature stage for these two genotypes (data not presented). Nevertheless, the two genotypes exhibit different temporal response to the LS53 treatment, since it occurs predominantly between GS53 and 6 WAF for Aviso and between 6 and 12 WAF for Capitol, as in LS70 condition (Figure VIB.4). Compared to HS conditions, the amount of S transferred to seeds through remobilisation between GS53 and 6 WAF increase further in response to the LS53 treatment for Aviso (+2.34 fold) than for Capitol (+1.36 fold) plants. Between GS53 and 6 WAF, the amount of S remobilized from leaves does not differ between Aviso and Capitol in response to the LS53 treatment, but the lost of S in fallen leaves is significantly lower for Aviso than for Capitol. These findings show that S remobilisation to seeds is earlier and more efficient for Aviso than for Capitol in response to the LS53 treatment. The high S remobilisation efficiency observed for Aviso in response to the LS53

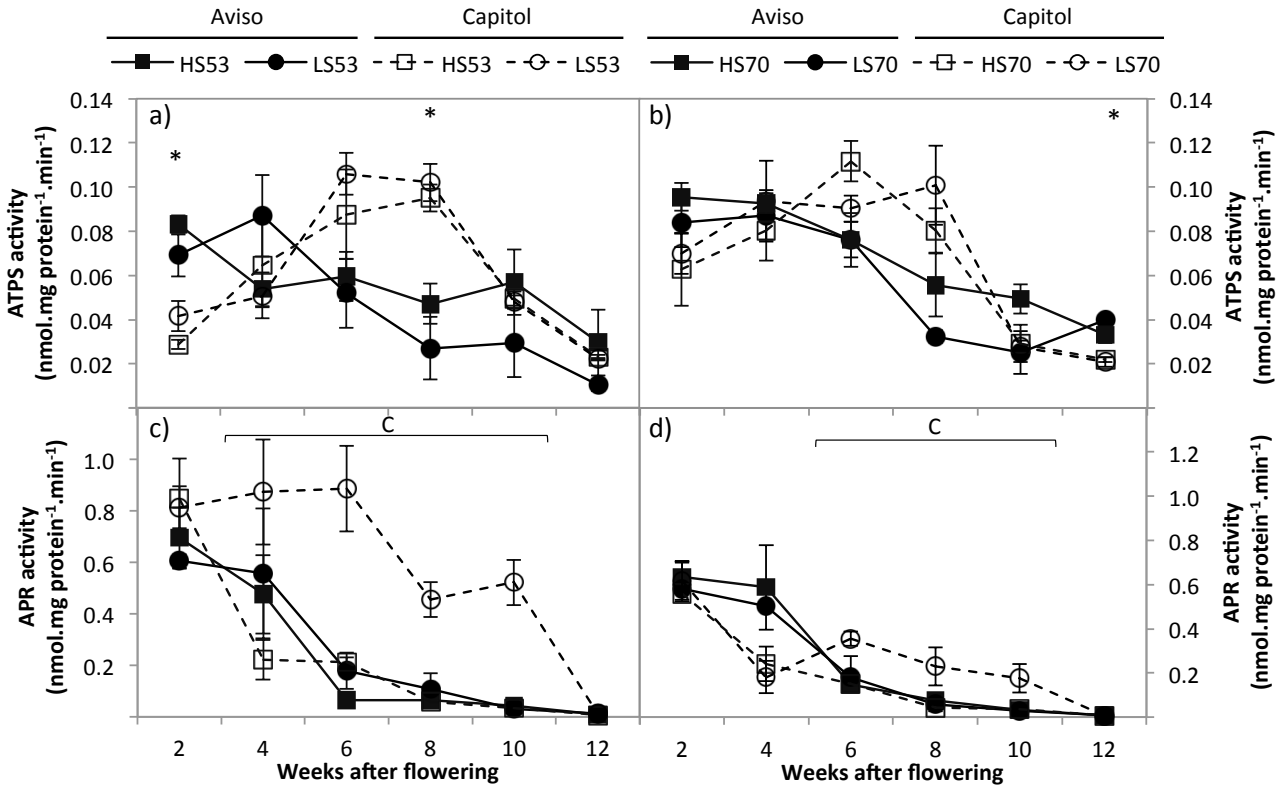


Figure VIB.9 Evolution of ATPS (a and b) and APR (c and d) activities in Aviso (solid line and closed symbols) and Capitol (dotted line and open symbols) seeds in HS (squares) and LS (circles) conditions from 2 weeks after flowering until mature stage (12 weeks after flowering).

Values are given as the mean ±SE (n = 4). *: Significant differences between Aviso and Capitol in HS condition ($p < 0.05$). A: Significant differences between HS and LS condition for Aviso ($p < 0.05$). C: Significant differences between HS and LS condition for Capitol ($p \leq 0.05$).

treatment allows a maintenance of seed S amount at a level very close to the control until 6 WAF, while it is significantly reduced (-43%) in Capitol seeds at this date. Although the mineral S availability was very low, the sulphate uptake was significant between GS and 6 WAF in LS condition for Aviso in contrast with Capitol (Figures VIB.3c, 3d, 4c and 4d). This capacity to taken up mineral S may also contribute to meet the plant and seeds needs up to 6 WAF for Aviso. S remobilisation allows maintenance of seed S content from 6 to 12 WAF in LS53 condition at a relatively stable level for Aviso, while it decreases significantly between these two dates for Capitol in LS53 condition (Figures VIB.S1a).

This work has also revealed an important role of other organs than leaves in the seed S filling process. The amount of S remobilised from stem increases in response to S restriction, suggesting that this organ is also a source of endogenous S for seed in LS conditions (Figures VIB.3 and 4). The amount of S stored in pod walls at mature stage is significantly lower in case of S restriction (up to 83% decline in response to LS53 treatment for Aviso), and these differences are far more important than those observed in seeds. These results suggest that S management in pods may changes in LS conditions, promoting seed filling, as recently observed for Capitol (D'Hooghe *et al.*, 2013a, in press).

D – 3 S metabolism in developing seeds is modulated by S restriction

Although ATPS and APR activities are measured *in vitro*, our study suggests the presence of these activities in developing *B. napus* seeds. These results are in agreement with our recent work that reported the ability of the seed to assimilate S as sulphate in oilseed rape (D'Hooghe *et al.*, 2013a, in press). Together with the decrease in sulphate and the evolution of thiols contents (Figures VIB.S2), it appears that S primary metabolism is active in seeds during their development, as previously in other species, such as soybean, wheat or lupine (Sexton & Shibles, 1999; Tabe & Droux, 2001; Fitzgerald *et al.*, 2001). The APR activity is strong at 2 WAF and decreases with seed development, principally due to the accumulation of proteins (Figure VIB.9). LS treatments lead to increase the accumulation of S-proteic compared to their lower S supply, since the S-proteic/S ratio is either maintained in LS70 seeds or increased in LS53 seeds compared to HS seeds (Figure VIB.7). The higher S-proteic/S and the lower S-sulphate/S ratios in LS seeds could be associated both to the mobilization of the sulphate stored and to the induction of S assimilation at the seed level, as observed for *Arabidopsis thaliana* leaves (Davidian & Kopriva, 2010). Indeed, although ATPS was not

changed in LS conditions, the higher APR activity in Capitol LS53 and LS70 seeds shows that S restriction can lead to the activation of seed S assimilation capacity. Notwithstanding, since the increase in S-proteic/S ratio is observed in LS53 seeds, whether APR is high (Capitol), or remains stable (Aviso), APR appears to be not limiting for reductive sulphate assimilation into developing seeds. Furthermore, the correlation between S-proteic and protein amounts is very high ($r > 0.97$ for HS, LS70 and LS53 seeds from Aviso and Capitol). Then, the rate of sulphate assimilation through the reductive pathway and the accumulation of S into proteins appear to be principally controlled by the sink strength exerted by protein accumulation. Another argument for this hypothesis is provided by the N/S_p ratio, which decreases with the progression of seed growth in HS condition demonstrating that S accumulation into proteins increases during protein accumulation. Interestingly, it seems that the decline of S and S-compounds amounts, that comes at 6 WAF in Capitol LS53 seeds and at 8 WAF in Capitol LS70 seeds are not directly responsible for the up-regulation of APR activity that is observed earlier, since 4 WAF in Capitol LS53 seeds and 6 WAF in Capitol LS70 seeds.

S assimilated appeared to be in priority allocated to proteins, which represent, as expected, a major S fraction in seeds. Consequently, in response to S restriction, this leads to the decline or the maintenance to a low level of other S compounds, such as glutathione. In HS condition, the glutathione accumulated in seeds is both provided by the vascular system and synthesized in embryo (Cairns *et al.*, 2006). Interestingly, our results suggest that the glutathione accumulated in Capitol seeds until 8 WAF is actively catabolized between 8 and 10 WAF, which could provide cysteine for protein synthesis, as observed in wheat endosperm (Fitzgerald *et al.*, 2001). In LS condition, the accumulation of glutathione is impaired for both genotypes at the end of seed development, showing that cysteine accumulation into proteins is favoured at the expense of glutathione.

E Conclusion

In this study, Aviso and Capitol, two genotypes with differences in S management were compared with regard to S deficiency. In HS condition, while the SHI and SUtE were not different between both genotypes, the genotype Aviso appears to manage its sulphur more efficiently than Capitol, notably through higher uptake and redistribution to reproductive organs during the first steps of seed growth. The S restrictions applied in this study affected the NUtE and NHI in both genotypes without causing a negative impact on the level of

protein accumulation in seeds. Seed yield and quality (estimated by the N/S ratio in seed proteins) for Aviso is also less affected than for Capitol by S restriction, due to (i) the maintenance of S absorption, even if provided in minute amounts, (ii) the earlier and stronger remobilization of S from leaves, roots and stem to developing seeds compared to Capitol. Thus, one can assume that S deficiency is perceived more intensely by Capitol seeds than Aviso, what could be at the origin of the higher APR activity. However, our observations show that APR is not limiting for sulphate assimilation into developing seeds under S restriction, and that seed S metabolism is principally devoted to protein synthesis. Since the mature seed dry weight is lower for Aviso than for Capitol, the needs for S of an individual seed are therefore lower. This observation could also be an explanation of the better S management by Aviso than Capitol, since less S has to be provided to each seed to satisfy its needs. Investigate the effects of S restrictions on a large number of genotypes with similar yields, but with different numbers of seeds produced per plant and seed weight could help to know if it can be a good indicator of efficient varieties in LS conditions.

Funding

This work was supported by the national SERAPIS program (Optimization of the sulphur fertilization: Development of innovative fertilizers and indicators of sulphur nutrition in plants). The program SERAPIS is coordinated by the private company TIMAC AGRO INTERNATIONAL – ROULLIER Group and benefits of financial supports from the Région Basse-Normandie, Région Bretagne, Région Pays-de-la-Loire, FEDER Basse-Normandie, Fonds Unique Interministériel, Roullier, Angers Loire Métropole. This work was also supported by a Ph.D. grant to Philippe D'Hooghe from the French Ministry of Research.

Chapitre VII

Germinative and post-germinative behaviours of *Brassica napus* seeds are impacted by the severity of S limitation applied to the mother plants.

Hypothèse : La réduction de la viabilité observée en réponse à une restriction précoce de l'apport de S (au stade GS32) est associée à des impacts sur la germination *sensu stricto*. La capacité d'absorption du sulfate est plus importante dans des plantules développées à partir de graines récoltées sur des plantes limitées en S.

Objectifs : Un premier objectif consistait à étudier la cinétique de germination et l'évolution des principaux composés soufrés lors de la germination de graines obtenues en conditions de limitation/restriction de l'apport de S. Un second objectif consistait à étudier la capacité d'absorption du sulfate dans des plantules développées à partir de graines récoltées sur des plantes limitées en S.

Démarche expérimentale : Les expérimentations ont été menées sur des graines de deux génotypes de colza (cv. Capitol et Yudal) récoltées sur des plantes soumises à une limitation ou une restriction de l'apport de S au cours de leur développement. Les indices de germination (vitesse de germination, temps nécessaire pour atteindre 50 % de graines germées, taux de germination cumulé, taux de plantules normales produites…) ont été déterminés pour les deux génotypes. Étant donnée la difficulté de produire suffisamment de graines dans des conditions contrôlées de limitation/restriction en S, les graines de colza d'hiver (cv. Capitol) ont été utilisées pour mettre en évidence la présence d'un métabolisme soufré actif au cours de leur germination, et étudier les impacts de restrictions en sulfate appliquées à la plante mère sur ce métabolisme pendant la germination. Les plantules développées à partir des graines récoltées sur les colzas de printemps (cv. Yudal) cultivés dans des conditions de limitations en S variables ont été utilisées afin d'évaluer leur capacité d'absorption du sulfate par un apport de sulfate marqué au ^{34}S.

Résultats : Les graines des génotypes Capitol et Yudal produites en condition de limitations séveres en sulfate ont un faible taux de production de plantules normales en comparaison de graines témoins, associée à une réduction de la vigueur germinative ainsi qu'à une perturbation des événements post-germinatifs. Les expérimentations réalisées sur les graines de Capitol en germination montrent une activation précoce du métabolisme S suite à la completion de la germination, qui peut être altéré dans les graines issues de plantes limitées en S. Les plantules du génotype Yudal développés à partir de graines issues de plantes fortement limitées en S ont des biomasses, des capacités d'absorption du sulfate et de translocation du S vers les parties aériennes plus importantes que les plantules développés à partir de graines issues de plantes bien alimentées en S.

Chapitre VII : Germinative and post-germinative behaviours of *Brassica napus* seeds are impacted by the severity of S limitation applied to the mother plants.

D'Hooghe Philippe[1,2,3], Besnard Julien[1,2,3], Picot Dimitri[1,2,3], Brunel-Muguet Sophie[1,2,3], Kopriva Stanislav[4], Trouverie Jacques[1,2,3], Jean-Christophe Avice[1,2,3],.

[1]Normandie Univ, France

[2]UNICAEN, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France

[3]INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France

[4]John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich, NR4 7UH, UK.

Key words: Seed, germination, S limitation, S metabolism, ^{34}S labelling, sulphate uptake, oilseed rape.

Abstract

In oilseed rape (*Brassica napus* L.) sulphur (S) limitation leads to a reduced yield and seed quality, but also to a reduced seed ability to produce normal seedlings. While S metabolism is known to be involved in the control of germination *sensu stricto* and seedling establishment, the knowledge concerning the impacts on these key steps of plant growth from seeds harvested from plants subjected to S-limited conditions remains poor. Therefore, our first goal was to determine the impact of various S-limited conditions applied to the mother plant on the germination indexes and the rate of normal seedlings of a winter (cv. Capitol) and a spring (cv. Yudal) oilseed rape cultivars. Secondly, seeds harvested from cv. Capitol were used to highlight the presence of an active S metabolism in germinating seeds, and to study the impacts of S-restriction applied to the mother plant on this metabolism during germination. The seeds from cv. Capitol and cv. Yudal produced under the most severe S-limited conditions showed a reduced production rate of normal seedlings, related to a reduction of germination vigour and to perturbations of post-germinative events. The investigations made on Capitol germinating seeds showed that S metabolism is early active after germination completion, and can be affected in seeds harvested from S-limited plants. Using ^{34}S-sulphate pulse method, the sulphate uptake capacity during the development of seedlings was also investigated in seeds coming from plants (Yudal) fed with a 500 µM sulphate solution. These results revealed that the seedlings grown from seeds produced by plants subjected to a severe S-limitation treatment enhanced their sulphate uptake by roots and translocation capacities to shoots compared to seedlings obtained from seeds produced by well S-supplied plants.

A Introduction

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is particularly sensitive to sulphur (S) limitation that results in reduced yield and seed quality. This lack of seed quality may have unexpected impacts on seed germination and/or on the viability of subsequent seedlings. Indeed, the mature seeds produced by oilseed rape subjected to a sulphate (SO_4^{2-}) restriction early applied in the cycle of development (i.e. at the bolting stage), were characterized by a low ability to produce normal seedlings (Dubousset *et al.*, 2010). Seed germination *sensu stricto* is a two-phases process that starts with the uptake of water by the quiescent dry seed and terminates with the elongation of the embryonic axis. The completion of germination is visible by the penetration of the structures surrounding the embryo by the radicle (radicle protrusion) and subsequent events are more specifically associated with seedling establishment (Bewley & Black, 1994; Bewley, 1997; Nonogaki *et al.*, 2010). Germination *sensu stricto* and seedling establishment are complex processes which are regulated by species-dependant mechanisms (For review, Bewley & Black, 1994; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Nonogaki *et al.*, 2010; Rajjou *et al.*, 2012). In oilseed rape, mature seeds are non-dormant, but can enter into secondary dormancy if environmental conditions are not favourable for germination (López-Granados & Lutman, 1998). The environmental conditions impact on the synthesis and the degradation of abscisic acid (ABA) and gibberellins (GAs), and also on the sensitivity to these phytohormones. While a change in the ABA/GAs balance to the benefit of ABA promotes dormancy, a modification of this balance in favour of GAs promotes germination (For review, Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

Sulphur metabolism is involved at various levels in the control of germination *sensu stricto* and seedling establishment (For review, Rajjou *et al.*, 2012). As a methyl group donor but also as a precursor of biotin and ethylene, the *S*-adenosylmethionine (SAM), synthesized by SAM synthetase from methionine, is involved in germination *sensu stricto* and post-germinative events (i.e. seedling establishment from a germinated seed). Indeed, DNA and histone methylations change the chromatin structure and thus regulate the expression of many genes during germination events (Nakabayashi *et al.*, 2005). Biotin is the cofactor of many decarboxylase, including the acetyl-CoA carboxylase, a key enzyme in lipid synthesis or the pyruvate carboxylase, particularly involved in gluconeogenesis (Alban *et al.*, 2000). Ethylene has a regulatory role on the germination of *Arabidopsis thaliana* in opposition to ABA, favouring endosperm weakening and rupture. Ethylene can also modulate the post-

germinative events, interacting with the signalling pathways of ABA, ROS and cytokinines (Subbiah & Reddy, 2010). Paradoxically, ethylene promotes the success of post-germinative events but inhibits shoot and root growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings (Guzmán & Ecker, 1990; Gallardo *et al.*, 2002b; Achard *et al.*, 2003).

Sulphur limitation is well-known for modulating the S management in Brassicacea species, by increasing the sulphate uptake, remobilisation and assimilation capacities (For review, Davidian & Kopriva, 2010; Takahashi *et al.*, 2011b). However, according to our knowledge, no study has really considered the impacts of S limitation on germination *sensu stricto*, on seedling establishment, and on S management by harvested seeds in oilseed rape. In order to investigate these issues, we performed two experiments using seeds from two oilseed rape genotypes (cv. Capitol and Yudal) harvested from plants subjected to various S-limitations during their growth. Thus, germination indexes (such as speed of germination, time to reach 50% of germinated seeds, cumulative germination rate) and the rate of normal seedlings were determined for both genotypes. The seeds from the winter oilseed rape cv. Capitol were used to highlight the presence of an active S metabolism in germinating seeds, and to determine the impacts of S-restriction applied to the mother plant on germination capacities and S metabolism during germination (Experiment 1). The seedlings developed from seeds harvested from the spring cv. Yudal, grown under various S-limitation, were used i) to verify if the germination and the subsequent seedlings development were affected and ii) to evaluate the sulphate uptake capacity of the seedlings developed from these seeds, by using a specific ^{34}S-sulphate pulse method (Experiment 2).

B Material and methods

To address the objectives of the present work, two experiments were conducted. The first experiment (Experiment 1) was carried out on a winter oilseed rape genotype (cv. Capitol) in order to determine how the germination and S metabolism were impacted in seeds obtained from plants subjected to S limitation (LS treatment) applied at three critical phases of development. The second one (Experiment 2) was conducted on a spring oilseed rape genotype (cv. Yudal) in the aim to verify if the germination and the subsequent development of seedlings were affected in seeds that were obtained from plants supplied with different levels of sulphate.

B – 1 Seeds and plant material

B – 1.a Production of seeds from plants submitted to S limitation applied at different growth stages (Experiment 1, cv. Capitol)

The growth conditions applied to obtain the mature seeds from cv. Capitol used in Experiment 1 were described in details by Dubousset *et al.* (2010; Figure III.2). Control seeds were harvested from plants supplied with 508.7 µM SO_4^{2-} during the whole life cycle, while seeds from low S (LS) plants, i.e. LS32, LS53 and LS70 seeds, were respectively harvested from plants subjected to S-restriction (8.7 µM SO_4^{2-}) applied from the bolting stage (GS32), from the visible bud stage (GS53) or from the start of pod filling (GS70) until mature seed stage. The harvested mature seeds were stored at 12°C under vacuum in a desiccator until their use for further biochemical analysis and germination tests.

B – 1.b Production of seeds from plants supplied with different levels of sulphate (Experiment 2, cv. Yudal)

The mature seeds from cv. Yudal used in Experiment 2 were harvested from plants grown under greenhouse conditions and supplied with four different levels of S nutrition calculated according to the optimal S needs of Capitol under control conditions from the study conducted by Dubousset *et al.* (2010). The four treatments were applied as follows: plants were supplied with 400%, 70%, 20% and 5% of the optimal S needs as sulphate from the beginning of the plant growth cycle until mature seed stage. The seeds of each treatment, i.e. S400%, S70%, S20% and S5% seeds, were harvested at maturity and stored at 12°C under vacuum in a desiccator until their use for germination tests. The seeds were also used for the investigations on seedling development and for testing sulphate uptake capacity of Yudal seedlings using a $^{34}SO_4^{2-}$ pulse method (see below).

B – 1.c Protocol for studying the development and sulphate uptake capacities of seedlings coming from seeds produced by plants supplied with suboptimal levels of sulphate from the beginning of the plant growth cycle (Experiment 2, cv. Yudal)

Fourteen days after sowing on perlite soaked with water (d14), viable Yudal seedlings obtained from each treatment (i.e. S400%, S70%, S20% and S5% seedlings) were fed with $^{34}SO_4^{2-}$ (pulse of 24h) for testing their S uptake capacity. Seedlings were transferred for 24 h on perlite soaked with 25% Hoagland nutrient solution with 508.7 µM $^{34}SO_4^{2-}$ (5 atom% excess; d15 + $^{34}SO_4^{2-}$) or in S-restricted condition (8.7 µM SO_4^{2-}; d15 -S). After this period, seedlings were collected and profusely rinsed with water for 1 min. Shoots and roots were

separated and an aliquot of each was stored at -80°C for RNA extraction and q-PCR analysis. A further aliquot of each sample was freeze-dried for the determination of total S and ^{34}S contents after application of $^{34}SO_4^{2-}$ feeding (d15 +$^{34}SO_4^{2-}$) or S-restricted condition (d15 -S).

B – 2 Germination tests

Mature seeds obtained for each treatment were first calibrated to a diameter of 1.6 mm or more (*n* = 4 for Capitol, *n* = 3 for Yudal). Fifty seeds per biological repetition were sown on Whatman filter paper soaked with 10 mL sterile water within Petri dishes (12 x 12 cm). The Petri dishes were then closed and placed in darkness inside a growth chamber at 20°C and 70% relative humidity. Seeds that show a completed radicle protrusion through the seed coat were counted as germinated. The observation was conducted at regular time steps for both genotypes. For Capitol, seeds were harvested 15, 30, 40, 50 and 60 h after sowing for determination of fresh weight, water content and further biochemical analysis. The cumulative germination rates of the different seed lots were fitted to a Gompertz function (Brown & Mayer, 1988).

B – 3 Germination indexes

Five germination indexes were selected for this study. The final germination rate was determined at 58 h for Capitol and 71 h for Yudal. The time to reach 50% germination of the total number of seeds (T50) and 50% of the final germination rate (T'50) were calculated from the Gompertz functions. The speed of germination was calculated according to Bradbeer (1988) using the following equation:

$$Speed\ of\ germination = \sum \frac{N_t - N_{t-1}}{t}$$

Where N_t is the proportion of germinated seeds (Cumulative germination rate) observed at t hours.

The coefficient of the rate of germination (CRG) was calculated according to Bewley & Black (1994) with the following equation:

$$CRG = 100 \times \frac{\sum Nt}{\sum (t \times Nt)}$$

B – 4 Determination of normal seedling rate

For Capitol, the normal seedling rate was measured 7 d after sowing by Dubousset *et al.* (2010). Mature seeds were germinated on Whatman filter paper soaked with sterile water within Petri dishes (12 x 12 cm). Fifty seeds per biological repetition (*n* = 6 for Control and *n* = 4 for each LS treatment) were sown on water for 7 d with a cycle of 8 h dark (18°C)/16 h light (25°C) and with a photon flux density of 400 µmol.m^{-2}.s^{-1}. Three technical replicates were performed for each biological repetition. For Yudal, 150 mature seeds per biological repetition (*n* = 3) were germinated on perlite medium soaked with water for 14 d (d14) with a cycle of 8 h dark (18°C)/16 h light (25°C) and a photon flux density of 400 µmol.m^{-2}.s^{-1}. The rate of seedlings with normal development was determined for each S treatment (Table VII.2).

B – 5 Biochemical and molecular analyses

B – 5.a S and ^{34}S analysis

Freeze-dried samples were ground to a fine powder, weighed and prepared into tin capsules for determination of total S contents (Experiment 1 and 2) and of the changes of the relative ^{34}S amount in excess in each sample derived from the tracer fed to the test plant (Experiment 2) using an elemental analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy) connected to a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (IRMS; Isoprime, GV Instruments, Manchester, UK).

B – 5.b Determination of S-sulphate amount

Sulphate was extracted from 45 mg dry weight (DW) of seed samples ground to a fine powder, incubated twice with 2 mL of 50% ethanol, at 40°C for 1 h, centrifuged (10 000 *g*, 20 min), incubated twice with 2 mL of water, at 95°C for 1 h, and centrifuged (10 000 *g*, 20 min). The supernatants were pooled and evaporated under vacuum (Concentrator Evaporator RC 10.22, Jouan, Saint-Herblain, France). The dry residue was resuspended in 2 mL of ultra-pure water. The sulphate concentration was directly determined by high performance liquid chromatography as recommended by the manufacturer (HPLC, ICS3000, Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA).

B – 5.c Determination of S-proteic amount

For determination of S-proteic amounts, soluble proteins were extracted by grinding 30 mg fresh weight of mature seeds in 0.5 mL of citrate Na-phosphate buffer (20 mM citrate and 160 mM Na_2HPO_4, pH 6.8). The homogenate was centrifuged at 12 000 *g*, 4°C for 1 h and the resulting supernatant was used to determine the concentration in soluble proteins by protein-dye standing (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard. Proteins were then precipitated by adding four volumes of 10% TCA in acetone to one volume of extract. After storage at -20°C overnight, the extract was centrifuged (12 000 *g*, 4°C, 20 min) and the resulting pellet was washed twice with 1 mL 80% acetone, and centrifuged (16 000 *g*, 4°C, 3 min). Residual acetone was evaporated under vacuum at 45°C, and the resulting pellet, resuspended in 0.1 mL of ultra-pure water, was placed into tin capsule. The water was then evaporated under vacuum at 45°C (Speedvac Concentrator 5301, Eppendorf, France) and dry protein extract was analysed for S content using an elemental analyser combined to an IRMS as described above for total S.

B – 5.d Determination of protein amount

Total proteins were extracted from 10 mg fresh weight of seeds according to a protocol described by Gallardo *et al.* (2002a). After 1 h incubation at room temperature in the thiourea/urea buffer, the extracts were centrifuged twice at 20 000 *g*, 4°C, for 10 min. Protein concentration was then measured according to Bradford (1976).

B – 5.e Determination of sulphite, cysteine, γ-glutamylcysteine (γ-EC) and total glutathione amounts by HPLC

Thiols were extracted by grinding 10 mg DW of seed in 0.2 mL of 0.1 M HCl. After centrifugation (20 000 *g*, 10 min), the supernatant was used to measure the content of total sulphite, γ-EC and total glutathione after reduction with DTT by HPLC using the monobromobimane derivatization method as described by Koprivova *et al.* (2008).

B – 5.f Relative expression of BnSultr1 genes using Q-PCR

Total RNA was extracted from 80 mg fresh weight of cv. Yudal roots or shoots samples at d14, using the Mini Kit RNeasy from Qiagen (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturers protocol. Quantification of total RNA was performed by spectrophotometer at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before Reverse Transcription (RT) and quantitative PCR (Q-PCR) analyses. For RT, 1 µg of total RNA was

Table VII.1 Dry weight, S amount, S-sulphate, S-proteic and S-glutathione amounts of mature *Brassica napus* seeds obtained from Capitol plants grown under well S supplied (Control) and S-restricted conditions (LS seeds; experiment 1).

	Seed lot			
	Control	LS70	LS53	LS32
Seed dry weight ($mg.seed^{-1}$)	4.60 ± 0.11	4.55 ± 0.08	4.54 ± 0.08	3.56 ± 0.07*
S amount ($\mu g.seed^{-1}$)	18.26 ± 0.50	13.50 ± 0.52*	9.11 ± 0.39*	4.10 ± 0.40*
S-sulphate amount ($\mu g.seed^{-1}$)	2.88 ± 0.08	1.92 ± 0.17*	0.64 ± 0.12*	0.18 ± 0.03*
S-sulphite amount ($ng.seed^{-1}$)	10.09 ± 1.01	7.98 ± 0.79	5.03 ± 0.75*	2.74 ± 0.09*
S-cysteine amount ($ng.seed^{-1}$)	1.38 ± 0.1	1.43 ± 0.29	2.1 ± 0.05*	1.99 ± 0.15*
S-γ-EC ($ng.seed^{-1}$)	19.07 ± 1.37	13.29 ± 0.98*	6.24 ± 2*	0.17 ± 0.1*
S-proteic amount ($\mu g.seed^{-1}$)	10.10 ± 0.55	8.01 ± 0.53*	5.16 ± 0.53*	3.91 ± 0.36*
S-glutathione amount ($ng.seed^{-1}$)	388.5 ± 32	338.9 ± 34.9	253.7 ± 51.5*	106.3 ± 10.1*

Values correspond to means ± SE (*n* = 4). Capitol seeds were obtained from plants grown under 508.7 µM SO_4^{2-} during the whole life cycle (Control) or from plants subjected to an S restriction from bolting stage (LS32), early flowering (LS53) and start of pod filling (LS70). * Significant difference from Control value ($p < 0.05$).

converted to cDNA with an 'iScript cDNA synthesis kit' according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France).

Q-PCR amplifications were performed using primers of *BnSultr1;1* (Accession no: AJ41640) and *BnSultr1;2* (Accession no: AJ311388), encoding transporters involved in sulphate uptake by roots. 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'. *EF 1α* (Accession no: DQ312264) and *18S RNA* (Accession no: X16077) were used as an internal control genes and were amplified using *EF1α* forward primer: 5'-GCCTGGTATGGTTGTGACCT-3' and reverse primer 5'- GAAGTTAGCAGCACCCTTGG-3', and *18S* forward primer: 5'- CGGATAACCGTAGTAATTCTAG -3' and reverse primer 5'-GTACTCATTCCAATTACCAGAC-3'. Q-PCR reactions were performed with 4 µL of 200x diluted cDNA, 500 nM of primers, and 1x SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad) in a ChromoFour System (Bio-Rad). The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the presence of the single peak in the melting curves after Q-PCR reactions. For each sample, the subsequent Q-PCR reactions were performed in duplicate and the relative expression of the *BnSultr* transporters in each sample was compared to the control sample (corresponding to S400% seeds) and was determined with the ΔΔCt method using the following equation:

$$Relative\ expression = 2^{-(\Delta Ct\ sample\ -\ \Delta Ct\ control)}$$

with $\Delta Ct = Ct_{\text{BnSultr}} - Ct_{\text{reference genes}}$

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 *BnSultr* genes in the S400% seedlings samples was equal to one, by definition (Livak & Schmittgen, 2001).

B – 6 Statistics

The variability of the results is expressed by the average values for all biological replicates (n = 3 or 4) ± standard error (SE). The data were compared between treatments with the Mann-Whitney's test, used for unpaired data, with a statistical significance postulated at $p < 0.05$. The data were also compared between dates with the Wilcoxon test, used therefore for paired data, with a statistical significance postulated at $p < 0.05$. These

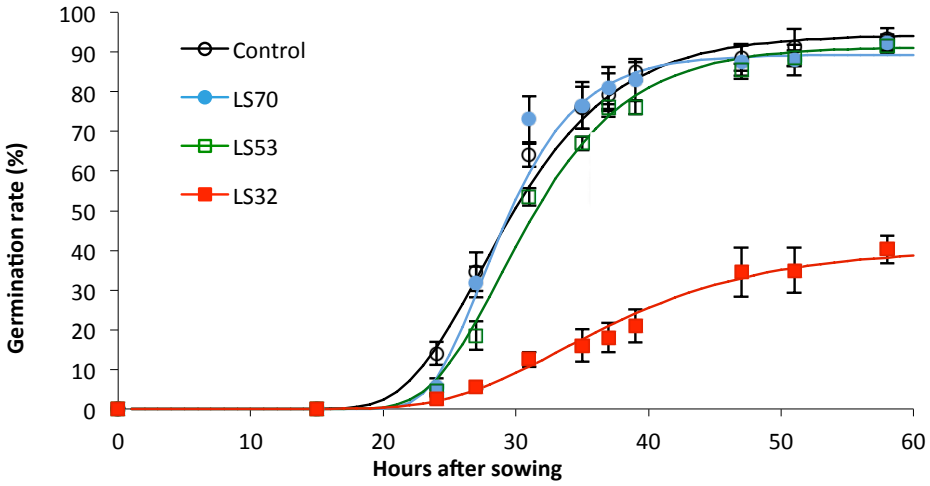


Figure VII.1 Evolution of cumulative germination of *Brassica napus* seeds obtained from Capitol plants grown under well S supplied (Control) and S-restricted conditions (LS seeds; experiment 1).

Values shown by symbols correspond to means ± SE (n = 4). Capitol seeds were obtained from plants grown under 508.7 µM SO_4^{2-} during the whole life cycle (Control) or from plants subjected to an S restriction from bolting stage (LS32), early flowering (LS53) and start of pod filling (LS70). The curves are calculated from the non linear Gompertz regression model (Brown & Mayer, 1988). Germination indexes determined from these observations are given in table VII.2.

Table VII.2 Germination indexes and normal seedlings rate of *Brassica napus* seeds obtained from Capitol plants grown under well S supplied (Control) and S-restricted conditions (LS seeds; experiment 1).

	Seed lot			
	Control	LS70	LS53	LS32
Final germination rate (%)[a]	93.3 ± 2.8	92.3 ± 2.3	91.5 ± 2.1	40.3 ± 3.5*
T50 (hours)[b]	29.9 ± 1.1	29.6 ± 1.0	31.5 ± 1.1	/
T'50 (hours)[b]	29.4 ± 1.0	28.9 ± 0.9	30.8 ± 1.0	36.5 ± 1.2 *
Speed of germination ($hour^{-1}$)[c]	2.98 ± 0.07	2.91 ± 0.14	2.72 ± 0.05	0.98 ± 0.16*
CRG[d]	2.37 ± 0.01	2.37 ± 0.02	2.32 ± 0.01	2.22 ± 0.02*
Normal seedlings rate (%)[e]	98.3 ± 1.3	98.5 ± 1.0	99.0 ± 0.6	15.3 ± 1.6 *°

Values correspond to means ± SE (n = 4, except for normal seedling rate measurement where n = 6 for Control seeds). Capitol seeds were obtained from plants grown under 508.7 µM SO_4^{2-} during the whole life cycle (Control) or from plants subjected to an S restriction from bolting stage (LS32), early flowering (LS53) and start of pod filling (LS70). * Significant difference from Control value ($p<0.05$). ° Significant difference between final germination rate and viability rate ($p < 0.05$). [a] determined at 58 h; [b] calculated from the Gompertz equation (Brown & Mayer, 1988) [c] as calculated by Bradbeer (1988); [d] Coefficient of the rate of germination (CRG) as calculated by Bewley & Black (1994); [e] determined at 7 d after sowing.

statistical tests were performed with Microsoft® Excel 2011/XLSTAT©-Pro (Version 2013.3.01, Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA).

C Results

C – 1 Impacts of S limitation applied at different growth stages on S status of seeds and consequences for germination and seedlings establishment (Experiment 1, cv. Capitol)

The analysis of initial status of seeds reveals that the amounts of total S range from high values in Control seeds, to low values for LS32 seeds (Table VII.1). Sulphur, S-sulphate, γ-EC and S-proteic amounts were significantly and gradually reduced in Capitol mature seeds in response to the LS70, LS53 and LS32 treatments. As observed for the sulphite, the glutathione amount was significantly reduced in LS53 seeds (-35%) and LS32 seeds (-72%) compared to Control seeds. Although it remained at an extremely low level, the cysteine amounts, which were about 1.4 ng S equivalent per seed in Control and LS70 seeds, were significantly higher in LS53 and LS32 seeds with about 2 ng S equivalent per seed. The dry weight of mature seeds was only reduced in response to the LS32 treatment (Table VII.1).

The germination of Control seeds began around 20 h after sowing and reached its maximum around 50 h after sowing (Figure VII.1). Germination was not affected for LS70 and LS53 seeds. However, LS32 seeds showed a reduced final germination rate (40.3%) compared to the Control (93.3%). Therefore, the time to reach 50% of germination rate (T50) could not be calculated for this seed lot, but interestingly, the time to reach 50% of the final germination rate (T'50) was higher in LS32 seeds compared to the Control (Table VII.2). LS32 seeds also showed lower speed of germination and coefficient of the rate of germination (CRG) than Control seeds. The normal seedling rate was not significantly different from the final germination rate for Control, LS70 and LS53 seeds, but was significantly reduced for LS32 seeds, that only showed 15.3% normal seedlings (Table VII.2).

C – 2 Biochemical changes associated to the germination of seeds obtained from plants subjected to S limitation applied at different growth stages (Experiment 1, cv. Capitol)

The water content of Control, LS70 and LS53 seeds increased from about 6 to 40% between 0 and 15 h and from 40 up to 57% between 30 and 50 h after sowing, showing the two phases of water uptake of normal seed germination (Figure VII.2a). The water content of LS32 seeds, which was already higher than in Control mature seeds (with 7.5% ± 0.1

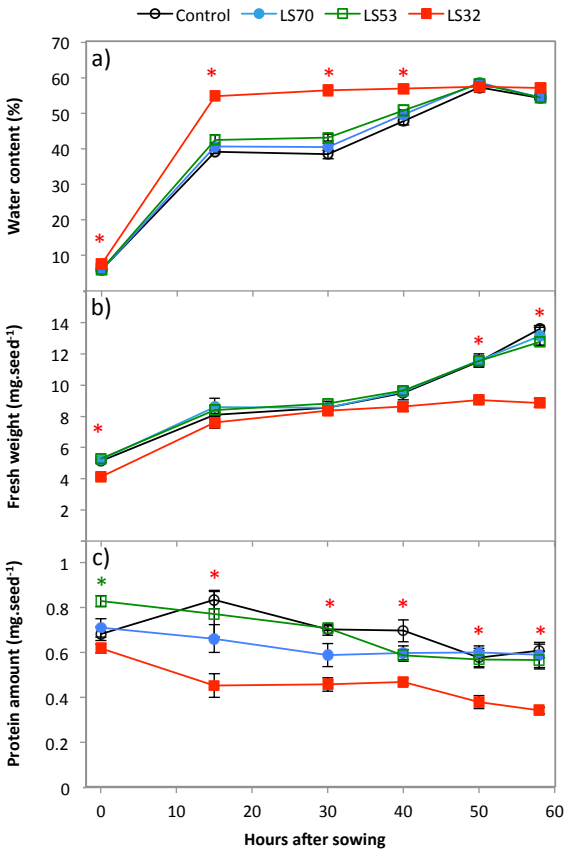


Figure VII.2 Evolution of water content (a), fresh weight (b) and protein amount (c) during germination of *Brassica napus* seeds obtained from Capitol plants grown under well S supplied (Control) and S-restricted conditions (LS seeds; experiment 1).

Values correspond to means ± SE (n = 3). Capitol seeds were obtained from plants grown under 508.7 µM SO_4^{2-} during the whole life cycle (Control) or from plants subjected to an S restriction from bolting stage (LS32), early flowering (LS53) and start of pod filling (LS70). * Significant difference from Control value, indicated in blue for LS70 seeds, in green for LS53 seeds and in red for LS32 seeds ($p < 0.05$).

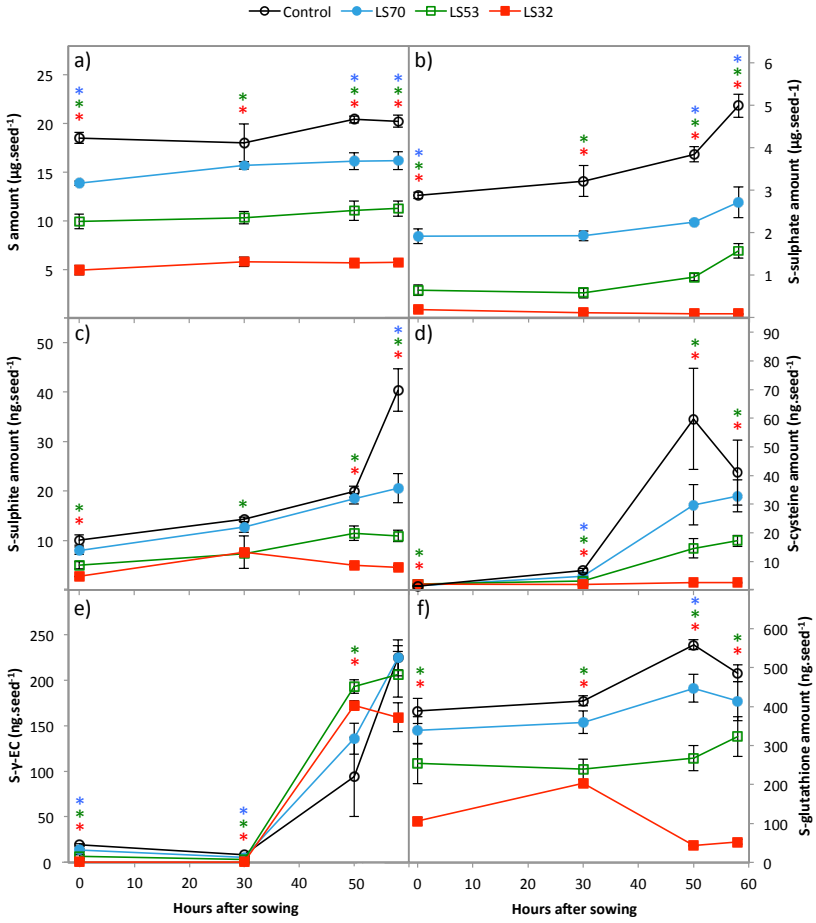


Figure VII.3 Evolution of S (a) , sulphate (b) and thiols (sulphite (c), cysteine (d), γ-EC (e) and and glutathione (f)) during germination of *Brassica napus* seeds obtained from Capitol plants grown under well S supplied (Control) and S-restricted conditions (LS seeds; experiment 1).

Values correspond to means ± SE (n = 4). Capitol seeds were obtained from plants grown under 508.7 µM SO_4^{2-} during the whole life cycle (Control) or from plants subjected to an S restriction from bolting stage (LS32), early flowering (LS53) and start of pod filling (LS70). * Significant difference from Control value, indicated in blue for LS70 seeds, in green for LS53 seeds and in red for LS32 seeds ($p < 0.05$). γ-EC, γ-glutamylcysteine.

versus 6.0% ± 0.1 for Control seeds), increased up to 55% until 15 h after sowing and then remained stable (Figure VII.2a). In accordance with the evolution of water content, the seed fresh weight increased between 0 and 15 h after sowing for all the seed lots and between 30 and 58 h after sowing for Control, LS70 and LS53 seeds (Figure VII.2b). With the method described in this study, the protein amount of LS70 and LS32 seeds was similar to the Control, and was significantly higher in LS53 seeds. From 15 to 58 h after sowing, the protein amount decreased for all seed lots, and was significantly lower in LS32 seeds than in Control seeds (Figure VII.2c).

The amounts of S remained stable between 0 and 58 h after sowing for all the seed lots (Figure VII.3a). The sulphate amounts increased from 30 to 58 h after sowing in Control, LS70 and LS53 seeds but not in LS32 seeds (Figure VII.3b). The sulphite amounts increased in Control, LS70 and LS53 seeds from 0 to 50 h after sowing, but remained stable in LS32 seeds. Between 50 and 58 h after sowing, the sulphite amount also increased by 2 fold in Control seeds only (Figure VII.3c). The cysteine amounts increased between 30 and 50 h after sowing in Control, LS70 and LS53 seeds, and then remained stable until 58 h after sowing. At 50 and 58 h after sowing, the cysteine amount was gradually lower in LS53 and LS32 seeds compared to Control seeds (Figure VII.3d). The γ-EC amounts, that was significantly reduced in LS mature seeds and at 30 h after sowing compared to Control seeds, increased from 30 h after sowing in all the seed lots, and was significantly higher in LS53 and LS32 seeds than in Control seeds at 50 h after sowing (Figure VII.3e). The glutathione amount increased in Control seeds between 30 and 50 h after sowing, and then decreased until 58 h after sowing. In LS70 seeds, glutathione tended to accumulate similarly as in Control seeds, but the differences between dates were not significant. Interestingly, the glutathione amount increased between 0 and 30 h after sowing, and then decreased strongly and significantly until 50 h after sowing in LS32 seeds (Figure VII.3f).

C – 3 Impacts of suboptimal levels of sulphate applied from the beginning of the plant growth cycle on S status of seeds and consequences on germination and seedlings establishment (Experiment 2, cv. Yudal)

The S400%, S70%, S20% and S5% seeds correspond to seeds harvested from plants supplied with respectively 400%, 70%, 20% and 5% of the optimal level of sulphate requirements. Compared to S400% seeds, the S70% seeds had similar S, S-sulphate and S-glutathione amounts but a higher S-proteic amount (Table VII.3). The S20% seeds showed

Table VII.3 Dry weight, S amount, S-sulphate, S-proteic and S-glutathione amounts of mature *Brassica napus* seeds obtained from Yudal plants well S supplied and grown under S-limited conditions (experiment 2).

	Seed lot			
	S400%	S70%	S20%	S5%
Seed dry weight ($mg.seed^{-1}$)	3.82 ± 0.63	3.53 ± 0.49	3.76 ± 0.55	1.13 ± 0.16*
S amount ($\mu g.seed^{-1}$)	58.95 ± 5.43	52.18 ± 3.06	18.2 ± 2.53*	10.56 ± 2.25*
S-sulphate amount ($\mu g.seed^{-1}$)	11.31 ± 1.76	9.19 ± 2.6	2.5 ± 0.41*	0.91 ± 0.28*
S-proteic amount ($\mu g.seed^{-1}$)	7.21 ± 0.55	9.42 ± 0.49*	6.26 ± 0.39	6.6 ± 0.64
S-glutathione amount ($ng.seed^{-1}$)	284.1 ± 28.2	231.5 ± 51.8	333.8 ± 46.6	161.9 ± 9.6*

Values correspond to means ± SE (n = 3). Yudal seeds were obtained from plants subjected to plethoric S nutrition (400% of plant S needs provided, S400% seeds) or subjected to a S limitation from the beginning of plant growth with 70%, 20% and 5% of plant S needs provided (S70%, S20% and S5% seeds respectively). * Significant difference from the S400% seeds ($p < 0.05$).

lower S and S-sulphate amounts than S400% seeds. Similarly, S5% seeds showed reduced S and S-sulphate amounts, and a reduced S-glutathione amount compared to S400% seeds. As observed for Capitol seeds in response to the LS32 treatment, the most S-limiting treatment (S5%) led to a reduction of the mature seed DW (Table VII.3).

As for Control seeds from Capitol, the germination of S400% seeds of Yudal began around 20 h after sowing and reached its maximum around 50 h after sowing (Figure VII.4). Compared to S400% seeds, germination was not affected for S70% and S20% seeds. However, S5% seeds showed lower final germination rate (-24.7%) and speed of germination (-32.6%) than S400% seeds (Table VII.4). While the T'50 of S70%, S20% and S5% seeds was not significantly different from S400% seeds, the T50 calculated for S5% seeds was significantly higher (Table VII.4).

C – 4 Development and S management of cv. Yudal seedlings

The normal seedlings rate was significantly reduced for S70%, S20% and S5% seeds compared to S400% seeds (Table VII.4). Fourteen days after sowing on perlite (d14), the seedlings from S400%, S70% and S20% seeds weighted about 5 mg dry weight, with a shoot/root ratio around 4. Interestingly, the S5% seedlings had a significantly higher DW, associated both to shoots and roots (Figure VII.5a). The shoot/root ratio was not significantly different between S400% and S5% seedlings. The S amounts in seedlings produced from all the seed lots (Figure VII.S1a) were not different to the S amounts measured in mature seeds (Table VII.3), showing that no S was absorbed during the 14 d of seedling establishment. In order to minimize the differences linked to variations in biomass between S400%, S70%, S20% and S5% seedlings, but also between d14 and d15, the results were expressed as contents. However, the expression of results in terms of quantity (see Figures VII.S1 and VII.S2) reflects the same observations and does not change the interpretations. The S contents were similar between shoots and roots for S400% and S70% seedlings. These contents were significantly lower in S20% and S5% seedlings, and particularly for shoots (Figure VII.5b and c). At d14, the S was principally allocated to the shoots, with 83% of the total S in S400% seedlings, but this preferential allocation to the aerial parts tended to be reduced in S70%, S20% and S5% seedlings (with up to 32% of the total S in roots for S5% seedlings; Figure VII.S1b).

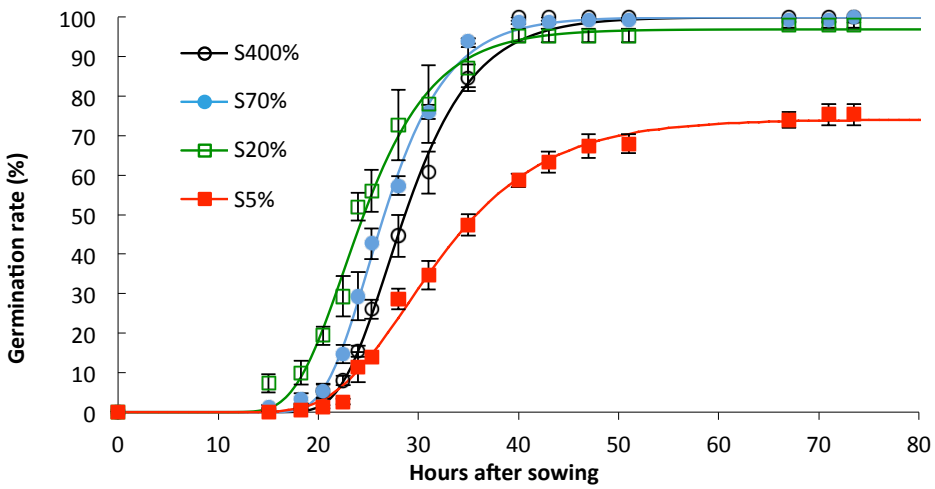


Figure VII.4 Evolution of cumulative germination of *Brassica napus* seeds obtained from Yudal plants well S supplied and grown under S-limited conditions (experiment 2).

Values shown by symbols correspond to means ± SE (*n* = 3). Yudal seeds were obtained from plants subjected to plethoric S nutrition (400% of plant S needs provided, S400% seeds) or subjected to a S limitation from the beginning of plant growth with 70%, 20% and 5% of plant S needs provided (S70%, S20% and S5% seeds respectively). The curves are calculated from the non linear Gompertz regression model (Brown & Mayer, 1988). Germination indexes determined from these observations are given in table VII.4.

Table VII.4 Germination indexes and normal seedling rate of *Brassica napus* seeds obtained from Yudal plants well S supplied and grown under S-limited conditions (experiment 2).

	Seed lot			
	S400%	S70%	S20%	S5%
Final germination rate (%)[a]	100 ± 0.0	100 ± 0.0	98 ± 1.2	75.3 ± 4.7*
T50 (hours)[b]	28.7 ± 1.0	26.6 ± 0.9	24.6 ± 1.1	35.8 ± 1.2*
T'50 (hours)[b]	28.7 ± 1.0	26.6 ± 0.9	24.3 ± 1.2	31.6 ± 1.1
Speed of germination ($hour^{-1}$)[c]	3.37 ± 0.1	3.62 ± 0.11	3.91 ± 0.26	2.27 ± 0.13*
CRG[d]	2.03 ± 0.03	2.1 ± 0.03	2.19 ± 0.05	1.96 ± 0.01
Normal seedling rate (%)[e]	86.7 ± 1.8°	74.7 ± 2.3*°	66 ± 8.1*°	69 ± 2.8*

Values correspond to means ± SE (*n* = 3). Yudal seeds were obtained from plants subjected to plethoric S nutrition (400% of plant S needs provided, S400% seeds) or subjected to a S limitation from the beginning of plant growth with 70%, 20% and 5% of plant S needs provided (S70%, S20% and S5% seeds respectively). * Significant difference from the value obtained for the S400% seeds ($p<0.05$). ° Significant difference between final germination rate and viability rate ($p < 0.05$). [a] determined at 71 h; [b] calculated from the Gompertz equation (Brown & Mayer, 1988); [c] as calculated by Bradbeer (1988); [d] Coefficient of the rate of germination (CRG) as calculated by Bewley & Black (1994) [e] determined at 14 d after sowing.

The feeding of d14 seedlings from S400%, S70%, S20% and S5% seeds for 24 h with the nutrient solution containing ^{34}S-sulphate (5 atom% excess; d15 +$^{34}SO_4^{2-}$) or containing no S (d15 -S) did not change significantly the roots and shoots dry weights (Figure VII.5a). The shoots and roots S contents were not significantly affected by the -S treatment for all the seedlings lots (Figure VII.5b and c). The supply with sulphate for 24 h (+$^{34}SO_4^{2-}$) increased the S content in roots and shoots of S5% seedlings, but did not change the roots and shoots S contents for S400%, S70% and S20% seedlings (Figure VII.5b and c). As expected, no significant difference in ^{34}S contents in roots and shoots was observed between d14 and d15 in response to the -S treatment, and the +$^{34}SO_4^{2-}$ treatment increased markedly the ^{34}S content in both shoots and roots of all the seedlings lots (Figure VII.6a and b). In terms of quantity, the ^{34}S absorbed between d14 and d15 was principally allocated to shoots (Figure VII.S2). Interestingly, the difference in ^{34}S content between d15 +$^{34}SO_4^{2-}$ and d14 was higher in shoots of S5% seedlings than in S400% seedlings (Figure VII.6b).

As compared to S400% seedlings at d14, no significant difference was observed for *BnSultr1;2* expression in roots of S70%, S20% and S5% seedlings (Figure VII.7). *BnSultr1;1* gene expression was higher in roots of S20% and S5% seedlings (Figure VII.7).

D Discussion

D – 1 S-limitation impacts on germination *sensu stricto* and on post-germinative events

Under our experimental conditions, it appeared that the cumulative germination kinetics (Figures VII.1 and VII.4) and the germination indexes (Tables VII.2 and VII.4) are not significantly different between seeds harvested from the winter genotype (Capitol) and the spring one (Yudal) well supplied with sulphate (i.e. Control seeds of Capitol and S400% seeds of Yudal). The seeds produced by plants grown under severe S-limited conditions (i.e. LS32 seeds for Capitol and S5% seeds for Yudal) are characterised by a low viable seedlings rate that is related to a reduction in germination vigour (Figures VII.1 and VII.4). The different germination indexes used in this study highlighted that both speed of germination and germination capacity are reduced for the two genotypes studied (Tables VII.2 and VII.4). The low viable seedlings rate for LS32 seeds (Capitol) and for the S70% and S20% seeds (Yudal) are also associated with impacts on post-germinative events, since the normal seedling rates were significantly lower than final germination rates.

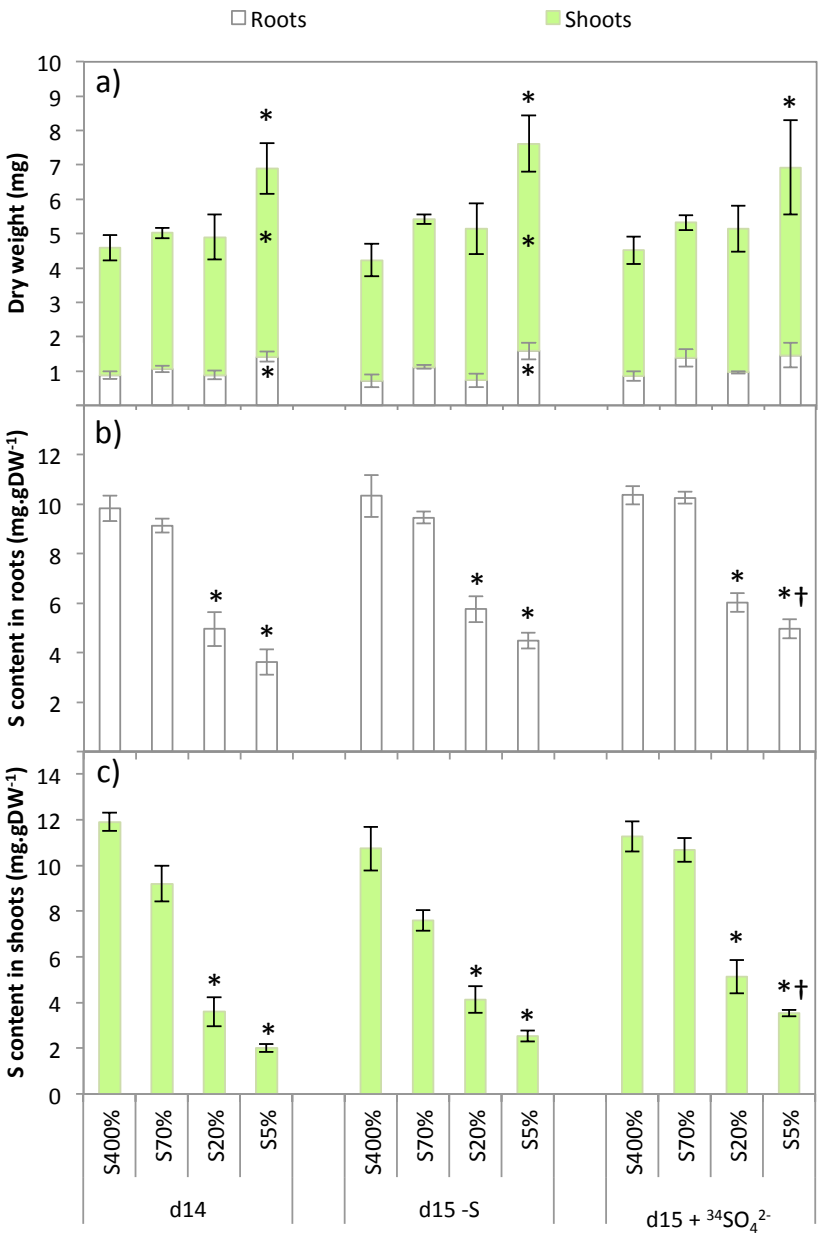


Figure VII.5 Biomasses (a) and S content (b and c) of *Brassica napus* cv. Yudal shoots and roots, 14 d after sowing on water (d14) and after 24 h treatment of d14 seedlings with 508.7 µM $^{34}SO_4^{2-}$ at 5 atom% excess (d15 +$^{34}SO_4^{2-}$) and with 8.7 µM SO_4^{2-} (d15 -S).

Total S contents in shoots and roots were determined by IRMS analyses. Yudal seedlings were grown from seeds harvested on plants subjected to plethoric S nutrition (400% of plant S needs provided, S400% seeds) or subjected to a S limitation from the beginning of plant growth with 70%, 20% and 5% of plant S needs provided (S70%, S20% and S5% seeds respectively). Values correspond to means ± SE (n = 3). * Significant difference from the value of S400% seedlings ($p < 0.05$). † Significant difference from the value at d14 ($p < 0.05$).

The maintenance of water content in LS32 seeds between 15 and 58 h after sowing (Figure VII.2a) might suggest that the inhibition of germination does not occur upon imbibition, but either during the step of recovery of metabolic activity and initiation of growth (Bewley & Black, 1994), either on radicle emergence through the seed coat. Previous works emphasized the inhibitory role of ABA on testa rupture during *Brassica napus* seed germination (Schopfer & Plachy, 1984; 1985). In *Arabidopsis thaliana*, ABA is not involved in testa rupture but in the endosperm weakening (Kucera *et al.*, 2005). In addition, recent works showed that ethylene interacts with ABA upon *A. thaliana* germination, counteracting its inhibitory effect on endosperm rupture (Linkies *et al.*, 2009). Ethylene synthesized from the S amino acid methionine through three subsequent enzymatic steps catalysed by *S*-adenosyl methionine (SAM) synthetase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylicacid (ACC) synthase, and ACC oxydase (Kende, 1989). However, since *Arabidopsis* mutants impeded in ethylene biosynthesis still exhibit radicle protrusion (Guzmán & Ecker, 1990), endogenous ethylene does not seem to play an essential role in this process. Gallardo *et al.* (2002b) showed that methionine synthase and AdoMet synthetase are fundamental components involved in the control of seedling establishment in *Arabidopsis thaliana*, but their work suggest that ethylene is principally involved in the post-germinative events (i.e. seedling establishment by the germinate seedlings) than in radicle protrusion. Although no role of ethylene has been shown on *Brassica napus* seed germination and seedling establishment, it could be assumed that ethylene production is reduced in LS32 seeds compared to Control seeds due to a lower availability in methionine and SAM, explaining their lower germination capacity and the low normal seedlings rate. This could also explain the reduction of normal seedlings rate of the other seeds harvested from S-limited plants. The addition of methionine, SAM or ACC, precursors of ethylene, or of ethylene to the solution provided to LS32 seeds could possibly increase the germination rate and the normal seedlings rate, showing that the reduction in germination capacity and normal seedling establishment of these seeds are related to the impact of S limitation on ethylene synthesis.

Notwithstanding, the higher increase in water content of LS32 seeds upon germination compared to the Control seeds suggests that the 60% seeds unable to germinate in these conditions absorb large amounts of water (Figure VII.2a). Although a tetrazolium test could support this hypothesis, this observation suggests that ungerminated LS32 seeds can be considered as unviable.

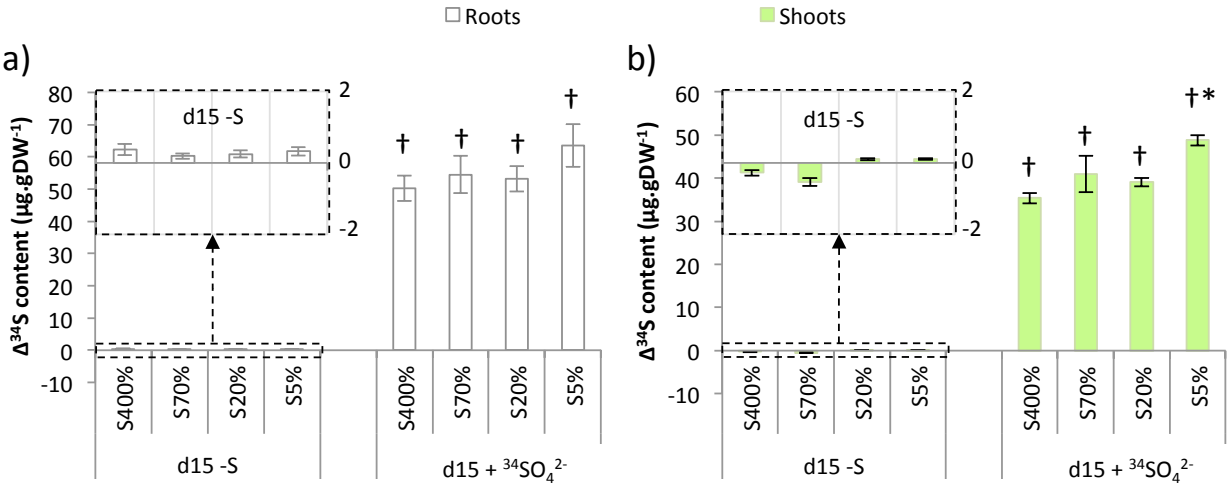


Figure VII.6 Differences in ^{34}S ($\Delta^{34}S$) content in excess in roots (a) and shoots (b) of oilseed rape seedlings (cv. Yudal) between d14 and d15 -S and between d14 and d15 $+^{34}SO_4^{2-}$.

Values correspond to means ± SE (*n* = 3). Yudal seedlings were grown from seeds harvested on plants subjected to plethoric S nutrition (400% of plant S needs provided, S400% seeds) or subjected to a S limitation from the beginning of plant growth with 70%, 20% and 5% of plant S needs provided (S70%, S20% and S5% seeds respectively). † Significant difference from the d15 -S value ($p < 0.05$). * Significant difference from the value of S400% seedlings ($p < 0.05$).

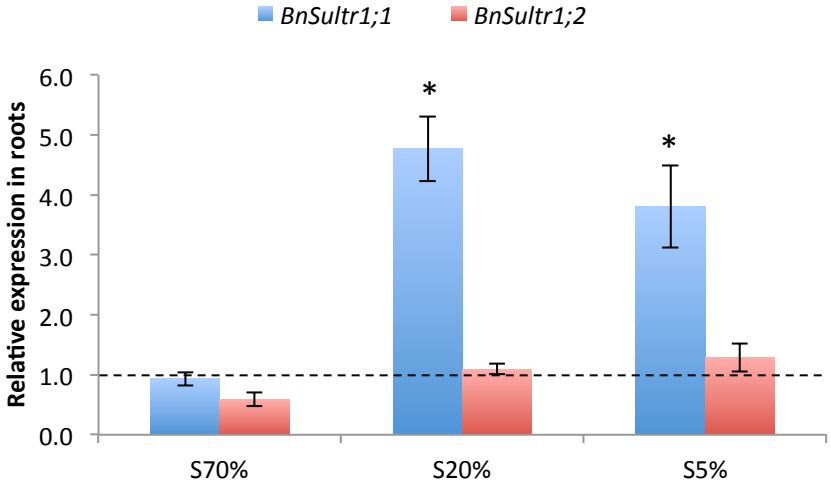


Figure VII.7 Relative expression of *BnSultr1;1* and *BnSultr1;2* in roots of S400%, S70% and S5% oilseed rape seedlings (cv. Yudal) 14 days after sowing on water (d14).

The expression level of *BnSultr1;1*, *BnSultr1;2*, *BnSultr4;1*, and *BnSultr4;2* are relative to the result obtained in S400% seedlings at d14, shown by the dotted line. Yudal seedlings were grown from seeds harvested on plants subjected to plethoric S nutrition (400% of plant S needs provided, S400% seeds) or subjected to a S limitation from the beginning of plant growth with 70%, 20% and 5% of plant S needs provided (S70%, S20% and S5% seeds respectively). Values correspond to means ± SE (*n* = 3) ($p < 0.05$). * Significant difference from the value of S400% seelings ($p < 0.05$).

D – 2 Sulphur metabolism is early active in germinated seeds (cv. Capitol)

For Control or LS seeds (Capitol), it appeared that total S amounts remains stable all along the germination kinetics (Figure VII.3a). Nevertheless, an accumulation of sulphate and thiols was observed between 30 and 50h, particularly in Control, LS70 and LS53 seeds, showing that S metabolism activates early after germination completion (i.e. radicle emergence), and suggesting the mobilization of S stored in an organic form (Figure VII.3b to f). Glucosinolates can be excluded from the potential candidates since they represent only a very small part of the S-compounds present in mature seeds of double-low oilseed rape genotypes (Zhao *et al.*, 1993c; 1994) as cv. Capitol (Dubousset *et al.*, 2010). The most probable source of the accumulation of these compounds could be the proteins, whose amount tends to decrease during germination, and particularly the seed storage proteins that represent the major part of seed proteins at mature stage and which are used during seedling growth as sources of N, C and S (Figure VII.8). The accumulation of sulphate and thiols in LS seeds could indeed be explained by a lower amount of S provided to the metabolism by protein degradation, since the amount of S-proteic is gradually reduced in LS70, LS53 and LS32 seeds compared to Control seeds (Table VII.1). In addition to provide information on the mobilization of storage proteins upon germination, a comparative analysis of seed proteome could reveal other metabolic changes on the germination of the seeds produced under S-limited conditions.

Interestingly, the accumulation of γ-EC, higher in LS53 and LS32 seeds than in Control seeds between 30 and 50 hours after sowing, was concomitant with the accumulation of glutathione in Control seeds, and with a strong decrease in glutathione amount in LS32 seeds (Figure VII.3e and f). This shows that glutathione homeostasis is impaired in LS32 seeds, and suggests changes in the activity of the enzymes involved in glutathione synthesis and degradation.

D – 3 Seedling sulphate uptake capacity is impacted by S limitation applied to the mother plant.

The roots and shoots dry weights observed at d14 for the S5% seedlings were higher than for the S400% seedlings (Figure VII.5a). These unexpected data highlight that seedling establishment could be strongly stimulated in seeds produced from plants severely limited in sulphate. In addition to its role on germination, ethylene is known to inhibit *Arabidopsis*

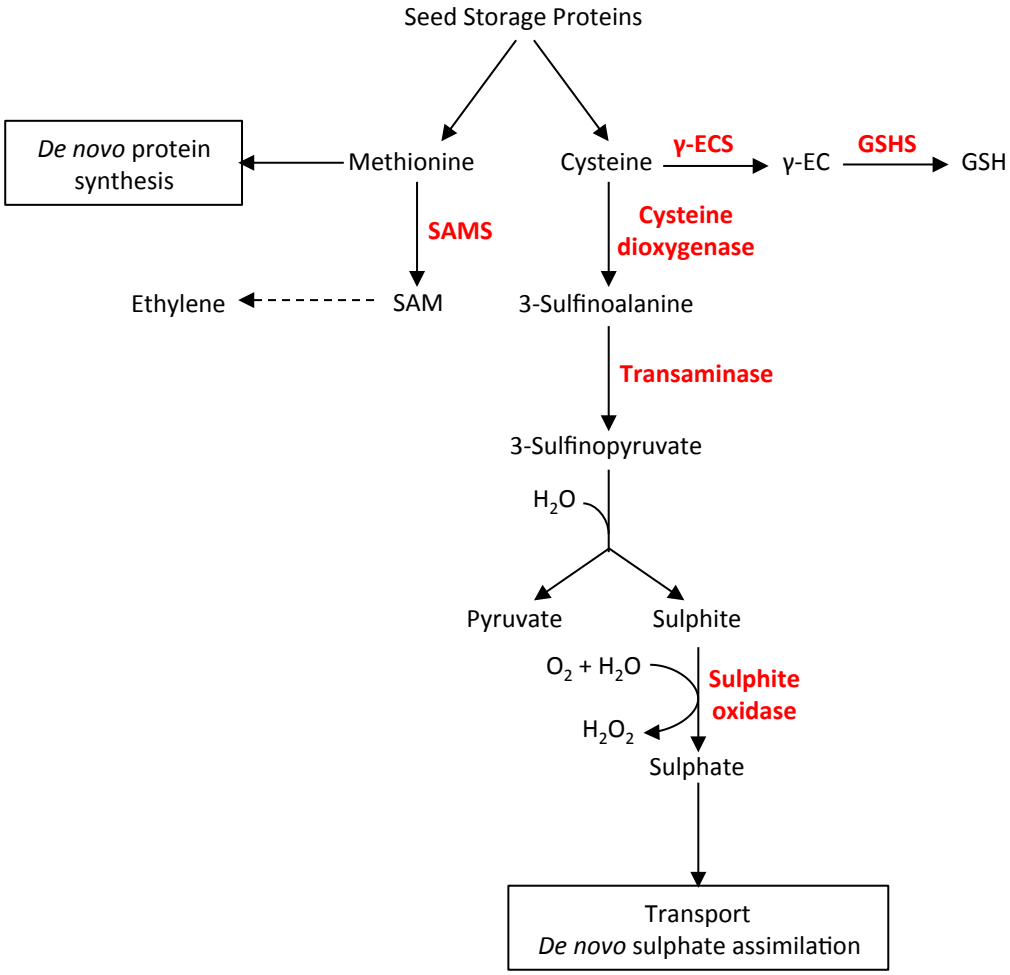


Figure VII.8 Putative metabolic pathway for the provision of S-compounds to germinating seeds.

The enzymes are shown in red. The cysteine provided through protein degradation may be used for glutathione synthesis or provide sulphate to the metabolism that can be transported between plant organs or used for neo synthesis of S-compounds. The methionine may be used for neo protein or ethylene synthesis. Sulphite oxidase catalysed the formation of sulphate from sulphite, generating H_2O_2. An *O*-acetylserine(thiol)lyase homolog with L-cysteine desulfhydrase activity may also catalyse the formation of hydrogen sulphide and pyruvate from cysteine, as observed in Arabidopsis leaves (Álvarez *et al.,* 2010). GSH, reduced form of glutathione; GSHS, glutathione synthetase; γ-EC, γ-glutamylcysteine; γ-ECS, γ-EC synthetase; SAMS, *S*-adenosylmethionine synthetase.

thaliana root and shoot growth (Guzmán & Ecker, 1990; Achard *et al.*, 2003). This suggests that this unexpected result is related to a reduced ethylene synthesis in S5% seedlings compared to S400% seedlings due to a lower methionine (and SAM) availability, that could alleviate the inhibitory effect of ethylene on roots and shoots growth.

Interestingly, as indicated by the higher S and ^{34}S amounts and contents between d14 and d15 (Figure VII.5b and c, figure VII.6b and figures VII.S1 and VII.S2), the S5% seedlings also showed a significantly higher sulphate uptake compared to S400% seedlings. The higher sulphate uptake capacity of S5% seedlings could be related to an important sink strength exerted by their higher roots and shoots biomasses compared to S400% seedlings. In addition, *BnSultr1;1* gene expression in roots was higher for S5% seedlings (Figure VII.7), suggesting a role of this transporter in their increased sulphate uptake capacity. However, *BnSultr1;1* gene expression was also increased in roots of S20% seedlings (Figure VII.7), that showed no difference in ^{34}S content compared to S400% seedlings (Figure VII.6a and b). Although these findings might suggest a post-transcriptional regulation of this transporter, the involvement of BnSultr1 transporters in the higher sulphate uptake capacity of S5% seedlings is still unclear. In addition to increase the amount and content of ^{34}S more significantly in S5% seedlings than in S400% seedlings, the supply with 500 µM sulphate labelled with ^{34}S (5 atom% excess) appears to modify the allocation of S in S5% seedlings in favour to the shoot. Consistent with this observation, the shoots of *Brassica oleracea* functioned as the primary sink for sulphate taken up after sulphate re-supply to sulphate-deprived plants (Koralewska *et al.*, 2009). The involvement of other sulphate transporters in the high sulphate uptake and S translocation capacities deserve to be studied. The sulphate transporter BnSultr2;1, responsible for the translocation of sulphate between roots and shoots and up-regulated in roots under S-limiting conditions (Takahashi *et al.*, 2000), could be highly expressed in roots of S5% seedlings. This hypothesis could indeed explains both their higher sulphate uptake capacity compared to S400% seedlings and the translocation of the S taken up to the shoot.

This preliminary work highlights the impacts of severe sulphate limitations on the germinative and post-germinative behaviours and on S management of the seeds obtained. Investigate the role of ethylene in these processes and the involvement of sulphate transporters expression would be an interesting outlook to complement these observations.

Chapitre VIII

Discussion générale

Chapitre VIII : Discussion générale

De par ses rôles physiologiques fondamentaux et variés, le S est un élément indispensable à la vie. Les animaux étant incapables d'assimiler le S sous forme minérale, les végétaux constituent le point d'entrée majeur de S dans la chaine trophique (Takahashi *et al.*, 2011b). Le colza (*Brassica napus* L.), cultivé pour ses graines riches en huile et en protéines, est indéniablement une plante très exigeante en S, en comparaison d'autres plantes de grande culture comme le blé (Oenema & Postma, 2003). Depuis près de 3 décennies, les rejets atmosphériques soufrés ayant fortement baissés, ils ne suffisent plus à subvenir aux besoins en S du colza, forçant les agriculteurs à amender leurs cultures à l'aide de fertilisants soufrés. En cas d'oligotrophisation en S, le rendement ainsi que la qualité des graines de colza peuvent être réduits. Dans ce contexte, identifier les acteurs physiologiques et moléculaires impliqués dans la réponse du colza à la limitation en S est d'un grand intérêt, préalable à l'amélioration de la gestion de la fertilisation soufrée ou encore à la sélection de variétés adaptées à une faible disponibilité en S. Ainsi, l'objectif général de cette thèse consistait à étudier l'incidence d'une fertilisation variable en S sur i) la physiologie de jeunes feuilles, ii) la gestion du S par la plante et son incidence sur le métabolisme soufré de la graine de colza en développement, iii) la qualité grainière et iv) la vigueur germinative des graines produites. Les résultats décrits au travers des 4 précédents chapitres apportent des informations nouvelles, précieuses à la compréhension des mécanismes impliqués dans la réponse du colza à la limitation en S.

A La limitation en S affecte la physiologie des organes végétatifs

A – 1 Le métabolisme foliaire est affecté par la limitation en S

L'étude en cinétique des paramètres physiologiques réalisée sur les colzas au stade rosette a permis de déterminer une date correspondant à l'apparition de symptômes précoces de déficience en S (réduction de l'activité photosynthétique et accumulation d'anthocyanes au niveau des jeunes feuilles ; Chapitre IV). L'analyse protéomique de la jeune feuille touchée à cette date a permis d'associer les modulations de l'expression de certaines protéines aux perturbations physiologiques observées.

Ainsi, il apparaît que **la réduction de l'activité photosynthétique observée après 35 jours de restriction en sulfate au stade rosette n'est pas liée à une baisse des teneurs en chlorophylles,** maintenues à un niveau comparable aux plantes non limitées en S. Comme observées chez *Arabidopsis thaliana*, les perturbations du flux glycolytique et l'accumulation des intermédiaires carbonés pourraient intervenir rapidement dans une jeune feuille de colza en cas de limitation en S. Cela pourrait être à l'origine de la réduction de l'assimilation de CO_2, ainsi que de son accumulation au niveau intercellulaire.

Notre étude met également en évidence des répressions de la plastocyanine et de la ferrédoxine NADP réductase, qui pourraient limiter l'activité photosynthétique en provoquant une altération des phases finales du transfert d'électrons, et entrainer une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au niveau chloroplastidial. L'accumulation d'H_2O_2 ainsi que l'augmentation des teneurs en anthocyanes montre en effet que la restriction de l'apport de S entraine un stress oxydatif au niveau des jeunes feuilles de colza, comme précédemment observé chez le mûrier (Tewari *et al.*, 2010). Ainsi, le stress oxydatif généré semble résulter du défaut de couplage entre les réactions photochimiques et le cycle de Calvin. Dans le sens de cette hypothèse, l'induction de la Cu/Zn-SOD chloroplastidiale, permettant la détoxification de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) en H_2O_2, ainsi que des WSCPs, protéines permettant la protection de la chlorophylle contre le stress oxydatif (Desclos *et al.*, 2008), met en évidence la **mise en place de systèmes de protection contre ce stress oxydatif au niveau chloroplastidial**. Dans un contexte où le GSH peut être limitant, la réduction de l'expression de la glutathion S-transferase (GST) pourrait favoriser l'accumulation d'H_2O_2 et du radical hydroxyle $^{\cdot}OH$ par la réaction de Fenton. Malgré le stress oxydatif généré, le maintien des teneurs en chlorophylles, l'accumulation d'anthocyanes ainsi que l'augmentation de l'expression de la sous unité catalytique de l'ATP synthase chloroplastidiale suggèrent que **la capacité de la feuille à absorber les radiations photosynthétiquement actives et à produire de l'ATP demeure efficiente aussi longtemps que possible**.

L'absence de réduction significative de la croissance des parties aériennes au terme des 35 jours de restriction en sulfate est cohérente avec diverses études conduites chez *Brassica napus* (Dubousset *et al.*, 2009; Abdallah *et al.*, 2010). Dans ces études, après une période relativement longue d'alimentation soufrée pléthorique (de 51 et 42 jours respectivement

Tableau VIII.1 Impact de limitations de l'apport de sulfate sur la biomasse des parties aériennes chez le colza (*Brassica napus* L.) et le chou (*Brassica oleracea* L.) en fonction des conditions de préculture et de limitation.

Espèce	Référence	Temps avant transfert des plantules (jours après semis)	Période de préculture		Période de restriction		Réduction de la biomasse des parties aériennes (jours sous restriction)
			Durée (jours)	Concentration en sulfate (µM)	Durée (jours)	Concentration en sulfate (µM)	
Brassica napus	Blake-Kalff *et al.,* 1998	7	23	1000	13	20-100	NS
			0	N/A	40	20-100	25
	Parmar *et al.,* 2007	7	21	1000	13	0	13
	Dubousset *et al.,* 2009	5	51	300	28	15	NS
	Abdallah *et al.,* 2010	2	42	300	35	15	NS
	D'Hooghe *et al.,* 2013a (Chapitre IV)	5	55	500	35	8,7	NS
Brassica oleracea	Koralewska *et al.,* 2007, 2009	10	0	N/A	13	0	13
						25	NS
						100	NS

NS, pas de différence significative ; N/A, non applicable

pour ces deux études) des colzas du génotype Capitol ont subit une restriction en soufre pendant 28 et 35 jours, sans qu'aucune réduction significative de la croissance des parties aériennes ne soit constatée (Tableau VIII.1). De même, aucune réduction significative de la croissance des parties aériennes n'est observée chez *Brassica oleracea*, en réponse à une limitation importante de l'apport de S (25 µM SO_4^{2-}) de courte durée (allant jusqu'à 13 jours), appliquée sans période d'alimentation soufrée préalable (Tableau VIII.1 ; Koralewska *et al.*, 2007; 2009). Blake-Kalff *et al.* (1998) et Parmar *et al.* (2007) observent cependant une réduction de la croissance des parties aériennes du génotype Apex après 25 et 13 jours de restriction de l'apport de S (Tableau VIII.1). Cependant, les colzas cultivés dans ces deux études n'ont pas été alimentés durant une période comparable avant l'application de la restriction (*i.e.* de 0 et 21 jours respectivement pour ces deux études) aux colzas étudiés dans cette thèse ainsi que dans les travaux de Dubousset *et al.* (2009) et d'Abdallah *et al.* (2010 ; Tableau VIII.1). Ces observations démontrent que **les effets d'une limitation de l'apport de S sur la croissance du colza sont dépendants du niveau initial des réserves soufrées.** En réponse à la restriction de l'apport de S, la remobilisation active des réserves stockées sous forme de sulfate vacuolaire par l'augmentation de l'expression des transporteurs Sultr4;1 et Sultr4;2 (Kataoka *et al.*, 2004b; Dubousset *et al.*, 2009), permet d'approvisionner en S les tissus du colza en croissance durant une période relativement longue, qui serait fonction de l'état des réserves soufrées initiales. Dans nos conditions expérimentales, une prolongation de la restriction en sulfate au delà de 35 jours aurait ainsi pu affecter la croissance des parties aériennes, *via* la réduction de l'activité photosynthétique. Une prolongation de la restriction en sulfate aurait également pu entrainer la sénescence et la mort des cellules de jeunes feuilles par le stress oxydatif généré et/ou par des processus de mort cellulaire programmée que peuvent provoquer l'accumulation de jasmonate, supposée par l'induction de la 12-oxophytodienoate réductase révelée par l'analyse protéomique.

Aucune modulation de l'expression de protéines responsables de l'assimilation du sulfate (*i.e.* du métabolisme S primaire) n'a été mise en évidence au cours de cette étude. Cependant, l'expression de certaines protéines du métabolisme soufré secondaire est modulée dans la jeune feuille en réponse à la restriction en sulfate. Comme précédemment observé au niveau transcriptomique chez *Arabidopsis thaliana* (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2006), l'expression de la glutathion S-transférase (GST) est réduite. La réduction de

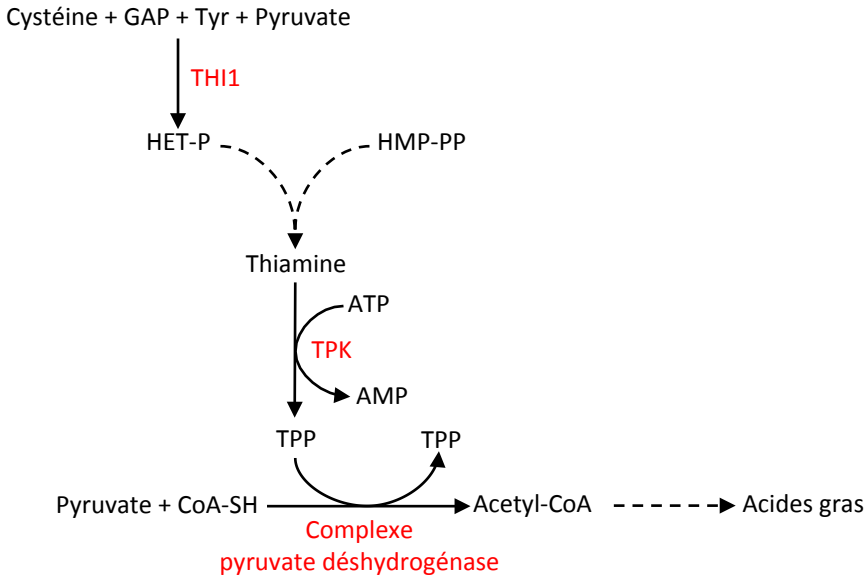


Figure VIII.1 Implication de l'enzyme THI1 dans la synthèse de thiamine pyrophosphate, coenzyme nécessaire à l'activité du complexe pyruvate déshydrogénase.

Les métabolites sont indiqués en noir et les enzymes en rouge. L'enzyme THI1 catalyse la formation du groupement thiazole à partir de cystéine, de glycéraldéhyde 3-phosphate, de tyrosine et de pyruvate. La thiamine, précurseur de thiamine pyrophosphate, est formée à partir du groupement thiazole synthétisé par THI1 et d'une pyrimidine modifiée. La thiamine pyrophosphate est également indispensable au bon fonctionnement de la pyruvate oxydase, de la pyruvate carboxylase, ou encore des transcétolases. Abréviations utilisées pour les métabolites : GAP, glycéraldéhyde 3-phosphate ; HET-P 4-methyl-5-β-hydroxyethylthiazole phosphate ; HMP-PP, 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine diphosphate ; TPP, thiamine pyrophosphate. Abréviations utilisées pour les enzymes : THI1, enzyme de biosynthèse du thiazole ; TPK, thiamine pyrophosphokinase.

l'expression de THI1 pourrait permettre d'allouer préférentiellement la cystéine à la synthèse de protéines ou encore de glutathion. En effet, cette enzyme catalyse la synthèse de thiazole, précurseur de la thiamine, à partir de cystéine, de tyrosine, de glycéraldéhyde 3-phosphate et de pyruvate (Figure VIII.1 ; Julliard & Douce, 1991). Par ailleurs, la réduction de l'expression de THI1 pourrait avoir une incidence négative sur le métabolisme central de la jeune feuille, la thiamine pyrophosphate étant un coenzyme indispensable au bon fonctionnement de certaines enzymes clés du métabolisme carboné, comme la pyruvate oxydase, la pyruvate carboxylase, le complexe pyruvate déshydrogénase, ou encore les transcétolases (Lindqvist & Schneider, 1993). La réduction de l'expression de THI1 pourrait également conduire à des phénomènes de chlorose si la restriction en sulfate avait été prolongée au-delà de 35 jours. En effet, chez *Arabidopsis thaliana*, les mutants *thi1* présentent des teneurs en chlorophylles significativement réduites, conduisant à un photoblanchiment (Redei, 1965).

A – 2 La gestion du S présente une variabilité génotypique en réponse à une limitation en S

Les travaux réalisés sur les génotypes Aviso et Capitol (Chapitre VIB) confirment le rôle majeur de la remobilisation des réserves soufrées foliaires dans la fourniture de S aux graines en développement en cas de restriction de l'apport de S, mis en évidence dans de précédents travaux (Dubousset *et al.*, 2010). Selon les observations réalisées sur ces 2 génotypes, les tiges constituent également des organes sources majeurs pour la fourniture de S au cours du remplissage des graines de colza.

En condition d'alimentation soufrée non limitante, les génotypes Aviso et Capitol possèdent des indices de récolte en S (SHI) et des efficiences d'utilisation du S (SUtE) similaires. Cependant, Aviso présente les plus forts niveaux d'absorption racinaire du S durant les premières étapes du développement de la graine en condition d'alimentation soufrée pléthorique (traitement HS). De plus, l'absorption du S chez Aviso demeure efficiente en réponse à une restriction en sulfate durant les premières étapes du développement de la graine et la redistribution du S aux organes reproducteurs est plus précoce que chez Capitol en réponse à une restriction appliquée au stade GS53 (inflorescence principale dégagée, traitement LS53). **Par rapport à Capitol, Aviso se caractérise donc par une meilleure gestion du S en cas de faible disponibilité en sulfate.**

Ayant des rendements équivalents en condition d'alimentation soufrée non limitante, ces deux génotypes produisent cependant des graines aux masses différentes. Le poids de mille graines (PMG) d'Aviso étant inférieur au PMG de Capitol, ses besoins en S sont quantitativement plus faibles. Cette observation pourrait expliquer en partie la meilleure gestion du S par Aviso en condition de restriction de l'apport de S, moins de S devant être fourni à chaque graine pour satisfaire ses besoins.

A – 3 La limitation en S influe également sur la gestion du S par le péricarpe

La silique de colza en développement est généralement considérée comme un puits pour le S (Rossato *et al.*, 2001). Cependant, le péricarpe pourrait contribuer à l'alimentation de la graine en composés réduits, comme cela a été observé chez le pois en condition non limitante en S (Rochat & Boutin, 1991). En apportant du ^{35}S-sulfate à des siliques de colza d'hiver en développement issues de plantes bien alimentées en S, Zhao *et al.* (1993a) ont observé que le S transporté à la silique s'accumule sous forme de sulfate au niveau du péricarpe, avant d'être transporté dans les graines. La forte proportion de sulfate retrouvée dans les péricarpes en condition non limitante, également observée dans les travaux décrits dans cette thèse, pourrait être liée à sa séquestration au sein des vacuoles, comme observé au niveau foliaire (Dubousset *et al.*, 2009). Les calculs de flux réalisés sur les génotypes Aviso et Capitol, effectués entre des dates relativement éloignées, ne permettent pas de mettre en évidence le rôle transitoire du péricarpe dans le remplissage de la graine en S (Chapitre VIB). Cependant, en cas de restriction de l'apport de S, la teneur en sulfate ainsi que la proportion de S-sulfate sont fortement réduites dans les péricarpes du génotype Capitol, alors qu'elles sont comparativement peu affectées dans les graines (Chapitre VIA). **Ces observations suggèrent que le S apporté à la silique en cas de limitation de l'apport de S est utilisé pour répondre à la demande des graines en développement et** que la gestion du S par le péricarpe peut être modulée en cas de limitation en S, favorisant le remplissage des graines.

L'apport de sulfate marqué au ^{34}S pendant 24 heures à des péricarpes isolés, prélevés au cours du développement de la silique sur des colzas du génotype Capitol (5 semaines après floraison), entraine une augmentation de la teneur en ^{34}S retrouvé dans la fraction protéique, apportant la preuve que **le péricarpe possède la capacité d'assimiler le S sous forme de sulfate par la voie d'assimilation réductrice, et de l'incorporer dans ses protéines**

(Chapitre VIA). Cependant, le maintien des teneurs en protéines, en S-protéique, et de la plupart des acides aminés au terme de ces 24 h de traitement suggère également que **les protéines synthétisées dans le péricarpe subissent un turnover important, qui pourrait contribuer à fournir des acides aminés à la graine en développement**. Dans les péricarpes issus de plantes bien alimentées en S, l'augmentation de la teneur en ^{34}S est également associée à une forte incorporation de ^{34}S dans la fraction minérale (*i.e.* sous forme de sulfate). Dans ces conditions de nutrition non limitantes, la plante entière est en mesure de fournir le S nécessaire au remplissage des graines et de satisfaire pleinement la demande en S du péricarpe, qui a tendance à accumuler de fortes quantités de sulfate. Sur la base de ces observations, **la capacité d'assimilation du sulfate peut être qualifiée de faible dans les péricarpes de plantes bien alimentées en S.**

Dans les péricarpes issus de plantes limitées en S, les incorporations de ^{34}S dans les fractions sulfate et protéique sont plus faibles que dans les péricarpes issus de plantes bien alimentées en S. L'augmentation de la teneur en ^{34}S est également associée, dans ces péricarpes, à sa forte incorporation dans la fraction correspondant aux autres composés organiques soufrés. Ces observations démontrent que **la capacité d'assimilation du sulfate est augmentée, et que l'incorporation du S dans les protéines est diminuée dans les péricarpes en réponse à une limitation en S.** La part de S retrouvée dans les protéines est également significativement plus faible dans les péricarpes de plantes limitées en S (protéines contenant 0,32 % de S) que dans les péricarpes de plantes bien alimentées (protéines contenant 3,66 % de S), 5 semaines après floraison, soutenant l'hypothèse que **les acides aminés soufrés sont très faiblement incorporés dans les protéines des péricarpes en condition d'alimentation soufrée limitante**. Cette différence est moins importante entre les graines issues de plantes limitées en S (protéines contenant 0,48 % de S) et bien alimentées en S (protéines contenant 0,77 % de S) 5 semaines après floraison. Ces résultats démontrent que **le S est fourni en priorité aux graines en développement en cas de limitation en S**, au détriment d'autres organes tels que les péricarpes.

Ainsi, en condition de limitation de l'apport de S, **la plus faible quantité de S transporté jusqu'aux siliques serait en partie compensée par l'augmentation de la capacité d'assimilation de sulfate et par la réduction de l'accumulation de S dans les protéines au**

Vernalisation	Montaison	Floraison			Développement des graines		
Traitement	LS32	LS53			LS70		
Génotype	Capitol	Capitol		Aviso	Capitol		Aviso
Chapitre	V	V	VIB	VIB	V	VIB	VIB
Remobilisation du S des organes végétatifs	↗*	↗*	↗ tardive	↗ précoce	↗*	↗ tardive	↗ tardive
Rendement	↘*	→*	↘	→	→*	→	→
Teneur en protéines	↘*	→*	→	→	→*	→	→
Qualité protéique	↘	↘	↘	↘	↘	↘	→
Teneur en lipides	↘*	↘*	ND	ND	→*	ND	ND
Qualité lipidique	↘	↘	ND	ND	→	ND	ND
Vigueur germinative	↘	→	ND	ND	→	ND	ND

Figure VIII.2 Schéma récapitulatif des impacts de restrictions de l'apport de sulfate à différents stade du développement sur la remobilisation du S des organes végétatifs, le rendement grainier, les teneurs en lipides et protéines, la qualité lipidique et protéique, et la vigueur germinative des graines produites.

* : Résultats observés au cours de la thèse de Lucie Dubousset (2009). ND, non déterminée.

niveau du péricarpe, pour permettre de couvrir les besoins en composés soufrés réduits des graines en développement.

B La limitation en S affecte le métabolisme et la qualité de la graine de colza

L'analyse du contenu lipidique et l'étude protéomique de la graine mature du génotype Capitol en réponse à des restrictions de l'apport de sulfate, appliquées à différents stades du développement, révèlent que plus la limitation en S est précoce, plus la qualité protéique et lipidique de la graine est affectée (Figure VIII.2 ; chapitre V). Alors que la qualité protéique de la graine mature est altérée par les restrictions en S appliquées aux stades GS32 (début de montaison, traitement LS32), GS53 (inflorescence principale dégagée, traitement LS53) et GS70 (chute des premiers pétales, traitement LS70), la qualité lipidique n'est réduite qu'en réponse aux traitements LS53 et LS32. **Ainsi, l'altération de la qualité protéique et lipidique de la graine dépend du stade de développement auquel survient la restriction en sulfate** (Figure VIII.2). Les protéines dont l'expression est modulée dans la graine mature par les restrictions de l'apport de S sont associées à différents groupes fonctionnels : des protéines de stockage, des protéines associées aux métabolismes carboné et soufré, ou encore des protéines associées à la réponse à différents stress (http://moulon.inra.fr/protic/sms).

B – 1 Les changements métaboliques induits par la limitation en S peuvent contribuer à maintenir la teneur en protéine de la graine, malgré une réduction de la qualité protéique

Les travaux réalisés dans cette thèse ont permis d'apporter la **preuve de l'existence de la voie d'assimilation réductrice du sulfate au sein de la graine de colza en développement** (Chapitre VI). En effet, un apport de sulfate marqué au ^{34}S à des graines en développement isolées (5 semaines après floraison, génotype Capitol) a conduit à une augmentation de la quantité de ^{34}S retrouvée dans la fraction protéique. Par ailleurs, il apparaît que **le flux de S dans les protéines n'est pas augmenté en réponse à une restriction en S** appliquée au stade GS53 (Chapitre VIA), **malgré l'augmentation de l'activité APR** (Chapitre VIB), enzyme clé de la voie d'assimilation réductrice du S. En effet, l'incorporation de ^{34}S dans la fraction protéique après 24 h d'apport de ^{34}S-sulfate est similaire entre des graines de colzas LS53 et issues de plantes bien alimentées. De plus, la comparaison des génotypes Aviso et Capitol montre que **l'accumulation de S dans les protéines n'est pas dépendante de l'activité APR, mais fortement corrélée à l'accumulation de protéines au cours du développement de la**

graine. Une réduction de la proportion de sulfate et une augmentation de la proportion de S protéique sont observées dans les graines matures du génotype Capitol, dans lesquelles la limitation en S entraine une plus forte activité APR. De même, dans les graines matures du génotype Aviso, la proportion de sulfate diminue et la proportion de S protéique augmente en cas de restriction de l'apport de S, bien qu'aucune différence d'activité APR ne soit observée par rapport aux graines issues de plantes bien alimentées en S. Ainsi, dans les graines de plantes limitées en S, **l'accumulation de S dans les protéines se fait de façon prioritaire, pouvant conduire à un abaissement des niveaux d'accumulation des autres composés soufrés**, comme le glutathion.

Fait intéressant, une augmentation importante de la synthèse protéique est observée après 24 h d'apport de la solution Hoagland ¼ contenant le sulfate marqué aux graines de colza isolées. Ainsi, la teneur en protéines a augmenté dans les graines issues de plantes bien alimentées (+39 %) et ayant subi une restriction en sulfate au stade GS53 (+75 %). Cette importante synthèse protéique suggère que l'exposition à la solution nutritive utilisée pour l'apport de $^{34}SO_4^{2-}$ et/ou la présence de certains éléments minéraux fournis au cours de ces 24 h de traitement pourraient stimuler la synthèse protéique, comme c'est le cas du nitrate chez *Arabidopsis thaliana* (Scheible *et al.*, 2004). Ce résultat inattendu est cependant cohérent avec le fait que les protéines synthétisées dans la graine en développement, étant principalement des protéines de stockage, constituent une ressource très peu mobilisable au cours du remplissage de la graine.

Au niveau de la graine mature du génotype Capitol, les différences d'accumulation de protéines de stockage (SSPs pour « Seed Storage Proteins ») en réponse aux restrictions de l'apport de S (LS32, LS53 et LS70) ont été étudiées plus finement, car elles constituent la majorité des protéines de la graine et sont donc des déterminants importants de sa qualité (Chapitre V). Ces travaux de thèse font ressortir les points suivants :

- Alors que **l'accumulation de SSPs riches en S est réduite en réponse aux restrictions de l'apport de S (*e.g.* cruciférine Cru4 et napine)**, et en particulier en réponse aux traitements LS53 et LS32, **les SSPs pauvres en S s'accumulent davantage (*e.g.* cruciférine BnC1)**. Cette compensation permet un maintien des teneurs en protéines de la graine pour les traitements LS70 et LS53. En revanche, **cette adaptation du contenu en SSPs est insuffisante pour permettre le maintien des teneurs en**

protéines dans le cas du traitement LS32, et se traduit par des réductions significatives du contenu en S-protéique pour les 3 traitements étudiés, allant jusqu'à un facteur 2 pour les graines LS32 en comparaison de graines Control. Ainsi, **même si la limitation en S survient à un stade tardif du développement (début formation des siliques) cela se traduira par un impact négatif sur la qualité protéique des graines matures du génotype Capitol** (Figure VIII.2).

- La proportion de S retrouvée dans les protéines de graines matures, significativement plus forte en réponse aux traitements LS70, LS53 et LS32 démontre également que **l'accumulation de S dans la graine se fait en priorité dans les protéines en cas de limitation en S**. Une plus forte abondance de la cruciférine Cru1 – une SSP riche en S – est observée dans les graines matures de colzas LS53 et LS32. Cette accumulation de Cru1 pourrait permettre de maintenir un niveau critique de S sous forme protéique.

Selon Higashi *et al.* (2006), les niveaux d'accumulation des différentes protéines de stockage ne sont pas associés aux niveaux d'expression de leurs ARNm, démontrant que les modifications du contenu en SSPs résultent principalement d'une compensation de l'accumulation des protéines face à la faible disponibilité en acides aminés soufrés. L'abondance accrue de Cru1 dans les graines matures issues de plantes limitées en S suggère cependant une régulation fine et spécifique de l'expression des protéines de stockage dans les graines de colza.

Selon les résultats obtenus sur les génotypes Capitol (Chapitre VIA et VIB) et Aviso (Chapitre VIB), la proportion de S sous forme de sulfate diminue, tandis que la proportion de S sous forme protéique augmente dans la graine de colza en réponse aux restrictions de l'apport de S. Ces effets apparaissent plutôt associés à la force puits exercée par la synthèse protéique qu'à une augmentation de la capacité d'assimilation du sulfate par la graine en développement. La restriction de l'apport de sulfate appliquée sur ces 2 génotypes au stade GS53 abaisse la NUtE et le NHI sans avoir de conséquence sur le niveau d'accumulation de protéines dans la graine (Chapitre VIB). Le rendement ainsi que la qualité protéique de la graine (estimée par le ratio N/S des protéines) sont moins affectés pour Aviso que pour Capitol par les traitements LS70 et LS53. Cela serait dû i) à l'absorption du S racinaire qui demeure efficiente pour Aviso, même si le sulfate est fourni en quantités infimes, et ii) à la

remobilisation plus précoce du S au profit des graines en développement en réponse au traitement LS53.

B – 2 La limitation en S affecte le métabolisme carboné de la graine de colza et réduit la qualité lipidique (Chapitre V)

Contrairement au traitement LS70, les traitements LS53 et LS32 se traduisent par une **réduction de la teneur en lipides des graines matures du génotype Capitol** en comparaison du traitement témoin (Figure VIII.2 ; chapitre V). Pour les graines LS53, cet effet est **principalement associé à une faible accumulation des acides linoléique (C18:2, un ω6) et linolénique (C18:3, un ω3)**. Le traitement LS32 modifie quant à lui profondément le profil lipidique des graines matures. Pour le traitement LS32, la réduction de teneur en huile est associée à de faibles accumulations des ω6 et ω3, **mais également de l'acide oléique (C18:1), le lipide le plus abondant dans la graine mature de colza**. Les traitements LS53 et LS32 entrainent d'autres altérations du profil lipidique des graines matures, comme de plus fortes accumulations des acides palmitique (C16:0), palmitoléique (C16:1) et docosanoïque (C22:0), mais ces changements sont de moindre importance en comparaison des réductions de teneurs en acides oléique, linoléique et linolénique. Synthétisés sous forme de triacylglycérides (TAG), les lipides de réserve sont séquestrés au sein de corps lipidiques, enveloppés par une monocouche de phospholipides dans laquelle sont incluses des protéines, les oléosines et les caléosines, impliquées dans la structure de ces corps lipidiques (Shimada & Hara-Nishimura, 2010). En réponse aux traitements LS53 et LS32, une **réduction de l'accumulation des caléosines est observée, cohérente avec la réduction de la teneur en lipides constatée pour ces traitements.**

Bien qu'elle soit réalisée sur des graines matures, l'analyse protéomique rend compte d'un grand nombre de modulations du métabolisme de la graine face à la limitation en S. Tout comme observé au niveau d'une feuille jeune en réponse à une restriction de l'apport de S au stade rosette, cette étude protéomique a permis de mettre en évidence des modulations de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme carboné primaire au niveau de la graine mature par les différents traitements de restriction en S. En premier lieu, il apparaît que **des protéines impliquées dans les premières étapes du cycle de Krebs sont fortement exprimées**. Le métabolisme mitochondrial de la graine de colza étant principalement voué à fournir le C nécessaire à l'élongation des acides gras se produisant au

niveau cytosolique (Schwender & Shachar-Hill, 2006), ces modulations pourraient permettre de **soutenir la synthèse, et notamment l'élongation des acides gras en réponse à la limitation en S**. Ces observations sont cohérentes avec l'altération des profils lipidiques des graines LS53 et LS32. En effet, la réduction de la teneur en lipides des graines LS53 et LS32 en comparaison du témoin est principalement liée à une moindre accumulation des dérivés d'acides gras de types C18, alors que l'accumulation des acides eicosanoïque (C20:0) et docosanoïque (C22:0) n'est pas réduite dans ces 2 lots de graines.

Au niveau glyoxysomal, les traitements LS53 et LS32 entrainent une réduction de l'accumulation de malate synthase, qui pourrait **limiter la dégradation des acides gras par β-oxydation**, survenant en fin de développement de la graine (Baud *et al.*, 2002; Baud & Lepiniec, 2009). Une plus forte accumulation de l'enzyme malique dans les graines matures des plantes en conditions LS suggère également une contribution plus importante de la voie PEPCase-MDH-ME au métabolisme carboné et à l'accumulation de lipides de réserve dans la graine. Ainsi, ces observations suggèrent **une modification de l'orientation du flux de C au sein de la graine en développement en réponse à une limitation de l'apport de S, qui pourrait grandement participer aux altérations du profil lipidique**.

La réduction de l'accumulation de l'enzyme THI1 en réponse aux traitements LS53 et LS32 pourrait également intervenir dans la réduction des teneurs en lipides observée dans ces graines en affectant la production d'acétyl-CoA, molécule soufrée précurseur de la synthèse des acides gras. En effet, la protéine THI1, localisée aux niveaux mitochondrial et plastidial (Chabregas *et al.*, 2001; 2003), permet la production de thiamine pyrophosphate, coenzyme essentielle à l'activité de nombreuses décarboxylases comme le complexe pyruvate déshydrogénase (Figure VIII.1). Le complexe pyruvate déshydrogénase, présent au niveau plastidial et mitochondrial, permet la production d'acétyl-CoA à partir de pyruvate et de coenzyme A et intervient donc dans une étape clé de la synthèse des acides gras (Ke *et al.*, 2000; Tovar-Mendez *et al.*, 2003). Ainsi, en plus de permettre une allocation préférentielle de la cystéine à la synthèse protéique, la réduction de l'expression de THI1 pourrait limiter l'activité du complexe pyruvate déshydrogénase en réduisant la synthèse de thiamine pyrophosphate (Figure VIII.1). De façon intéressante, l'expression de THI1 est également réduite au niveau de jeunes feuilles en réponse à une restriction de l'apport de S au stade rosette (Chapitre IV). Le gène codant l'homologue de cette protéine chez

Arabidopsis thaliana n'a cependant pas été mis en évidence dans les études transcriptomiques précédemment réalisées en réponse à une limitation en S (Hirai *et al.*, 2003; Nikiforova *et al.*, 2003).

B – 3 La limitation en S module l'expression de protéines associées à différents stress

Certaines protéines impliquées dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques voient leur expression modulée dans les graines matures LS70, LS53 et LS32 en comparaison de graines matures obtenues en condition d'alimentation soufrée non limitante.

De façon intéressante, une réduction de l'accumulation de Mn-SOD et de déshydroascorbate réductase (DHAR) est constatée dans les graines LS70. À l'inverse, dans les graines LS53 et LS32, une SOD Cu/Zn dépendante et la DHAR s'accumulent davantage. La contribution plus marquée de ces deux enzymes aux mécanismes de détoxification des ROS pourrait compenser la réduction du niveau de glutathion spécifiquement observée en réponse à ces 2 traitements. L'accumulation de glyoxalase I dans les graines LS53 et LS32 pourrait également faciliter la détoxification du méthylglyoxal, produit principalement au cours de la glycolyse par déphosphorylation non enzymatique du glycéraldéhyde-3-phosphate et du dihydroxyacétone phosphate (Richard, 1993), en dépit de la faible accumulation de glutathion. **Ainsi, la réduction de l'accumulation de glutathion au sein de la graine de colza semble affecter la capacité de détoxification des molécules toxiques, comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS), ou encore le méthylglyoxal**.

Les myrosinases, catalysant la dégradation des glucosinolates en glucose et en aglycones, présentent une activité très forte dans les graines de colza en comparaison des graines de l'espèce modèle, *Arabidopsis thaliana* (Andréasson *et al.*, 2001). Contrairement aux résultats rapportés par les études transcriptomiques réalisées chez des plantules d'Arabidopsis (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003), l'abondance des myrosinases est, selon nos observations, plus faible dans les graines de colza en réponse aux traitements LS53 et LS32. Cette observation suggère que la baisse du niveau d'accumulation des glucosinolates dans les graines LS53 et LS32 par rapport à celles obtenues en condition d'alimentation soufrée non limitante n'est pas associée à une dégradation accrue de ces composés, mais serait principalement associée à une régulation de leur synthèse, localisée dans le péricarpe, probablement *via* la réduction de l'approvisionnement en S et la régulation des voies d'assimilation du sulfate.

Ainsi, les glucosinolates ne semblent pas pouvoir constituer une source mobilisable de composés soufrés au cours du développement de la graine ; une interprétation en cohérence avec la localisation spatiale différente des myrosinases et de leurs substrats dans la graine de colza (Andréasson *et al.*, 2001). Le faible niveau d'accumulation des myrosinases et des glucosinolates observé en réponse à une limitation en S pourrait également affecter la capacité de la graine à supporter une attaque de pathogène (Dubuis *et al.*, 2005), tout comme la réduction de l'expression de THI1, la thiamine étant impliquée dans la mise en place de la résistance systémique acquise (Ahn *et al.*, 2005).

C La limitation en S altère la germination *sensu stricto* des graines produites et les évènements post-germinatifs

Bien qu'elle constitue un travail préliminaire, l'étude du comportement germinatif et post germinatif des graines produites en condition de restrictions (cv. Capitol) et de limitations (cv. Yudal) de l'apport de S a clairement démontré qu'**une très faible disponibilité en S affecte négativement la vigueur et la capacité germinative des graines produites**. Des réductions de la vitesse germinative et du taux de germination *sensu stricto* de ces graines sont en effet constatées.

Le profilage métabolique des composés soufrés des graines de Capitol au cours de la germination révèle que **le métabolisme soufré est actif au cours de la germination de la graine de colza**. En effet, alors que la quantité de S total de la graine reste stable, du sulfate s'accumule, suggérant la mobilisation d'une source de S organique, la plus probable étant d'origine protéique. De façon prévisible, le métabolisme soufré de la graine en germination est affecté dans les graines issues de plantes ayant subit des restrictions en sulfate. Fait intéressant, lors de la germination des graines issues de plantes privées de S à partir des stades les plus précoces, GS53 et GS32, l'accumulation de glutathion est réduite, alors qu'une accumulation de γ-EC plus importante est observée en comparaison des graines Control. Ces résultats suggèrent que l'homéostasie du glutathion est affectée dans les graines issues de plantes limitées en S, et suppose des altérations de l'activité d'enzymes impliquées dans sa synthèse et/ou sa dégradation.

Indépendamment de l'effet négatif observé sur la germination *sensu stricto*, **les résultats obtenus lors de cette étude mettent également en évidence une réduction de la capacité d'une graine germée à produire une plantule viable**. Paradoxalement, les graines

du génotypes Yudal issues de colzas ayant subit une limitation importante de l'apport de sulfate durant tout le cycle de développement de la plante (S5%, 5 % des besoins en S satisfaits) produisent, 14 jours après le semis, des plantules aux biomasses aériennes et racinaires plus importantes que celles de plantules produites à partir de graines issues de colza bien alimentés en S (S400%). L'apport de sulfate marqué au ^{34}S démontre également que les plantules issues du lot S5% présentent une **meilleure capacité d'absorption du sulfate** que celles du lot S400%. Cette meilleure capacité d'absorption chez les plantules S5% semble être associée à une induction de l'expression génique de BnSultr1;1, transporteur intervenant dans l'absorption racinaire du sulfate. Elle pourrait également être associée à une force puits plus importante exercée par les plantules du lot S5%, dont les racines et les parties aériennes sont davantage développées que celles du lot S400%. Chez les plantules S20%, la capacité d'absorption n'est pas augmentée malgré l'induction de l'expression génique de BnSultr1;1. L'implication spécifique des transporteurs responsables de l'absorption racinaire du sulfate, BnSultr1;1 et BnSultr1;2, dans cette meilleure capacité d'absorption n'est donc pas clairement mise en évidence. Cependant, une régulation post-transcriptionnelle de l'expression de ces transporteurs et/ou l'implication d'autres transporteurs de sulfate dans cette meilleure capacité d'absorption pourraient être envisagées.

Chapitre IX

Conclusion générale et perspectives

Chapitre IX : Conclusion générale et perspectives

A Conclusion générale

Les travaux rassemblés dans ce manuscrit de thèse ont permis de progresser de manière significative dans la compréhension des processus physiologiques impliqués dans la réponse du colza à la limitation en S.

Une restriction de l'apport de S au stade rosette affecte le métabolisme carboné des jeunes feuilles et se traduit par **un stress oxydatif**. Selon nos observations, **la réduction précoce de l'activité photosynthétique provoquée par une restriction en sulfate à ce stade n'est pas associée à une baisse de la teneur en chlorophylles**. La transition stade végétatif - stade reproducteur ainsi que le remplissage de la graine étant fortement conditionnés par l'état physiologique des tissus végétatifs et notamment des feuilles, sources de composés carbonés, azotés et soufrés pour les graines en développement, les effets observés en réponse à une restriction de l'apport de S au stade rosette pourraient avoir un impact important sur la physiologie du colza au stade reproducteur. **Une alimentation soufrée suffisante au stade végétatif est donc nécessaire afin d'assurer la croissance de la plante et de garantir le maintien des performances agronomiques de la culture.** Les réserves soufrées accumulées au niveau foliaire au cours du stade rosette puis au niveau des feuilles et des tiges à la montaison sont également des déterminants majeurs de la réussite de la culture, pouvant suppléer les besoins en S des tissus reproducteurs en cas de limitation en S.

Les travaux réalisés dans cette thèse ont permis de mettre en évidence la **capacité d'assimilation réductrice du sulfate par le péricarpe au cours des processus de remplissage de la graine**. Le péricarpe apparaît jouer un rôle fondamental dans le remplissage de la graine en composés réduits. Nos résultats suggèrent que la capacité d'assimilation du sulfate est augmentée et que l'incorporation d'acides aminés soufrés dans les protéines du péricarpe est diminuée en cas de limitation en S, favorisant ainsi le remplissage de la graine en acides aminés soufrés.

Les effets négatifs engendrés par les restrictions en S minéral appliquées aux stades reproducteurs sur la qualité des graines récoltées mettent en évidence la **nécessité de prendre en compte le niveau de disponibilité en S du sol jusqu'aux étapes ultimes du développement du colza d'hiver**. Cependant, **l'altération de la qualité protéique et lipidique de la graine est dépendante du stade de développement auquel survient la limitation en S**.

Tout comme le péricarpe, **la graine est capable d'assimiler le sulfate par la voie d'assimilation réductrice**. Cependant, l'accumulation de S dans les protéines au cours du remplissage de la graine n'est pas dépendante de l'activité APR, mais fortement corrélée à l'accumulation de protéines. Ainsi, la force puits exercée par la synthèse protéique apparaît être la principale cause de la réduction de la proportion de S sous forme de sulfate et de l'augmentation de la proportion de S-protéique dans la graine mature en réponse à une limitation en S. Dans ces conditions, **l'accumulation des protéines de stockage s'adapte à la faible disponibilité en acides aminés soufrés** par une augmentation de l'accumulation de protéines de stockage pauvres en S, permettant un maintien des teneurs en protéines si la restriction en S survient à un stade de développement tardif (lorsque l'inflorescence principale est dégagée ou au-delà). Une restriction de l'apport de S précoce réduit la NUtE et le NHI et peut en définitive se traduire par une baisse des teneurs en protéines au niveau de la graine mature, comme observé chez Capitol en réponse au traitement LS32.

La réduction de la teneur en lipides observée en réponse à une restriction de l'apport de S est associée à une faible accumulation des acides gras essentiels, les acides linoléique (C18:2, ω6) et linolénique (C18:3, ω3). Elle est **également associée à une faible accumulation d'acide oléique** (C18:1), le principal constituant de l'huile de colza en cas de restriction précoce de l'apport de S. Selon les données rapportées par l'analyse protéomique de la graine mature, ces altérations de la qualité lipidique pourraient être associées à un défaut de synthèse de l'acétyl-CoA, bien que **le métabolisme carboné apparait soutenir l'élongation des acides gras et limiter leur dégradation par β-oxydation**. La faible disponibilité en S, ainsi que l'expression réduite de l'enzyme THI1 dans les graines de plantes limitées en S, pourraient être responsables de ce défaut de synthèse d'acétyl-CoA.

Ces effets sont également dépendants de la sensibilité du génotype cultivé et de sa capacité d'adaptation à la limitation en S. Ainsi, le génotype Aviso a révélé au cours des travaux réalisés dans cette thèse sa forte capacité à résister aux restrictions en sulfate, notamment par une absorption de S efficiente alors qu'il n'est apporté qu'en quantité infime par la solution nutritive (contenant 8,7 µM de SO_4^{2-}). Cette adaptation permet à Aviso de subvenir plus efficacement aux besoins des graines en développement en comparaison de Capitol. Il apparaît pour Aviso que **le niveau de disponibilité en S du sol est à prendre en compte jusqu'au stade GS70 (chute des premiers pétales / formation des premières siliques)**. Chez ce génotype, une restriction de l'apport de S survenant à partir de ce stade n'entraine pas de réduction de la qualité protéique.

La réduction de l'accumulation de glutathion au sein de la graine de colza du génotype Capitol en conditions limitantes en sulfate apparait perturber la capacité de la graine à détoxifier des molécules nocives (ROS, méthylglyoxal). Comme observé au sein de la feuille jeune, la limitation en S provoque dans la graine une accumulation de protéines pouvant favoriser la détoxification efficace de ces molécules dans un contexte où le glutathion devient limitant. Dans un tel contexte, il est également envisageable que les graines deviennent plus sensibles à l'occurrence d'un stress abiotique (*e.g.* stress thermique ou hydrique) et que la conservation de ces graines soit altérée. Une détoxification inefficace des molécules nocives produites par l'activité métabolique pourrait en effet être à l'origine d'un stress oxydatif. La réduction de l'accumulation des glucosinolates ainsi que les plus faibles expressions des myrosinases et de THI1 au sein de la graine mature, pourraient également réduire la capacité de ces graines à supporter une attaque de pathogènes.

Une très faible disponibilité en S provoque une forte baisse de la capacité et de la vigueur germinative des graines produites, ainsi qu'une altération des évènements post-germinatifs. Les plantules issus de graines provenant de plantes ayant subit une limitation importante de l'apport de S durant tout leur cycle de vie présentent une meilleure capacité d'absorption du sulfate que les plantules issues de graines produites sans restriction de l'apport de S.

B Perspectives

Plusieurs perspectives peuvent être envisagées à la suite de ce travail de thèse, sur des aspects **physiologiques**, associant des approches biochimiques et moléculaires et sur des aspects **agronomiques**, en relation avec les observations et interprétations exposées dans le présent manuscrit.

B – 1 Perspectives au niveau physiologique

B – 1.a Sur le métabolisme foliaire du colza

L'analyse du protéome d'une jeune feuille de colzas au stade rosette placés en conditions de restriction en sulfate, réalisée dans cette thèse n'a pas mis en évidence de modulations de l'expression de protéines associées au métabolisme soufré primaire (*e.g.* ATPS, APR), ou de l'Isoflavonoïde reductase impliquée dans la synthèse d'anthocyanes, qui constituent des marqueurs moléculaires de la limitation en S classiquement induits en réponse à la limitation en S chez *Arabidopsis thaliana* (Nikiforova *et al.*, 2003; Hirai *et al.*, 2004). Ceci pourrait être associé à une trop faible expression de ces protéines, qui seraient difficilement détectables en 2-DE. Ainsi, **les modulations de l'expression des protéines du métabolisme soufré primaire en réponse à la limitation en S pourraient être étudiées par des westerns blots**. Les changements d'expressions et d'activité de ces protéines pourraient survenir de façon relativement précoce en réponse à la limitation en S, ce qu'il conviendrait d'étudier en cinétique **par des approches protéomiques, enzymologiques et biochimiques**. L'association d'approches protéomique et métabolomique comparatives à différents temps de limitation en S permettraient notamment de compléter et de valider le modèle proposé. De telles approches réalisées sur des feuilles matures, sources de S en cas de limitation, pourraient également permettre de mettre en évidence des adaptations métaboliques associées à la remobilisation des réserves soufrées accumulées au cours de la période précédant la limitation.

Les modifications métaboliques observées en cas de limitation en S et l'induction d'un stress oxydatif au niveau des jeunes feuilles, démontré par le chapitre IV de cette thèse, pourraient entrainer des régulations post traductionnelles de l'activité de nombreuses protéines. La limitation en S pourrait ainsi se traduire par une oxydation de cystéine au niveau de ces protéines et induire la formation de ponts disulfures. De telles modifications pourraient entrainer des modulations de l'activité de ces protéines et donc intervenir dans la

réponse de la plante à la limitation en S. Une étude du protéome « redox » permettrait de rendre compte de telles modifications et de leur impact sur le métabolisme du colza en cas de limitation.

B – 1.b Sur le métabolisme de la graine de colza

Une étude des flux de carbone pourrait être conduite au niveau de la silique entière mais aussi au niveau de la graine en cours de remplissage en association avec des approches protéomiques, enzymologiques et biochimiques afin i) de déterminer l'influence de la limitation de l'apport de S sur le métabolisme carboné de la graine et ii) de valider ou non les hypothèses proposées par l'interprétation des données protéomiques des graines matures.

Une étude du rôle de THI1 pourrait notamment être réalisée afin de déterminer son implication dans la réduction de l'accumulation des acides gras en cas de limitation en S. De plus, une analyse protéomique en cinétique de la graine en développement permettrait d'étudier le profil d'accumulation des différentes protéines de stockage en réponse à la limitation en S. La plus forte abondance de Cru1 dans les graines du génotype Capitol en réponse aux traitements LS53 et LS32 pourrait être en effet associée à une accumulation de cette protéine au cours des premières étapes du remplissage de la graine, alors que la faible disponibilité en S se fait encore peu sentir au niveau de la graine en développement.

Une étude de l'implication du métabolisme hormonal dans les processus germinatifs et post-germinatifs de graines issues de plantes limitées en S mériterait d'être entreprise. Un défaut de synthèse d'éthylène, produit par l'action de l'ACC synthase et de l'ACC oxydase à partir de *S*-adénosylméthionine (SAM), une molécule soufrée (Kende, 1989), pourrait en effet expliquer une grande part des effets de la restriction en S sur la germination des graines produites et les évènements post-germinatifs, décrits dans le chapitre VII. L'implication de transporteurs de sulfate, autres que BnSultr1;1 et BnSultr1;2, dans les différences de capacité d'absorption de sulfate observées entre plantules développées à partir de graines de colza au statut soufré contrasté pourrait également être étudiée.

B – 2 Perspectives au niveau agronomique

Une perspective agronomique majeure consisterait à étudier les impacts de la limitation en S sur le rendement et la qualité – lipidique et protéique – en conditions de plein champ. Cependant, dans ces conditions, une telle étude est délicate, la disponibilité en S minéral étant également dépendante de nombreux facteurs difficiles à maitriser. Ces facteurs

peuvent être d'ordre biotique, comme l'activité de la faune et de la flore du sol – responsable des processus de minéralisation et fixant une partie du S minéral pour ses propres besoins – ou d'ordre abiotique, comme la pluviométrie – contribuant partiellement à l'apport de S d'origine atmosphérique à la culture et intervenant dans la solubilisation des minéraux, mais aussi dans leur lessivage.

Les espèces actuelles de colza ont été sélectionnées pour leur performance agronomique dans des conditions d'alimentations pléthoriques. Afin de faire face aux défis posés par la nécessité de maintenir les rendements et la qualité des végétaux récoltés tout en réduisant les intrants, il apparaît nécessaire de sélectionner des génotypes ayant des performances agronomiques optimales sur milieux pauvres en S, ou soumis à une restriction de l'apport de S à des stades de développement sensibles à la limitation de l'apport de S. Cette sélection pourrait être entreprise sur un grand nombre de génotypes ayant des rendements similaires, mais produisant des graines de masses différentes, afin de déterminer s'il s'agit d'un bon indicateur de performance dans des conditions de limitation en S.

Références

Références

Abdallah M, Dubousset L, Meuriot F, Etienne P, Avice J-C, Ourry A. **2010**. Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2635–2646.

Achard P, Vriezen WH, Van Der Straeten D, Harberd NP. **2003**. Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *The Plant Cell* **15**: 2816–2825.

Agrawal GK, Thelen JJ. **2006**. Large scale identification and quantitative profiling of phosphoproteins expressed during seed filling in oilseed rape. *Molecular & Cellular Proteomics* **5**: 2044–2059.

Ahmad A, Abdin MZ. **2000a**. Effect of sulphur application on lipid, RNA and fatty acid content in developing seeds of rapeseed (*Brassica campestris* L.). *Plant Science* **150**: 71–76.

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.

Ahn I-P, Kim S, Lee Y. **2005**. Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. *Plant Physiology* **138**: 1505–1515.

Alban C, Job D, Douce R. **2000**. Biotin metabolism in plants. *Annual Review of Plant Biology* **51**: 17–47.

Altenbach SB, Kuo CC, Staraci LC, Pearson KW, Wainwright C, Georgescu A, Townsend J. **1992**. Accumulation of a Brazil nut albumin in seeds of transgenic canola results in enhanced levels of seed protein methionine. *Plant Molecular Biology* **18**: 235–245.

Álvarez C, Calo L, Romero LC, García I, Gotor C. **2010**. An *O*-acetylserine(thiol)lyase homolog with L-cysteine desulfhydrase activity regulates cysteine homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **152**: 656–669.

Andréasson E, Jørgensen LB, Höglund A-S, Rask L, Meijer J. **2001**. Different myrosinase and idioblast distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiology* **127**: 1750–1763.

Avice J-C. **1996**. Mobilisation des réserves azotées et carbonées chez *Medicago sativa* L. : étude par marquage ^{13}C et ^{15}N, caractérisation des protéines de réserve du pivot et relation avec le potentiel de repousse après une coupe. Thèse de doctorat, Université de Caen Basse-Normandie, 135p.

Awazuhara M, Fujiwara T, Hayashi H, Watanabe-Takahashi A, Takahashi H, Saito K. **2005**. The function of SULTR2; 1 sulfate transporter during seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **125**: 95–105.

Bailly C. **2004**. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* **14**: 93–107.

Balint T, Rengel Z. **2011a**. Amino acid composition of xylem and phloem sap varies in canola genotypes differing in nitrogen- and sulfur-use efficiency. *Crop and Pasture Science* **62**: 198–207.

Balint T, Rengel Z. **2011b**. Nitrogen and sulfur uptake and remobilisation in canola genotypes with varied N- and S-use efficiency differ at vegetative and maturity stages. *Crop and Pasture Science* **62**: 299–312.

Barberon M, Berthomieu P, Clairotte M, Shibagaki N, Davidian J-C, 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.

Baud S, Boutin J, Miquel M, Lepiniec L, Rochat C. **2002**. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 151–160.

Baud S, Lepiniec L. **2009**. Regulation of de novo fatty acid synthesis in maturing oilseeds of *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 448–455.

Baud S, Lepiniec L. **2010**. Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Progress in Lipid Research* **49**: 235–249.

Bewley JD. **1997**. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* **9**: 1055–1066.

Bewley JD, Black M. **1994**. *Seeds: physiology of development and germination 2nd ed*. New York, NY, USA: Plenum Press. 445p

Blake-Kalff MMA, Harrison KR, Hawkesford MJ, Zhao F-J, McGrath SP. **1998**. Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response to sulfur deficiency during vegetative growth. *Plant Physiology* **118**: 1337–1344.

Blake-Kalff MMA, Hawkesford MJ, Zhao F-J, McGrath SP. **2000**. Diagnosing sulfur deficiency in field-grown oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Soil* **225**: 95–107.

Blum H, Beier H, Gross H. **1987**. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93–99.

Bourgis F, Roje S, Nuccio ML, Fisher DB, Tarczynski MC, Li C, Herschbach C, Rennenberg H, Pimenta MJ, Shen TL, *et al.* 1999. *S*-methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase. *The Plant Cell* **11**: 1485–1498.

Bradbeer JW. **1988**. *Seed dormancy and germination*. Blackie and Son Ltd. 146p.

Bradford MM. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248–254.

Brown RF, Mayer DG. **1988**. Representing cumulative germination. 2. The use of the Weibull function and other empirically derived curves. *Annals of Botany* **61**: 127–138.

Brunold C, Suter M. **1990**. Adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase. Lea P ed. Methods in plant biochemistry. London: Academic press, 339–343.

Buchanan BB, Balmer Y. **2005**. Redox regulation: a broadening horizon. *Plant Biology* **56**: 187–220.

Buchner P, Stuiver CEE, 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_2S 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.

Burnell JN. **1984**. Sulfate assimilation in C_4 plants. Intercellular and intracellular location of ATP sulfurylase, cysteine synthase, and cystathionine β-lyase in maize leaves. *Plant Physiology* **75**: 873–875.

Cairns NG, Pasternak M, Wachter A, Cobbett CS, Meyer AJ. **2006**. Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiology* **141**: 446–455.

Chabregas SM, Luche DD, Farias LP, Ribeiro AF, Van Sluys M-A, Menck CFM, Silva-Filho MC. **2001**. Dual targeting properties of the N-terminal signal sequence of *Arabidopsis thaliana* THI1 protein to mitochondria and chloroplasts. *Plant Molecular Biology* **46**: 639–650.

Chabregas SM, Luche DD, Van Sluys M-A, Menck CFM, Silva-Filho MC. **2003**. Differential usage of two in-frame translational start codons regulates subcellular localization of *Arabidopsis thaliana* THI1. *Journal of Cell Science* **116**: 285–291.

Covington MB. **2004**. Omega-3 fatty acids. *American Family Physician* **70**: 133–140.

D'Hooghe P, Bataillé M-P, Trouverie J, Avice J-C. **2013a**. A specific method of ^{34}S labelling provides evidence that sulphate assimilation occurs in developing seeds and pod walls of *Brassica napus* L. subjected to ample or limited S nutrition. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* In press.

D'Hooghe P, Escamez S, Trouverie J, Avice J-C. **2013b**. Sulphur limitation provokes physiological and leaf proteome changes in oilseed rape that lead to perturbation of sulphur, carbon and oxidative metabolisms. *BMC Plant Biology* **13**: 1–14.

Damaraju S, Schlede S, Eckhardt U, Lokstein H, Grimm B. **2011**. Functions of the water soluble chlorophyll-binding protein in plants. *Journal of Plant Physiology* **168**: 1444–1451.

Dan H, Yang G, Zheng Z-L. **2007**. A negative regulatory role for auxin in sulphate deficiency response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **63**: 221–235.

Davidian J-C, Kopriva S. **2010**. Regulation of sulfate uptake and assimilation—the same or not the same? *Molecular Plant* **3**: 314–325.

Davoine C, Le Deunff E, Ledger N, Avice J-C, Billard J, Dumas B, Huault C. **2001**. Specific and constitutive expression of oxalate oxidase during the ageing of leaf sheaths of ryegrass stubble. *Plant, Cell & Environment* **24**: 1033–1043.

Desclos M, Dubousset L, Etienne P, Le Caherec F, Satoh H, Bonnefoy J, Ourry A, Avice J-C. **2008**. A proteomic profiling approach to reveal a novel role of *Brassica napus* drought 22 kD/water-soluble chlorophyll-binding protein in young leaves during nitrogen remobilization induced by stressful conditions. *Plant Physiology* **147**: 1830–1844.

Dixon DP, Skipsey M, Edwards R. **2010**. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **71**: 338–350.

Droux M, Ruffet ML, Douce R, Job D. **1998**. Interactions between serine acetyltransferase and *O*-acetylserine (thiol) lyase in higher plants. *European Journal of Biochemistry* **255**: 235–245.

Dubousset L. **2009**. Effet d'une restriction en sulfate couplée ou non à une limitation en nitrate sur l"efficience de mobilisation du S et du N foliaire chez le colza d"hiver (*Brassica napus* L.). Thèse de doctorat, Université de Caen Basse-Normandie, 195p.

Dubousset L, Abdallah M, Desfeux AS, Etienne P, Meuriot F, Hawkesford MJ, Gombert J, Ségura R, Bataillé M-P, Rezé S, *et al.* 2009. Remobilization of leaf S compounds and senescence in response to restricted sulphate supply during the vegetative stage of oilseed rape are affected by mineral N availability. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3239–3253.

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

Dubuis PH, Marazzi C, Städler E, Mauch F. **2005**. Sulphur deficiency causes a reduction in antimicrobial potential and leads to increased disease susceptibility of oilseed rape. *Journal of Phytopathology* **153**: 27–36.

Eastmond PJ, Germain V, Lange PR, Bryce JH, Smith SM, Graham IA. **2000**. Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**: 5669–5674.

Eastmond PJ, Graham IA. **2001**. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends in Plant Science* **6**: 72–78.

Eastmond PJ, Koláčá L, Rawsthorne S. **1996**. Photosynthesis by developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany* **47**: 1763–1769.

Eastmond PJ, Rawsthorne S. **2000**. Coordinate changes in carbon partitioning and plastidial metabolism during the development of oilseed rape embryos. *Plant Physiology* **122**: 767–774.

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

Ferry-Dumazet H, Houel G, Montalent P, Moreau L, Langella O, Negroni L, Vincent D, Lalanne C, de Daruvar A, Plomion C, *et al.* 2005. PROTICdb: A web-based application to store, track, query, and compare plant proteome data. *Proteomics* **5**: 2069–2081.

Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. **2006**. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* **171**: 501–523.

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.

Fitzgerald MA, Ugalde TD, Anderson JW. **2001**. Sulphur nutrition affects delivery and metabolism of S in developing endosperms of wheat. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1519–1526.

Foster R, Williamson CS, Lunn J. **2009**. BRIEFING PAPER: Culinary oils and their health effects. *Nutrition Bulletin* **34**: 4–47.

Foyer CH, Rennenberg H. **2000**. Regulation of glutathione synthesis and its role in abiotic and biotic stress defence. Brunold C, Rennenberg H, De Kok LJ, Stulen I eds. Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants, 127–153.

Foyer CH, Shigeoka S. **2011**. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology* **155**: 93–100.

Foyer CH, Theodoulou FL, Delrot S. **2001**. The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends in Plant Science* **6**: 486–492.

Gallardo K, Firnhaber C, Zuber H, Héricher D. **2007**. A combined proteome and transcriptome analysis of developing *Medicago truncatula* seeds. *Molecular & Cellular Proteomics* **6**: 2165–2179.

Gallardo K, Job C, Groot SP, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, Job D. **2001**. Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiology* **126**: 835–848.

Gallardo K, Job C, Groot SP, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, Job D. **2002a**. Proteomics of *Arabidopsis* seed germination. A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiology* **129**: 823–837.

Gallardo K, Job C, Groot SPC, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, Job D. **2002b**. Importance of methionine biosynthesis for *Arabidopsis* seed germination and seedling growth. *Physiologia Plantarum* **116**: 238–247.

Galvez-Valdivieso G, Mullineaux P. **2010**. The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to the nucleus. *Physiologia Plantarum* **138**: 430–439.

Gimsing AL, Kirkegaard JA. **2008**. Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. *Phytochemistry Reviews* **8**: 299–310.

Guzmán P, Ecker JR. **1990**. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *The Plant Cell* **2**: 513–523.

Haas FH, Heeg C, Queiroz R, Bauer A, Wirtz M, Hell R. **2008**. Mitochondrial serine acetyltransferase functions as a pacemaker of cysteine synthesis in plant cells. *Plant Physiology* **148**: 1055–1067.

Hasan M, Friedt W, Pons-Kühnemann J, Freitag NM, Link K, Snowdon RJ. **2008**. Association of gene-linked SSR markers to seed glucosinolate content in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *napus*). *Theoretical and Applied Genetics* **116**: 1035–1049.

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**: 155–163.

Hawkesford MJ, De Kok LJ. **2006**. Managing sulphur metabolism in plants. *Plant, Cell & Environment* **29**: 382–395.

Hawkesford MJ, Howarth JR, Buchner P. **2006**. Control of sulfur uptake, assimilation and metabolism. Plaxton WC, McManus MT eds. Annual Plant Reviews, Control of Primary Metabolism in Plants. Blackwell Publishing Ltd, 348–372.

Higashi Y, Hirai MY, Fujiwara T, Naito S, Noji M, Saito K. **2006**. Proteomic and transcriptomic analysis of *Arabidopsis* seeds: molecular evidence for successive processing of seed proteins and its implication in the stress response to sulfur nutrition. *The Plant Journal* **48**: 557–571.

Higgins TJV, Chandler PM, Randall PJ, Spencer D, Beach LR, Blagrove RJ, Kortt AA, Inglis AS. **1986**. Gene structure, protein structure, and regulation of the synthesis of a sulfur-rich protein in pea seeds. *Journal of Biological Chemistry* **261**: 11124–11130.

Hirai MY, Fujiwara T, Awazuhara M, Kimura T, Noji M, Saito K. **2003**. Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of *O*-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *The Plant Journal* **33**: 651–663.

Hirai MY, Fujiwara T, Chino M, Naito S. **1995**. Effects of sulfate concentrations on the expression of a soybean seed storage protein gene and its reversibility in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **36**: 1331–1339.

Hirai MY, Klein M, Fujikawa Y, Yano M, Goodenowe DB, Yamazaki Y, Kanaya S, Nakamura Y, Kitayama M, Suzuki H, *et al.* 2005. Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in *Arabidopsis* by integration of metabolomics and transcriptomics. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 25590–25595.

Hirai MY, Saito K. **2004**. Post-genomics approaches for the elucidation of plant adaptive mechanisms to sulphur deficiency. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1871–1879.

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 USA* **101**: 10205–10210.

Hung S, Umemura T, Yamashiro S, Slinger S. **1977**. The effects of original and randomized rapeseed oils containing high or very low levels of erucic acid on cardiac lipids and myocardial lesions in rats. *Lipids* **12**: 215–221.

Jain A, Poling MD, Smith AP, Nagarajan VK, Lahner B, Meagher RB, Raghothama KG. **2009**. Variations in the composition of gelling agents affect morphophysiological and molecular responses to deficiencies of phosphate and other nutrients. *Plant Physiology* **150**: 1033–1049.

Jebanathirajah JA, Coleman JR. **1998**. Association of carbonic anhydrase with a Calvin cycle enzyme complex in *Nicotiana tabacum*. *Planta* **204**: 177–182.

Johnston JS, Pepper AE, Hall AE, Chen ZJ, Hodnett G, Drabek J, Lopez R, Price HJ. **2005**. Evolution of genome size in Brassicaceae. *Annals of Botany* **95**: 229–235.

Jost R, Altschmied L, Bloem E, Bogs J, Gershenzon J, Hähnel U, Hänsch R, Hartmann T, Kopriva S, Kruse C, *et al.* 2005. Expression profiling of metabolic genes in response to methyl

jasmonate reveals regulation of genes of primary and secondary sulfur-related pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis research* **86**: 491–508.

Julliard J-H, Douce R. **1991**. Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **88**: 2042–2045.

Kataoka T, Hayashi N, Yamaya T, Takahashi H. **2004a**. Root-to-shoot transport of sulfate in *Arabidopsis*. Evidence for the role of SULTR3;5 as a component of low-affinity sulfate transport system in the root vasculature. *Plant Physiology* **136**: 4198–4204.

Kataoka T, Watanabe-Takahashi A, Hayashi N, Ohnishi M, Mimura T, Buchner P, Hawkesford MJ, Yamaya T, Takahashi H. **2004b**. Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**: 2693–2704.

Kawashima CG, Matthewman CA, Huang S, Lee B-R, Yoshimoto N, Koprivova A, Rubio-Somoza I, Todesco M, Rathjen T, Saito K, *et al.* 2011. Interplay of SLIM1 and miR395 in the regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **66**: 863–876.

Kawashima CG, Yoshimoto N, Maruyama-Nakashita A, Tsuchiya YN, Saito K, Takahashi H, Dalmay T. **2009**. Sulphur starvation induces the expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types. *The Plant Journal* **57**: 313–321.

Ke J, Behal RH, Back SL, Nikolau BJ, Wurtele ES, Oliver DJ. **2000**. The role of pyruvate dehydrogenase and acetyl-coenzyme A synthetase in fatty acid synthesis in developing *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology* **123**: 497–508.

Kende H. **1989**. Enzymes of ethylene biosynthesis. *Plant Physiology* **91**: 1–4.

Kliebenstein DJ, Monde RA, Last RL. **1998**. Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology* **118**: 637–650.

Klose J. **1975**. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. *Humangenetik* **26**: 231–243.

Kopriva S, Koprivova A. **2004**. Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: the past, the present, and the future. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1775–1783.

Kopriva S, Mugford SG, Baraniecka P, Lee B-R, Matthewman CA, Koprivova A. **2012**. Control of sulfur partitioning between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science* **3**: 1–9.

Kopriva S, Mugford SG, Matthewman CA, Koprivova A. **2009**. Plant sulfate assimilation genes: redundancy versus specialization. *Plant Cell Reports* **28**: 1769–1780.

Koprivova A, North KA, Kopriva S. **2008**. Complex signaling network in regulation of adenosine 5'-phosphosulfate reductase by salt stress in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology* **146**: 1408–1420.

Kopriva S, Rennenberg H. **2004**. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1831–1842.

Koprivova A, Suter M, Camp Den RO, Brunold C, Kopriva S. **2000**. Regulation of sulfate assimilation by nitrogen in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **122**: 737–746.

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.

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 activity of sulfate transporters. *Plant biology (Stuttgart, Germany)* **9**: 654–661.

Kornberg HL, Beevers H. **1957**. A mechanism of conversion of fat to carbohydrate in castor beans. *Nature* **180**: 35–36.

Krebs M, Beyhl D, Gorlich E, Al-Rasheid KAS, Marten I, Stierhof YD, Hedrich R, Schumacher K. **2010**. *Arabidopsis* V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **107**: 3251–3256.

Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G. **2005**. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* **15**: 281–307.

Lambrix V, Reichelt M, Mitchell-Olds T, Kliebenstein DJ, Gershenzon J. **2001**. The *Arabidopsis* epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *The Plant Cell* **13**: 2793–2807.

Lappartient AG, Vidmar J, Leustek T, Glass ADM, Touraine B. **1999**. Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. *The Plant Journal* **18**: 89–95.

Lee B-R, Li LS, Jung WJ, Jin YL, Avice J-C, Ourry A, Kim TH. **2009**. Water deficit-induced oxidative stress and the activation of antioxidant enzymes in white clover leaves. *Biologia Plantarum* **53**: 505–510.

Lee M, Huang T, Toro Ramos T, Fraga M, Last RL, Jander G. **2008**. Reduced activity of *Arabidopsis thaliana* HMT2, a methionine biosynthetic enzyme, increases seed methionine content. *The Plant Journal* **54**: 310–320.

Leterme P. **1985**. Modélisation de la croissance et de la production des siliques chez le colza d'hiver; application à l'interpretation de resultats de rendements. Thèse de doctorat, Paris, 113p.

Leustek T, Saito K. **1999**. Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiology* **120**: 637–643.

Likens GE, Driscoll CT, Buso DC. **1996**. Long-term effects of acid rain: response and recovery of a forest ecosystem. *Science* **272**: 244–245.

Lindahl M, Kieselbach T. **2009**. Disulphide proteomes and interactions with thioredoxin on the track towards understanding redox regulation in chloroplasts and cyanobacteria. *Journal of Proteomics* **72**: 416–438.

Lindqvist Y, Schneider G. **1993**. Thiamin diphosphate dependent enzymes: transketolase, pyruvate oxidase and pyruvate decarboxylase. *Current Opinion in Structural Biology* **3**: 896–901.

Linkies A, Muller K, Morris K, Tureckova V, Wenk M, Cadman CSC, Corbineau F, Strnad M, Lynn JR, Finch-Savage WE, *et al.* 2009. Ethylene interacts with abscisic acid to regulate endosperm rupture during germination: a comparative approach using *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Online* **21**: 3803–3822.

Livak KJ, Schmittgen TD. **2001**. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* **25**: 402–408.

Loudet O, Saliba-Colombani V, Camilleri C, Calenge F, Gaudon V, Koprivova A, North KA, Kopriva S, Daniel-Vedele F. **2007**. Natural variation for sulfate content in *Arabidopsis thaliana* is highly controlled by APR2. *Nature Genetics* **39**: 896–900.

López-Granados F, Lutman P. **1998**. Effect of environmental conditions on the dormancy and germination of volunteer oilseed rape seed (*Brassica napus*). *Weed Science* **46**: 419–423.

Machado CR, de Oliveira RL, Boiteux S, Praekelt UM, Meacock PA, Menck CF. **1996**. *Thi1*, a thiamine biosynthetic gene in *Arabidopsis thaliana*, complements bacterial defects in DNA repair. *Plant Molecular Biology* **31**: 585–593.

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

Marmagne A, Brabant P, Thiellement H, Alix K. **2010**. Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allotetraploids: transcriptional changes do not explain differential protein regulation. *New Phytologist* **186**: 216–227.

Maruyama-Nakashita A, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Yamaya 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 Online* **18**: 3235–3251.

Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Yamaya T, Takahashi H. **2004a**. A novel regulatory pathway of sulfate uptake in *Arabidopsis* roots: implication of CRE1/WOL/AHK4-mediated cytokinin-dependent regulation. *The Plant Journal* **38**: 779–789.

Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Yamaya T, Takahashi H. **2004b**. Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signalling and regulation. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1843–1849.

Mathesius U, Keijzers G, Natera SH, Weinman JJ, Djordjevic MA, Rolfe BG. **2001**. Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. *Proteomics* **1**: 1424–1440.

Mawson R, Heaney RK, Zdunczyk Z, Kozłowska H. **1993**. Rapeseed meal-glucosinolates and their antinutritional effects Part II. Flavour and palatability. *Food/Nahrung* **37**: 336–344.

Mawson R, Heaney RK, Zdunczyk Z, Kozłowska H. **1994a**. Rapeseed meal-glucosinolates and their antinutritional effects Part 3. Animal growth and performance. *Food/Nahrung* **38**: 167–177.

Mawson R, Heaney RK, Zdunczyk Z, Kozłowska H. **1994b**. Rapeseed meal-glucosinolates and their antinutritional effects. Part 4. Goitrogenicity and internal organs abnormalities in animals. *Food/Nahrung* **38**: 178–191.

McGrath SP, Zhao F-J. **1996**. Sulphur uptake, yield responses and the interactions between nitrogen and sulphur in winter oilseed rape (*Brassica napus*). *Journal of Agricultural Science* **126**: 53–62.

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.

Merrien A, Pouzet A. **1988**. Principaux facteurs limitant les rendements de colza d'hiver dans les conditions françaises physiologie et élaboration du rendement du colza d'hiver. *Cetiom*: 16–19.

Méchin V, Consoli L, Le Guilloux M, Damerval C. **2003**. An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. *Proteomics* **3**: 1299–1302.

Minárik P, Tomásková N, Kollárová M, Antalík M. **2002**. Malate dehydrogenases-structure and function. *General Physiology and Biophysics* **21**: 257–265.

Montrichard F, Alkhalfioui F, Yano H, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB. **2009**. Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *Journal of Proteomics* **72**: 452–474.

Mullineaux P, Rausch T. **2005**. Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynthesis research* **86**: 459–474.

Murphy DJ. **1996**. Engineering oil production in rapeseed and other oil crops. *Trends in Biotechnology* **14**: 206–213.

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

Nakabayashi K, Okamoto M, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E. **2005**. Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *The Plant Journal* **41**: 697–709.

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.

Nikiforova VJ, Bielecka M, Gakiere B, Krueger S, Rinder J, Kempa S, Morcuende R, Scheible W-R, Hesse H, Hoefgen R. **2006**. Effect of sulfur availability on the integrity of amino acid biosynthesis in plants. *Amino acids* **30**: 173–183.

Nikiforova VJ, Daub CO, Hesse H, Willmitzer L, Hoefgen R. **2005a**. Integrative gene-metabolite network with implemented causality deciphers informational fluxes of sulphur stress response. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1887–1896.

Nikiforova VJ, Freitag J, Kempa S, Adamik M, Hesse H, Hoefgen R. **2003**. Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *The Plant Journal* **33**: 633–650.

Nikiforova VJ, Gakiere 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. **2005b**. Systems rebalancing of metabolism in response to sulfur deprivation, as revealed by metabolome analysis of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* **138**: 304–318.

Nonogaki H, Bassel GW, Bewley JD. **2010**. Germination—Still a mystery. *Plant Science* **179**: 574–581.

Næsted H, Frandsen GI, Jauh GY, Hernandez-Pinzon I, Nielsen HB, Murphy DJ, Rogers JC, Mundy J. **2000**. Caleosins: Ca^{2+}-binding proteins associated with lipid bodies. *Plant Molecular Biology* **44**: 463–476.

O'Farrell PH. **1975**. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* **250**: 4007–4021.

Oenema O, Postma R. **2003**. Managing sulphur in agroecosystems. Abrol YP, Ahmad A eds. Sulphur in Plants. Kluwer Academic Publishers, 45–70.

Ohto M, Stone SL, Harada JJ. **2007**. Genetic control of seed development and seed mass. Bradford KJ, Nonogaki H eds. Annual Plant Reviews, Seed Development, Dormancy and Germination. Blackwell Publishing Ltd, 1–24.

Papas A, Ingalls JR, Campbell LD. **1979**. Studies on the effects of rapeseed meal on thyroid status of cattle, glucosinolate and iodine content of milk and other parameters. *The Journal of nutrition* **109**: 1129–1139.

Parmar S, Buchner P, Hawkesford MJ. **2007**. Leaf developmental stage affects sulfate depletion and specific sulfate transporter expression during sulfur deprivation in *Brassica napus* L. *Plant Biology* **9**: 647–653.

Pastorello EA, Pompei C, Pravettoni V, Brenna O, Farioli L, Trambaioli C, Conti A. **2001**. Lipid transfer proteins and 2S albumins as allergens. *Allergy* **5**: 45–47.

Penfield S, Pinfield Wells H, Graham IA. **2007**. Lipid metabolism in seed dormancy. Bradford KJ, Nonogaki H eds. Annual Plant Reviews, Seed Development, Dormancy and Germination. Blackwell Publishing Ltd, 133–152.

Plaxton WC. **1996**. The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Review of Plant Biology* **47**: 185–214.

Pritchard S, Charlton W, Baker A. **2002**. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **31**: 639–647.

Purkrtova Z, Jolivet P, Miquel M, Chardot T. **2008**. Structure and function of seed lipid body-associated proteins. *Comptes Rendus Biologies* **331**: 746–754.

Rajjou L, Duval M, Gallardo K, Catusse J, Bally J, Job C, Job D. **2012**. Seed germination and vigor. *Annual Review of Plant Biology* **63**: 507–533.

Redei G. **1965**. Genetic blocks in the thiamine synthesis of the angiosperm *Arabidopsis*. *American Journal of Botany* **52**: 834–841.

Reymond P, Farmer EE. **1998**. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 404–411.

Richard JP. **1993**. Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochemical Society Transactions* **21**: 549–553.

Rochat C, Boutin J. **1991**. Metabolism of phloem-borne amino acids in maternal tissues of fruit of nodulated or nitrate-fed pea plants (*Pisum sativum* L.). *Journal of Experimental Botany* **42**: 207–214.

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

Rouached H, Berthomieu P, Kassis El E, Cathala N, Catherinot V, Labesse G, Davidian J-C, Fourcroy P. **2005**. Structural and functional analysis of the C-terminal STAS (sulfate transporter and anti-sigma antagonist) domain of the *Arabidopsis thaliana* sulfate transporter SULTR1.2. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 15976–15983.

Rouached H, Secco D, Arpat AB. **2009**. Getting the most sulfate from soil: regulation of sulfate uptake transporters in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* **166**: 893–902.

Rouached H, Wirtz M, Alary R, Hell R, Arpat AB, Davidian J-C, 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.

Saito K. **2004**. Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiology* **136**: 2443–2450.

Schaller A, Stintzi A. **2009**. Enzymes in jasmonate biosynthesis – Structure, function, regulation. *Phytochemistry* **70**: 1532–1538.

Scheerer U, Haensch R, Mendel RR, Kopriva S, Rennenberg H, Herschbach C. **2010**. Sulphur flux through the sulphate assimilation pathway is differently controlled by adenosine 5′-phosphosulphate reductase under stress and in transgenic poplar plants overexpressing γ-ECS, SO, or APR. *Journal of Experimental Botany* **61**: 609–622.

Scheible W, Morcuende R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N, Schindelasch D, Thimm O, Udvardi M, Stitt M. **2004**. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiology* **136**: 2483–2499.

Scherer HW. **2001**. Sulphur in crop production—Invited paper. *European Journal of Agronomy* **14**: 81–111.

Schindler DW. **1988**. Effects of acid rain on freshwater ecosystems. *Science* **239**: 149–157.

Schjoerring JK, Bock J, Gammelvind L, Jensen CR, Mogensen VO. **1995**. Nitrogen incorporation and remobilization in different shoot components of field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) as affected by rate of nitrogen application and irrigation. *Plant and Soil* **177**: 255–264.

Schopfer P, Plachy C. **1984**. Control of Seed Germination by Abscisic Acid : II. Effect on Embryo Water Uptake in *Brassica napus* L. *Plant Physiology* **76**: 155–160.

Schopfer P, Plachy C. **1985**. Control of Seed Germination by Abscisic Acid : III. Effect on Embryo Growth Potential (Minimum Turgor Pressure) and Growth Coefficient (Cell Wall Extensibility) in *Brassica napus* L. *Plant Physiology* **77**: 676–686.

Schwender J, Ohlrogge JB, Shachar-Hill Y. **2003**. A flux model of glycolysis and the oxidative pentosephosphate pathway in developing *Brassica napus* embryos. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 29442–29453.

Schwender J, Shachar-Hill Y. **2006**. Mitochondrial metabolism in developing embryos of *Brassica napus*. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 34040–34047.

Sexton PJ, Shibles RM. **1999**. Activity of ATP sulfurylase in reproductive soybean. *Crop Science* **39**: 131–135.

Shimada TL, Hara-Nishimura I. **2010**. Oil-body-membrane proteins and their physiological functions in plants. *Biological & pharmaceutical bulletin* **33**: 360–363.

Slaymaker D, Navarre D, Clark D. **2002**. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**: 11640–11645.

Solomon MB, Lynch GP, Paroczay E, Norton S. **1991**. Influence of rapeseed meal, whole rapeseed, and soybean meal on fatty acid composition and cholesterol content of muscle and adipose tissue from ram lambs. *Journal of Animal Science* **69**: 4055–4061.

Steeves TA. **1983**. The evolution and biological significance of seeds. *Canadian journal of botany* **61**: 3550–3560.

Subbiah V, Reddy KJ. **2010**. Interactions between ethylene, abscisic acid and cytokinin during germination and seedling establishment in *Arabidopsis*. *Journal of Biosciences* **35**: 451–458.

Tabe LM, 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.

Tabe LM, Droux M. **2002**. Limits to sulfur accumulation in transgenic lupin seeds expressing a foreign sulfur-rich protein. *Plant Physiology* **128**: 1137–1148.

Takahashi H, Buchner P, Yoshimoto N, Hawkesford MJ, Shiu S-H. **2011a**. Evolutionary relationships and functional diversity of plant sulfate transporters. *Frontiers in plant science* **2**: 1–9.

Takahashi H, Kopriva S, Giordano M, Saito K, Hell R. **2011b**. Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annual Review of Plant Biology* **62**: 157–184.

Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW, Blake-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.

Takahashi S, Yanai H, Nakamaru Y, Uchida A, Nakayama K, Satoh H. **2012**. Molecular cloning, characterization and analysis of the intracellular localization of a water-soluble Chl-binding protein from brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. gemmifera). *Plant and Cell Physiology* **53**: 879–891.

Tewari R, Kumar P, Sharma PN. **2010**. Morphology and oxidative physiology of sulphur-deficient mulberry plants. *Environmental and Experimental Botany* **68**: 301–308.

The Arabidopsis Genome Initiative. **2000**. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana. Nature* **408**: 796.

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 of the USA* **104**: 18807–18812.

Tomaz T, Bagard M, Pracharoenwattana I. **2010**. Mitochondrial malate dehydrogenase lowers leaf respiration and alters photorespiration and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **154**: 1143–1157.

Tovar-Mendez A, Miernyk JA, Randall DD. **2003**. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells. *European Journal of Biochemistry* **270**: 1043–1049.

Traka M, Mithen R. **2008**. Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Reviews* **8**: 269–282.

Ufaz S, Galili G. **2008**. Improving the content of essential amino acids in crop plants: goals and opportunities. *Plant Physiology* **147**: 954–961.

Vauclare P, Kopriva S, Fell D, Suter M, Sticher L, Ballmoos Von P, Krähenbühl U, Camp Den RO, Brunold C. **2002**. Flux control of sulphate assimilation in *Arabidopsis thaliana*: adenosine 5′-phosphosulphate reductase is more susceptible than ATP sulphurylase to negative control by thiols. *The Plant Journal* **31**: 729–740.

Vig AP, Rampal G, Thind TS, Arora S. **2009**. Bio-protective effects of glucosinolates - A review. *LWT - Food Science and Technology* **42**: 1561–1572.

Walker KC, Booth EJ. **2001**. Agricultural aspects of rape and other *Brassica* products. *European Journal of Lipid Science and Technology* **103**: 441–446.

Wang W, Scali M, Vignani R, Spadafora A, Sensi E, Mazzuca S, Cresti M. **2003**. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* **24**: 2369–2375.

Wi SJ, Jang SJ, Park KY. **2010**. Inhibition of biphasic ethylene production enhances tolerance to abiotic stress by reducing the accumulation of reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum*. *Molecules and cells* **30**: 37–49.

Wirtz M, Hell R. **2006**. Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: structural, biochemical and regulatory properties. *Journal of Plant Physiology* **163**: 273–286.

Wittstock U, Halkier BA. **2002**. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends in Plant Science* **7**: 263–270.

Yoshimoto N, Inoue E, Saito K, Yamaya T, Takahashi H. **2003**. Phloem-localizing sulfate transporter, Sultr1; 3, mediates re-distribution of sulfur from source to sink organs in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **131**: 1511–1517.

Yoshimoto N, Inoue E, Watanabe-Takahashi A. **2007**. Posttranscriptional regulation of high-affinity sulfate transporters in *Arabidopsis* by sulfur nutrition. *Plant Physiology* **145**: 378–388.

Yoshimoto N, Takahashi H, Smith F. **2002**. Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal* **29**: 465-473.

Yu B, Gruber M, Khachatourians G, Hegedus DD, Hannoufa A. **2010**. Gene expression profiling of developing *Brassica napus* seed in relation to changes in major storage compounds. *Plant Science* **178**: 381–389.

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.

Zhao F-J, Bilsborrow PE, Evans EJ, Syers JK. **1993a**. 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-J, Evans EJ, Bilsborrow PE, Syers JK. **1993b**. Influence of sulphur and nitrogen on seed yield and quality of low glucosinolate oilseed rape (*Brassica napus* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **63**: 29–37.

Zhao F-J, Evans EJ, Bilsborrow PE, Syers JK. **1993c**. Sulphur uptake and distribution in double and single low varieties of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant and Soil* **150**: 69–76.

Zhao F-J, Evans EJ, Bilsborrow PE, Syers JK. **1994**. Influence of nitrogen and sulphur on the glucosinolate profile of rapeseed (*Brassica napus* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **64**: 295–304.

Zuber H, Davidian J-C, Aubert G, Aimé D, Belghazi M, Lugan R, Heintz D, Wirtz M, Hell R, Thompson R, *et al.* 2010a. The seed composition of *Arabidopsis* mutants for the group 3 sulfate transporters indicates a role in sulfate translocation within developing seeds. *Plant Physiology* **154**: 913–926.

Zuber H, Davidian J-C, Wirtz M, Hell R, Belghazi M, Thompson R, Gallardo K. **2010b**. *Sultr4;1* mutant seeds of *Arabidopsis* have an enhanced sulphate content and modified proteome suggesting metabolic adaptations to altered sulphate compartmentalization. *BMC Plant Biology* **10**: 1–13.

Liste des illustrations

Liste des illustrations

A Liste des figures

Figure I.1 Évolution des émissions de dioxyde de soufre dans l'atmosphère de France métropolitaine entre 1960 et 2011 selon les secteurs d'activités.

Figure I.1 Évolution des émissions de dioxyde de soufre dans l'atmosphère de France métropolitaine entre 1960 et 2011 selon les secteurs d'activités.

Figure I.2 Cycle biogéochimique du S.

Figure I.3 Besoins annuels cumulés en soufre de différentes espèces végétales de janvier à décembre.

Figure II.1 Évolution des surfaces cultivées (A) et de la production (B) de graines oléagineuses en France métropolitaine de 1973 à 2012.

Figure II.2 Composition standard de l'huile (A) et du tourteau (B) de colza « 00 », caractérisés par de faibles teneurs en acide érucique et en glucosinolates.

Figure II.3 Principales utilisations des graines de colza « 00 » dans l'industrie alimentaire et non alimentaire.

Figure II.4 Représentation schématique des fonctions physiologiques du soufre et de son implication dans la biosynthèse de divers métabolites végétaux.

Figure II.5 Régulation du métabolisme par réduction des ponts disulfures.

Figure II.6 Absorption et transport du sulfate (SO_4^{2-}) chez les Brassicacées.

Figure II.7 Transporteurs de sulfate chez les Brassicacées.

Figure II.8 Organisation cellulaire du métabolisme soufré chez les Brassicacées.

Figure II.9 Étapes de la réaction catalysée par l'APR.

Figure II.10 Modifications de l'expression des transporteurs de sulfate au niveau racinaire et foliaire en réponse à une limitation en sulfate chez *Arabidopsis thaliana*.

Figure II.11 Régulation du métabolisme soufré en réponse à une limitation en sulfate chez *Arabidopsis thaliana*.

Figure II.12 Équilibre du complexe cystéine synthase (SAT/OAS-TL) en fonction de la disponibilité en sulfate.

Figure II.13 Symptômes de carence en S observés chez le colza d'hiver au stade végétatif (A) et reproducteur (B).

Figure II.14 Impact d'une restriction de l'apport de S sur la croissance des parties aériennes (A) et racinaires (B) d'*Arabidopsis thaliana*.

Figure II.15 Évènements physiologiques et métaboliques majeurs intervenant au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis thaliana*.

Figure II.16 Organisation cellulaire du métabolisme carboné central au cours de l'accumulation de lipides dans l'embryon de colza en développement.

Figure II.17 Représentation schématique de la structure d'un corps lipidique ou oléasome.

Figure II.18 Évolution temporelle des évènements physiologiques et métaboliques majeurs survenant au cours de la germination (Phases I et II) et des premières étapes du développement de la plantule (Phase III).

Figure II.19 Localisation histochimique de la protéine GUS dans des siliques de mutant d'*Arabidopsis thaliana* exprimant le gène *GUS* fusionné au promoteur du gène *SULTR2;1*.

Figure II.20 Implications du métabolisme soufré dans la germination et les évènements post-germinatifs.

Figure II.21 Principaux systèmes de détoxification des ROS chez les végétaux.

Figure II.22 Teneurs en protéines totales (a) et en S dans les protéines totales (b) de graines matures d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à une limitation de l'apport de S.

Figure III.1 Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour l'étude d'une restriction en sulfate appliquée au stade rosette sur la physiologie et le protéome d'une jeune feuille de colza d'hiver cv. Capitol.

Figure III.2 Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour l'étude d'une restriction en sulfate (LS) appliquée au stade GS32 (début de montaison ; LS32), GS53 (inflorescence principale dégagée ; LS53) et GS70 (chute des premiers pétales ; LS70) sur le protéome de la graine mature de colza d'hiver cv. Capitol.

Figure III.3 Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour l'étude d'une restriction en sulfate (LS) appliquée au stade GS53 (inflorescence principale dégagée ; LS53) et GS70 (chute des premiers pétales ; LS70) sur le protéome de la graine mature de colza d'hiver cv. Capitol.

Figure III.4 Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour étudier l'impact d'une restriction en sulfate appliquée au stade GS53 (inflorescence principale dégagée) sur l'assimilation du sulfate par les graines et le péricarpe de colza d'hiver cv. Capitol.

Figure III.5 Analyseur élémentaire C/N/S (EA3000, Eurovector, Milan, Italie) couplé à un spectromètre de masse de type IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometer de marque Isoprime, GV Instrument, Manchester, Royaume-Uni) utilisé pour déterminer les teneurs en N et S, et le niveau de marquage en ^{34}S dans les différents tissus végétaux.

Figure III.6 Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE).

Figure III.7 Représentation schématique de la méthode utilisée pour la mesure d'activité ATP sulfurylase (ATPS).

Figure IV.1 Leaves #11 and 16 of a Control plant (panel A) and those subjected to an S restriction (panel B) over 35 d.

Figure IV.2 Relative contents of chlorophylls (A), flavonols (B), anthocyanins (C) and H_2O_2 content (D) in leaf rank #16 of Control and S-restricted plants (Low S) after 21, 28 and 35 d of treatment.

Figure IV.3 Photosynthetic activity (A) and intercellular CO_2 concentration (B) in leaf rank #16 of Control and S–restricted plants (Low S) after 28, 30 and 35 d of treatment.

Figure IV.4 Amounts of S (A) and ^{34}S (B) in leaf rank #16 of Control and S–restricted plants (Low S) after 21, 28 and 35 d of treatment.

Figure IV.5 Changes in amount of total proteins in leaf rank #16 of Control and S–restricted (Low S) plants after 21, 28 and 35 d of treatment.

Figure IV.6 Silver–stained two dimensional electrophoresis gels (2–DE) of total proteins from leaf rank #16 in Control (A) and S–restricted (B) plants after 35 d of treatment.

Figure IV.7 Changes in abundance of protein spots #13 (WSCP), 14 (WSCP), and 15 (Trypsin inhibitor propeptide) in leaf rank #16 of Control and S–restricted plants.

Figure IV.8 Putative sequence of events provoked by a 35 d S limitation on the electron transfer chain and ATP synthase in a young leaf chloroplast.

Figure V.1 Morphology of mature seeds harvested from plants grown under Control, LS70, LS53, or LS32 conditions.

Figure V.2 Fatty acid composition of mature seeds harvested from plants grown under Control, LS70, LS53, or LS32 conditions.

Figure V.3 Two-dimensional electrophoresis gels (2-DE) of total proteins from control, LS70, LS53 and LS32 mature *Brassica napus* seeds.

Figure V.4 (A) Distribution of the 208 proteins presenting a significant variation of abundance in LS70, LS53 and LS32 seeds compared to the control, (B) Number and distribution of the functional groups of proteins changed in LS70, LS53 and LS32 seeds compared to the control.

Figure V.5 Adaptation of seed storage proteins (SSP) accumulation in response to LS70, LS53 and LS32 treatments**.**

Figure V.6 Effect of LS70, LS53 and LS32 treatments on theoretical and experimentally measured sulphur content of mature seeds proteins.

Figure V.7 Schematic representation of changes in accumulation of proteins of carbon metabolism and associated proteins in mature LS70, LS53 and LS32 seeds compared to Control seeds.

Figure VIA.1 Impacts of 24h feeding with $^{34}SO_4^{2-}$ (10 atom% excess) on dry weight (a), sulphur content (b), and ^{34}S labelling (c) of HS and LS seeds and pod walls.

Figure VIA.2 Impacts of 24h feeding with $^{34}SO_4^{2-}$ (10 atom% excess) on S-sulphate content (a), S-sulphate/S ratio (b), and ^{34}S-sulphate labelling (c) of HS and LS seeds and pod walls.

Figure VIA.3 Impacts of 24h feeding with $^{34}SO_4^{2-}$ (10 atom% excess) on soluble protein content (a), S-proteic content (b), S-proteic/S ratio (c) and ^{34}S-proteic labelling (d) of HS and LS seeds and pod walls.

Figure VIA.4 Impacts of 24h feeding with $^{34}SO_4^{2-}$ (10 atom% excess) on the ^{34}S content of sulphate, protein and other organic compounds fractions of HS and LS seeds (a) and pod walls (b).

Figure VIA.5 Impacts of 24h feeding with $^{34}SO_4^{2-}$ (10 atom% excess) on the relative S content of soluble proteins of HS and LS seeds and pod walls.

Figure VIA.S1 Experimental design used to study the impacts S restriction applied at "visible buds" stage (GS53) on seeds and pod walls sulfate assimilation.

Figure VIB.1 Schematic diagram of the experimental design.

Figure VIB.2 *Brassica napus* developing seeds from Aviso (a) and Capitol (b) plants grown under HS53, HS70, LS53 and LS70 conditions and harvested at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 weeks after flowering.

Figure VIB.3 Sulphur flows of remobilized S (determined on the basis of ^{34}S enrichment; see Materials and methods for details, red arrows) and S taken up (estimated from the unlabeled S, blue arrows), and the S amount present at labelling end (GS53) and mature stage (12 weeks after flowering, WAF) in seeds (in mg in seeds), pod walls, flowers, stem, green leaves, fallen leaves and roots of oilseed rape for Aviso (a and c) and Capitol (b and d), HS53 (a and b) and LS53 plants (c and d) from labelling end (GS53) to 6 WAF and from 6 WAF until mature stage (12 WAF).

Figure VIB.4 Sulphur flows of remobilized S (determined on the basis of ^{34}S enrichment; see Materials and methods for details, pink arrows) and S taken up (estimated from the unlabeled S, blue arrows), and the S amount present at labelling end (GS70) and mature stage (12 weeks after flowering, WAF) in seeds (in mg in seeds), pod walls, flowers, stem, green leaves, fallen leaves and roots of oilseed rape for Aviso (a and c) and Capitol (b and d), HS70 (a and b) and LS70 plants (c and d) from labelling end (GS70) to 6 WAF and from 6 WAF until mature stage (12 WAF).

Figure VIB.5 Evolution of seed dry weight (DW, a and b), S (c and d) and N (e and f) amounts and N/S ratio (g and h) in Aviso (solid line and closed symbols) and Capitol (dotted line and open symbols) seeds in HS (squares) and LS (circles) conditions from 2 weeks after flowering until mature stage (12 weeks after flowering).

Figure VIB.6 Evolution of S-sulphate amount (a and b) and S-sulphate/S ratio (c and d) in Aviso (solid line and closed symbols) and Capitol (dotted line and open symbols) seeds in HS (squares) and LS (circles) conditions from 2 weeks after flowering until mature stage (12 weeks after flowering).

Figure VIB.7 Evolution of protein amount (a and b), S-proteic amount (c and d), S-proteic/S ratio (e and f) and N/S ratio of proteins (g and h) in Aviso (solid line and closed symbols) and Capitol (dotted line and open symbols) seeds in HS (squares) and LS (circles) conditions from 2 weeks after flowering until mature stage (12 weeks after flowering).

Figure VIB.8 Evolution of sulphite (a and b), γ-glutamylcysteine (γ-EC, c and d) and glutathione (e and f) amounts in Aviso (solid line and closed symbols) and Capitol (dotted line and open symbols) seeds in HS (squares) and LS (circles) conditions from 2 weeks after flowering until mature stage (12 weeks after flowering).

Figure VIB.9 Evolution of ATPS (a and b) and APR (c and d) activities in Aviso (solid line and closed symbols) and Capitol (dotted line and open symbols) seeds in HS (squares) and LS (circles) conditions from 2 weeks after flowering until mature stage (12 weeks after flowering).

Figure VIB.S1 Evolution of S (a and b) and S-sulphate (c and d) contents in Aviso (solid line and closed symbols) and Capitol (dotted line and open symbols) seeds in HS (squares) and LS (circles) conditions from 2 weeks after flowering until mature stage (12 weeks after flowering).

Figure VIB.S2 Evolution of sulphite (a and b), γ-glutamylcysteine (γ-EC, c and d) and glutathione (e and f) contents in Aviso (solid line and closed symbols) and Capitol (dotted line and open symbols) seeds in HS (squares) and LS (circles) conditions from 2 weeks after flowering until mature stage (12 weeks after flowering).

Figure VII.1 Evolution of cumulative germination of *Brassica napus* seeds obtained from Capitol plants grown under well S supplied (Control) and S-restricted conditions (LS seeds; experiment 1).

Figure VII.2 Evolution of water content (a), fresh weight (b) and protein amount (c) during germination of *Brassica napus* seeds obtained from Capitol plants grown under well S supplied (Control) and S-restricted conditions (LS seeds; experiment 1).

Figure VII.3 Evolution of S (a) , sulphate (b) and thiols (sulphite (c), cysteine (d), γ-EC (e) and and glutathione (f)) during germination of *Brassica napus* seeds obtained from Capitol plants grown under well S supplied (Control) and S-restricted conditions (LS seeds; experiment 1).

Figure VII.4 Evolution of cumulative germination of *Brassica napus* seeds obtained from Yudal plants well S supplied and grown under S-limited conditions (experiment 2).

Figure VII.5 Biomasses (a) and S content (b and c) of *Brassica napus* cv. Yudal shoots and roots, 14 days after sowing on water (d14) and after 24 h treatment of d14 seedlings with 508.7 µM $^{34}SO_4^{2-}$ at 5 atom% excess (d15 +$^{34}SO_4^{2-}$) and with 8.7 µM SO_4^{2-} (d15 -S).

Figure VII.6 Differences in ^{34}S ($\Delta^{34}S$) content in excess in roots and shoots of oilseed rape seedlings (cv. Yudal) between d14 and d15 -S and between d14 and d15 +$^{34}SO_4^{2-}$.

Figure VII.7 Relative expression of *BnSultr1;1* and *BnSultr1;2* in roots of S400%, S70% and S5% oilseed rape seedlings (cv. Yudal) 14 days after sowing on water (d14).

Figure VII.8 Putative metabolic pathway for the provision of S compounds to germinating seeds.

Figure VII.S1 S repartition (a) and S amount (b) of *Brassica napus* cv. Yudal seedlings, 14 days after sowing on water (d14) and after 24 h treatment of d14 seedlings with 508.7 µM $^{34}SO_4^{2-}$ at 5 atom% excess (d15 +$^{34}SO_4^{2-}$) and with 8.7 µM SO_4^{2-} (d15 -S).

Figure VII.S2 Differences in ^{34}S amount in excess in roots and shoots of oilseed rape seedlings (cv. Yudal) between d14 and d15 -S and between d14 and d15 +$^{34}SO_4^{2-}$.

Figure VIII.1 Implication de l'enzyme THI1 dans la synthèse de thiamine pyrophosphate, coenzyme nécessaire à l'activité du complexe pyruvate déshydrogénase.

Figure VIII.2 Schéma récapitulatif des impacts de restrictions de l'apport de sulfate à différents stade du développement sur la remobilisation du S des organes végétatifs, le rendement grainier, les teneurs en lipides et protéines, la qualité lipidique et protéique, et la vigueur germinative des graines produites.

B Liste des tableaux

Table I.1 Principaux engrais soufrés utilisés.

Tableau II.1 Principaux stades repères du cycle de développement du colza.

Tableau II.2 Impacts de restriction de l'apport de sulfate au stade GS70 (chute des premiers pétales ; LS70), GS53 (inflorescence principale dégagée ; LS53), et GS32 (début de montaison ; LS32) sur le rendement, la viabilité, la teneur en huile, en protéines, en S et en glucosinolates des graines produites.

Tableau III.1 Préparation et composition du gel d'acrylamide à 12 % utilisé pour la 2nde étape de l'électrophorèse bidimensionnelle (SDS-PAGE).

Tableau III.2 Méthode de coloration au nitrate d'argent selon Blum *et al*. (1987) utilisée pour la révélation des protéines séparées en électrophorèse bidimensionnelle.

Tableau III.3 Composition de la solution utilisée pour les mesures d'activités ATPS.

Tableau III.4 Composition de la solution contenant l'adenosyl 5' phosphosulfate marqué au ^{35}S (^{35}S-APS) utilisée pour les mesures d'activités APS réductase (APR).

Tableau III.5 Séquences nucléotidiques des couples d'amorces utilisées pour la PCR quantitative (Q-PCR).

Table IV.1 Total shoot and root dry matter (DM), shoot:root ratio and DM of leaves #11 and 16 of plants subjected to Control and Low S treatments

Table IV.2 Proteins significantly repressed in leaf #16 after 35 d of sulphur restriction (Low S) identified by LC–MS/MS

Table IV.3 Proteins significantly induced in leaf #16 after 35 d of sulphur restriction (Low S) identified by LC–MS/MS

Table V.1 Yield components and contents of oil, proteins and glucosinolates in mature seeds produced by plants grown under Control, LS70, LS53 or LS32 conditions (Dubousset *et al.,* 2010).

Table V.2 Sulphur status of mature seeds harvested from plants grown under Control, LS70, LS53, or LS32 conditions.

Table V.3 Significantly changed proteins in LS70, LS53 and LS32 mature seeds identified by mass spectrometry as seed storage proteins, proteins involved in protein synthesis and processing and LEA.

Table V.4 Significantly changed proteins in LS70, LS53 and LS32 mature seeds identified by mass spectrometry as involved in sulphur metabolism, in nitrogen metabolism, in cell structure, growth and division and in signal transduction.

Table V.5 Significantly changed proteins in LS70, LS53 and LS32 mature seeds identified by mass spectrometry as involved in lipid storage and metabolism and in carbon metabolism and energy.

Table V.6 Significantly changed proteins in LS70, LS53 and LS32 mature seeds identified by mass spectrometry as involved in stress response and as lectins.

Table V.S1 Fatty acid composition of mature seeds harvested from plants grown under Control, LS70, LS53, or LS32 conditions.

Table V.S2 Significantly changed proteins in LS70, LS53 and LS32 mature seeds assigned to unknown function or unidentified by mass spectrometry.

Table VIA.1 Amino acids contents in HS, LS, HS+$^{34}SO_4^{2-}$ and LS+$^{34}SO_4^{2-}$ seeds and pod walls.

Table VIA.S1 Status of HS and LS seeds and pod walls at 5 weeks after flowering before the 24h of $^{34}SO_4^{2-}$ feeding (Control).

Table VIB.1 Yield, thousand seed weight, number of seeds produced per plant, S harvest index (SHI), N harvest index (NHI), S utilization efficiency (SUtE, mg of mature seed DW per mg of S in shoots) and N utilization efficiency (NUtE, mg of mature seed DW per mg of N in shoots) at mature stage for Aviso and Capitol in HS, LS70 and LS53 conditions.

Table VII.1 Dry weight, S amount, S-sulphate, S-proteic and S-glutathione amounts of mature *Brassica napus* seeds obtained from Capitol plants grown under well S supplied (Control) and S-restricted conditions (LS seeds; experiment 1).

Table VII.2 Germination indexes and normal seedlings rate of *Brassica napus* seeds obtained from Capitol plants grown under well S supplied (Control) and S-restricted conditions (LS seeds; experiment 1).

Table VII.3 Dry weight, S amount, S-sulphate, S-proteic and S-glutathione amounts of mature *Brassica napus* seeds obtained from Yudal plants well S supplied and grown under S-limited conditions (experiment 2).

Table VII.4 Germination indexes and normal seedling rate of *Brassica napus* seeds obtained from Yudal plants well S supplied and grown under S-limited conditions (experiment 2).

Tableau VIII.1 Impact de limitations de l'apport de sulfate sur la biomasse des parties aériennes chez le colza (*Brassica napus* L.) et le chou (*Brassica oleracea* L.) en fonction des conditions de préculture et de limitation.

Annexes

Annexe 1

Figures supplémentaires

Table V.S1 Fatty acid composition of mature seeds harvested from plants grown under Control, LS70, LS53, or LS32 conditions.

	Fatty acid composition (mg g^{-1}DW)									
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2 (ω6)	C18:3 (ω3)	C20:0	C20:1	C22:0	C22:1
	palmitic	palmitoleic	stearic	oleic	linoleic	linolenic	eicosanoic	gadoleic	behenic	erucic
Control	18.3 ±0.2	1.2 ±0.0	7.8 ±0.2	264.3 ±4.1	87.3 ±1.4	46.4 ±1.1	2.6 ±0.1	5.3 ±0.1	1.4 ±0.0	0 ±0.0
LS70	18.2 ±0.3	1.2 ±0.0	7.9 ±0.1	266.2 ±4.8	85.6 ±1.3	44.3 ±0.8	2.7 ±0.1	5.4 ±0.1	1.5 ±0.0	0 ±0.0
LS53	18.7 ±0.2	1.2 ±0.0	**7.2 ±0.1**	256.7 ±1.9	**79.1 ±1.1**	**41.1 ±0.8**	2.6 ±0.0	5.3 ±0.1	**1.6 ±0.0**	0 ±0.0
LS32	**19.4 ±0.4**	**1.5 ±0.0**	**6.6 ±0.3**	**178.5 ±4.3**	**57.3 ±1.2**	**28.3 ±0.8**	2.6 ±0.0	**3.8 ±0.1**	**1.6 ±0.0**	0 ±0.0

The values are shown as mean ± SE (*n* = 6 for control, *n* = 4 for LS70, LS53 and LS32). Significant differences from the control values are indicated in bold ($p < 0.05$).

Table V.S2 Significantly changed proteins in LS70, LS53 and LS32 mature seeds assigned to unknown function or unidentified by mass spectrometry.

Spot n°	Protein name	LS70		LS53		LS32		Species	NCBI accession numbers	log (E value)	CV (%)	Exp. p*I*	Exp. *Mr* (kDa)	Theo. p*I*	Theo. *Mr* (kDa)
Unknown function															
70	Unknown	-1.0		-1.5	*	-2.2	**	*At*	15220526	-14.0	30	5.8	31.3	6.22	27.29
112	Unknown	-1.9	**	-1.4	*	-1.6	**	*Eh*	312283013	-14.9	18	5.4	64.0	5.61	51.79
123	Unknown	-1.3	**	-1.3	*	-1.8	**	*Al*	297791153	-29.9	20	5.8	34.9	7.07	27.90
128	Unknown	1.7	**	1.3	*	-1.0		*Al*	297816624	-45.5	24	5.2	89.9	5.07	89.94
130	Unknown	-1.1		-1.2	*	-1.7	**	*At*	15220526	-15.2	26	5.9	31.2	6.22	27.29
135	Unknown	1.4		1.7	**	1.5	**	*Pm*	205830697	-5.4	92	5.9	27.0	5.81	1.39
150	Unknown	1.3	**	1.1		-1.2		*Eh*	312282237	-53.1	28	5.1	84.9	4.95	80.07
172	Unknown	-1.1		-1.1		-1.5	**	*Br*	119720748	-5.6	21	6.3	17.2	5.94	17.66
178	Unknown	-1.5		-1.4	**	-1.3	*	*Al*	297842743	-54.7	38	5.5	49.6	5.49	42.12
192	Unknown	1.2		-1.2		-1.3	*	*Al*	297831644	-25.4	10	5.8	90.9	6.58	108.47
Unidentified															
2		-6.0	**	-7.3	**	-1.5						5.8	58.0		
3		-1.1		-2.2		-5.9	**					8.7	42.5		
15		1.6	*	1.1		3.1	**					4.6	52.5		
20		-1.3		1.3		2.4	**					5.5	38.0		
24		1.0		-1.2		-3.0	**					5.7	26.2		
28		-1.1		-1.7		-2.9	**					8.2	44.1		
39		-1.1		-1.4	*	-2.6	**					6.3	71.7		
50		1.1		2.0	**	2.4	**					5.5	40.1		
60		-1.1		1.5		2.1	**					5.5	38.7		
67		-1.0		1.1		2.2	**					6.5	43.8		
78		1.3	*	-1.2		-1.7	**					5.4	26.0		
84		1.2		1.5		2.0	**					6.4	35.9		
90		1.3		1.0		-1.5	**					5.1	33.1		
93		-1.7	*	-1.3		1.2						5.3	38.6		
94		1.3		-1.2		-1.5	**					6.1	83.8		
102		-1.3		-1.9	**	-1.3						6.1	62.3		
103		1.9	**	1.1		1.0						5.1	53.9		
107		1.6	*	1.7		1.9	**					4.4	16.3		
114		-1.2		1.0		1.6	**					6.7	27.5		
115		1.1		-1.1		-1.7	**					6.4	83.4		
116		1.5		1.3	*	1.8	**					5.0	59.1		
119		-1.8	*	-1.3		-1.1						6.5	68.8		
126		1.0		1.1		1.8	**					6.0	50.0		
134		-1.5	*	1.0		1.1						5.4	37.6		
146		1.1		1.7	**	1.4						6.0	24.2		
149		1.3		1.4	**	1.6	**					5.1	16.1		
151		-1.0		-1.1		-1.6	**					5.2	33.4		
154		-1.2		1.1		1.4	**					6.2	30.0		
155		1.3		-1.2	*	-1.0						6.1	84.7		
156		1.1		-1.3	*	-1.5	**					6.3	84.5		
183		1.1		-1.3	*	1.2						6.1	62.5		
186		-1.4	**	-1.0		1.0						5.4	38.4		
193		-1.0		1.4	*	1.3						6.4	16.6		
204		-1.4	**	-1.1		-1.0						6.7	51.7		
206		1.4	*	1.3	*	1.3	**					5.1	28.7		
215		1.1		1.2	*	1.3	**					5.1	28.0		

Significant ANOVA was followed by a Mann–Whitney test ($p < 0.05$) carried out on the normalised spot volumes ($n = 6$ for control, $n = 4$ for LS70, LS53 and LS32). Values indicate fold changes in protein abundance in LS seeds compared to control seeds in a linear scale. *, **: Significant differences from the control were at $p < 0.05$ or $p < 0.01$, respectively. The assigned best–matched protein is listed with the organism in which it was identified and its GenBank protein accession number. The log (Evalue), the percentage of sequence coverage (CV) and experimental (Exp.) and theoretical (Theo.) p*I* / *Mr* obtained are also indicated.

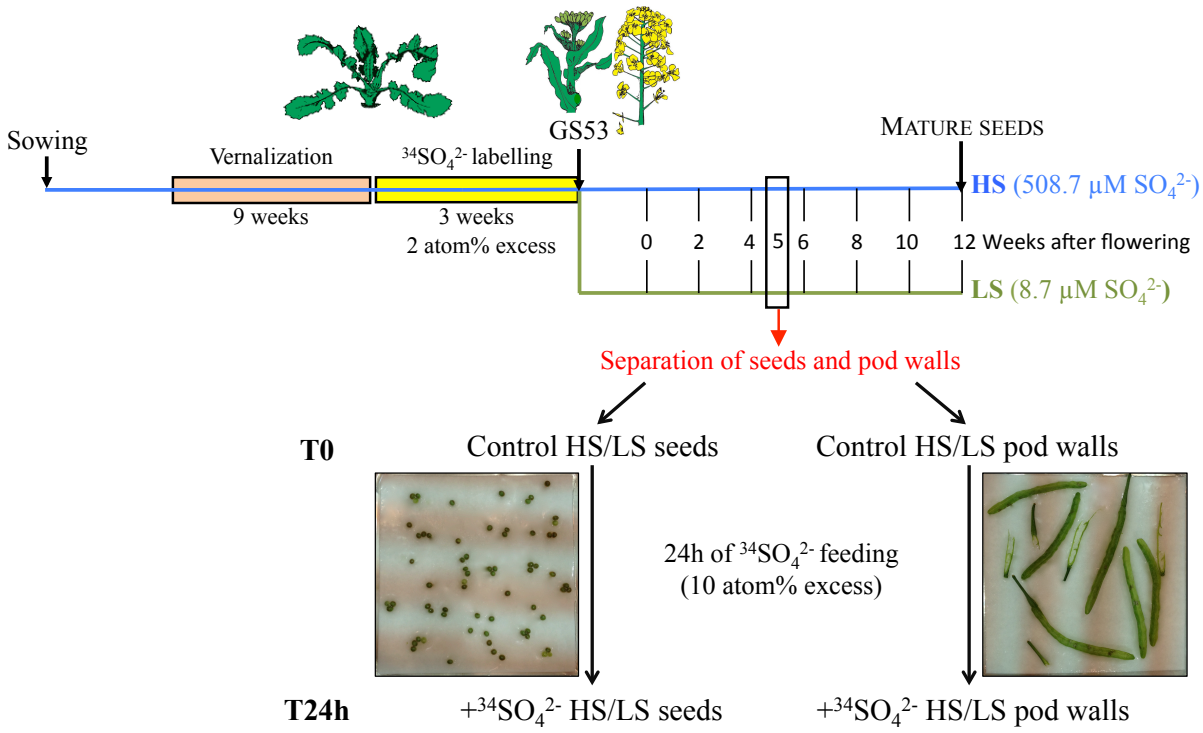


Figure VIA.S1 Experimental design used to study the impacts S restriction applied at "visible buds" stage (GS53) on seeds and pod walls sulfate assimilation.

Plants were supplied from the bolting stage until the "visible buds" stage with 508.7 µM $^{34}SO_4^{2-}$ (2 atom% excess) to obtain plants with homogenous ^{34}S labelling. Afterwards, the ^{34}S labelling was stopped and plants were subjected to mineral S restriction (LS) and ample S nutrition (HS). Seed development lasted 12 weeks from the end of flowering until the mature seed stage. At 5 weeks after flowering, developing pods from HS and LS plants were harvested and directly separated. Freshly harvested seeds and pod walls were then subjected to a 508.7 µM $^{34}SO_4^{2-}$ labelling (10 atom% excess) for 24 h.

Table VIA.S1 Status of HS and LS seeds and pod walls at 5 weeks after flowering before the 24h of $^{34}SO_4^{2-}$ feeding (Control).

	Seeds		Pod walls	
	HS	LS	HS	LS
DW (mg.organ^{-1})	5.53 ± 0.18	5.23 ± 0.64	59.38 ± 3.54	63.23 ± 5.24
S content (mg.g^{-1}DW)	**4.57 ± 0.09**	**3.47 ± 0.07**	**4.3 ± 0.32**	**1.47 ± 0.07**
^{34}S (atom% excess)	**0.37 ± 0.01**	**0.91 ± 0.01**	**0.26 ± 0.01**	**0.88 ± 0**
S-sulphate content (mg.g^{-1}DW)	0.84 ± 0.09	0.67 ± 0.06	**3.79 ± 0.41**	**0.37 ± 0.03**
S-sulphate/S (%)	18.3 ± 1.78	19.34 ± 1.32	**89.46 ± 10.04**	**25.06 ± 1.7**
^{34}S sulphate (atom% excess)	**0.22 ± 0.01**	**0.78 ± 0.04**	**0.14 ± 0.01**	**0.82 ± 0.02**
Protein content (mg.g^{-1}DW)	59.87 ± 1.59	55.11 ± 3.78	22.51 ± 0.3	21.04 ± 1.5
S-proteic content (mg.g^{-1}DW)	**0.46 ± 0.02**	**0.26 ± 0.01**	**0.83 ± 0.04**	**0.07 ± 0.01**
S-proteic/S (%)	**10.17 ± 0.7**	**7.53 ± 0.24**	**19.26 ± 0.49**	**4.68 ± 1.12**
^{34}S-proteic (atom% excess)	**0.4 ± 0.01**	**0.78 ± 0**	**0.15 ± 0.02**	**0.71 ± 0.02**
^{34}S content in excess (µg.g^{-1}DW)	**16.81 ± 0.13**	**31.49 ± 0.09**	**10.98 ± 0.29**	**12.9 ± 0.56**
^{34}S-other organic content in excess (µg.g^{-1}DW)	**13.16 ± 0.28**	**25 ± 0.11**	**4.46 ± 0.68**	**9.41 ± 0.45**
^{34}S-sulphate content in excess (µg.g^{-1}DW)	**1.78 ± 0.12**	**5.22 ± 0.28**	**5.31 ± 0.74**	**3.01 ± 0.21**
^{34}S-proteic content in excess (µg.g^{-1}DW)	**1.87 ± 0.1**	**1.27 ± 0.16**	**1.22 ± 0.14**	**0.48 ± 0.1**
S content in proteins (%)	**0.77 ± 0.03**	**0.48 ± 0.05**	**3.66 ± 0.14**	**0.32 ± 0.05**

Values correspond to the means ± SE. Significant differences between HS and LS control seeds and pod walls ($p<0.05$) are annotated in bold.

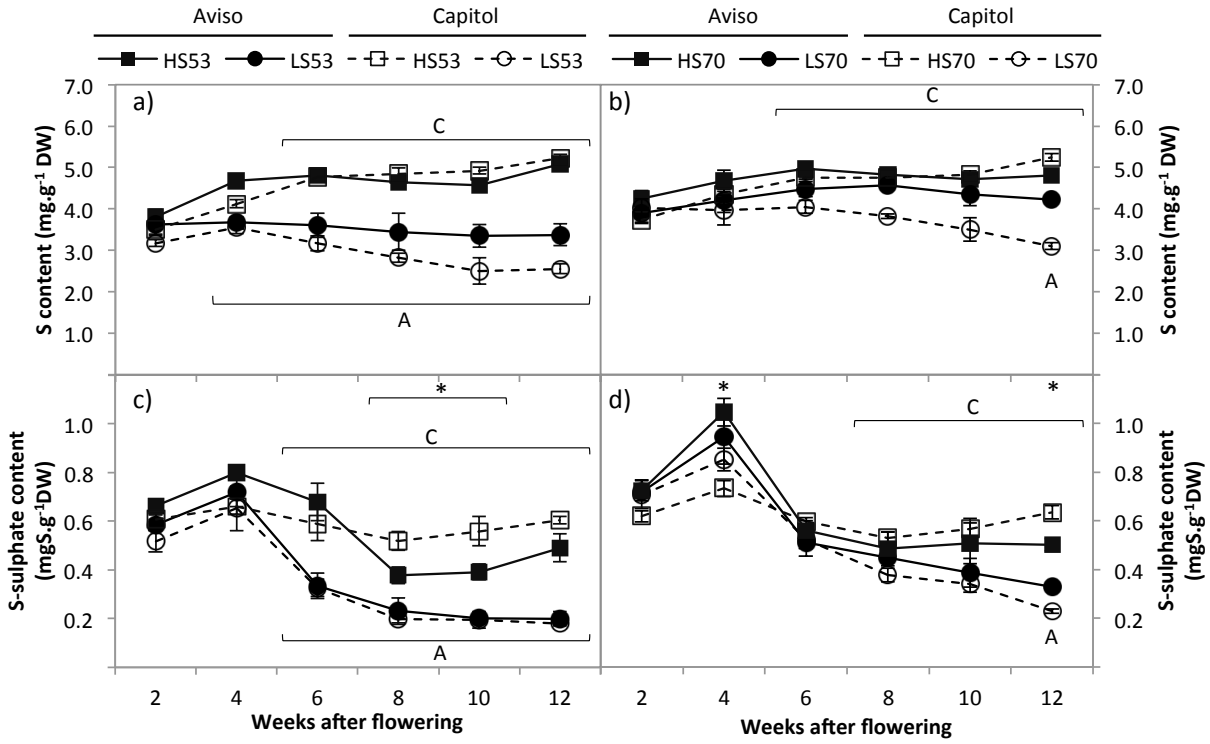


Figure VIB.S1 Evolution of S (a and b) and S-sulphate (c and d) contents in Aviso (solid line and closed symbols) and Capitol (dotted line and open symbols) seeds in HS (squares) and LS (circles) conditions from 2 weeks after flowering until mature stage (12 weeks after flowering).

Values are given as the mean ±SE (*n* = 4). *: Significant differences between Aviso and Capitol in HS condition ($p < 0.05$). A: Significant differences between HS and LS condition for Aviso ($p \leq 0.05$). C: Significant differences between HS and LS condition for Capitol ($p < 0.05$).

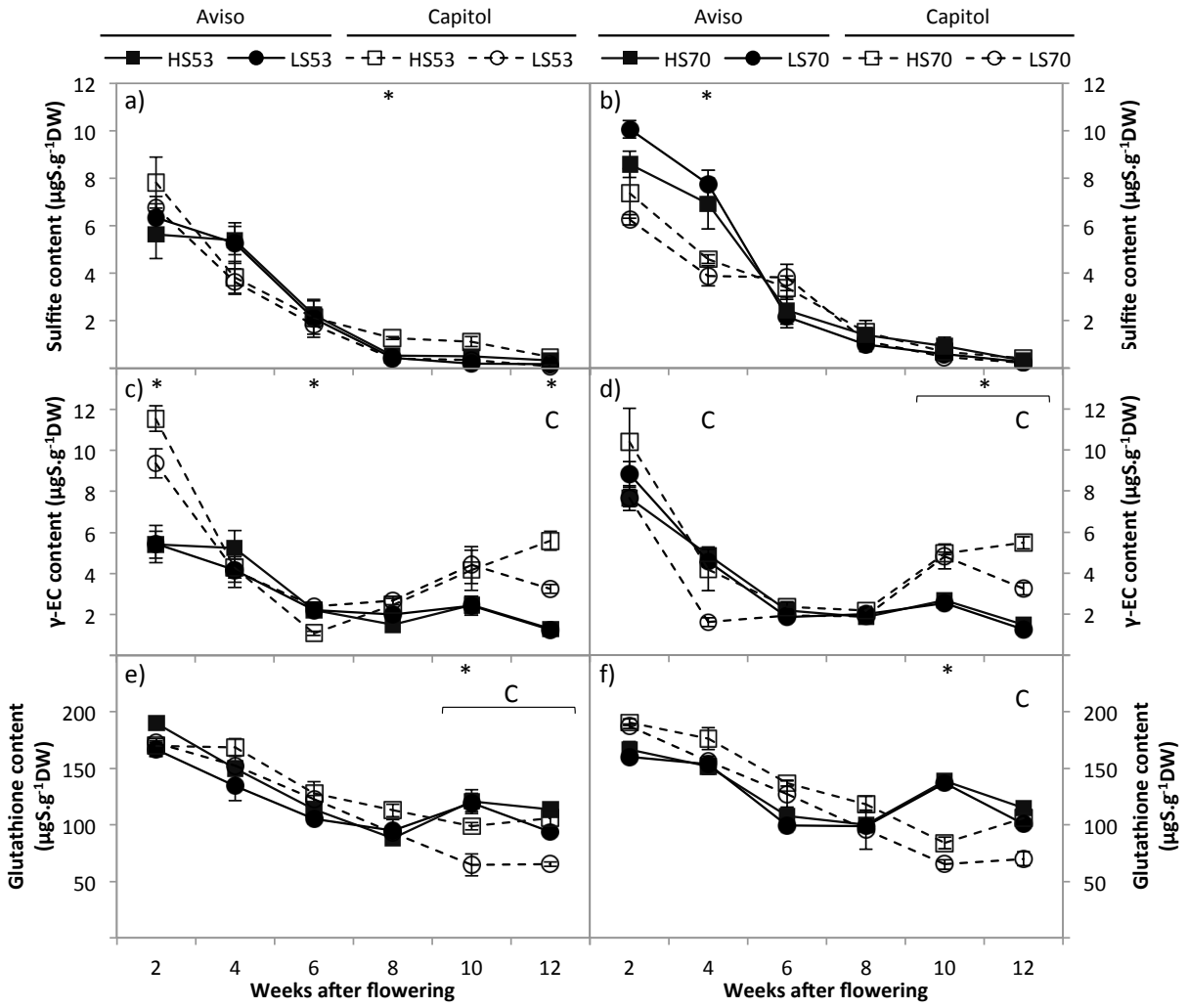


Figure VIB.S2 Evolution of sulphite (a and b), γ-glutamylcysteine (γ-EC, c and d) and glutathione (e and f) contents in Aviso (solid line and closed symbols) and Capitol (dotted line and open symbols) seeds in HS (squares) and LS (circles) conditions from 2 weeks after flowering until mature stage (12 weeks after flowering).

Values are given as the mean ±SE (n = 4). *: Significant differences between Aviso and Capitol in HS condition ($p \leq 0.05$). A: Significant differences between HS and LS condition for Aviso ($p < 0.05$). C: Significant differences between HS and LS condition for Capitol ($p < 0.05$).

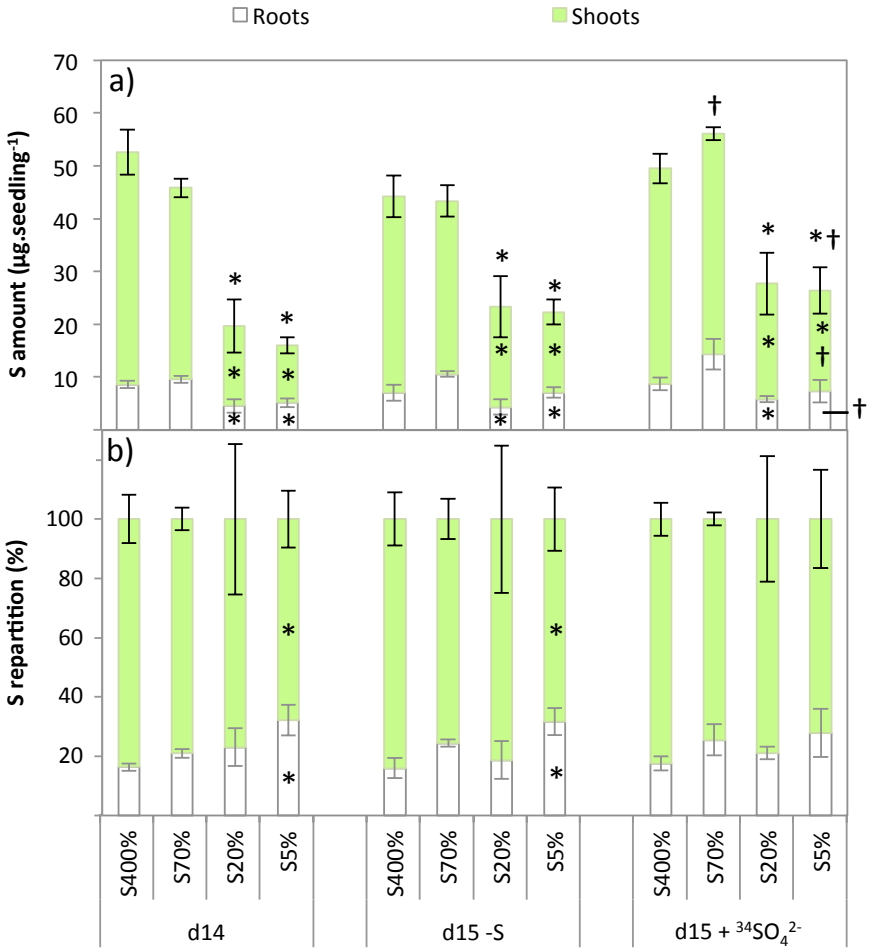


Figure VII.S1 S repartition (a) and S amount (b) of *Brassica napus* cv. Yudal seedlings, 14 days after sowing on water (d14) and after 24 h treatment of d14 seedlings with 508.7 µM $^{34}SO_4^{2-}$ at 5 atom% excess (d15 +$^{34}SO_4^{2-}$) and with 8.7 µM SO_4^{2-} (d15 -S).

Total S amounts in shoots and roots were determined by IRMS. Yudal seedlings were grown from seeds harvested on plants subjected to plethoric S nutrition (400% of plant S needs provided, S400% seeds) or subjected to a S limitation from the beginning of plant growth with 70%, 20% and 5% of plant S needs provided (S70%, S20% and S5% seeds respectively). Values correspond to means ± SE (*n* = 3). * Significant difference from the value of S400% seedlings ($p < 0.05$). † Significant difference from the value at d14 ($p < 0.05$).

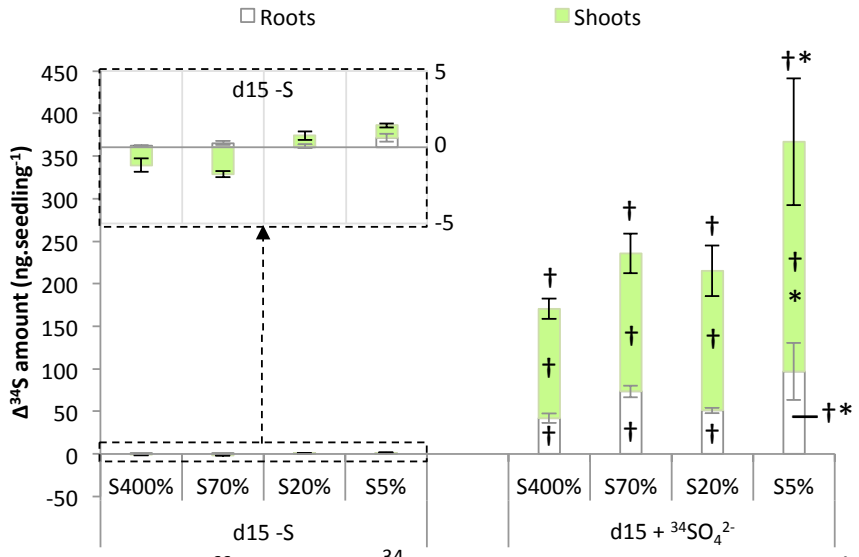


Figure VII.S2 Differences in ^{34}S amount in excess in roots and shoots of oilseed rape seedlings (cv. Yudal) between d14 and d15 -S and between d14 and d15 $+^{34}SO_4^{2-}$.

Values correspond to means ± SE (n = 3). Yudal seedlings were grown from seeds harvested on plants subjected to plethoric S nutrition (400% of plant S needs provided, S400% seeds) or subjected to a S limitation from the beginning of plant growth with 70%, 20% and 5% of plant S needs provided (S70%, S20% and S5% seeds respectively). † Significant difference from the d15 -S value ($p < 0.05$). * Significant difference from the value of S400% seedlings ($p < 0.05$).

Annexe 2

Acte de congrès rédigé pour le « 13th Rapeseed Congress », du 5 au 9 juin 2013 à Prague, République Tchèque. (Présentation d'un poster)

13th International Rapeseed Congress June 5–9, 2011, Prague, Czech Republic

www.irc2011.org

Leaf proteome of rapeseed subjected to sulphur restriction reveals numerous changes in proteins related to sulphur, carbon metabolisms and oxidative stress.

D'Hooghe P., Escamez S., Trouverie J., Ségura R., Bataillé M-P., Bonnefoy J., Ameline A-F., Avice J. C.

UMR INRA/UCBN 950, Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions NCS (EVA). IBFA, Esplanade de la Paix, Université de Caen Basse Normandie, F-14032 CAEN, France. philippe.dhooghe@live.fr

Abstract

To identify the different metabolic processes involved in the tolerance of rapeseed to S restriction, oilseed rape was subjected to a sulphate restriction (Low S) for 35 days. Young leaves of S restricted plants shown morphological deficiency symptoms such as a higher anthocyanins content and a lower photosynthetic activity compared to the control. The analysis of young leaf proteome at Day 35 indicated that S and C metabolisms were affected by S limitation. This disruption leads to an increase in intercellular CO_2 concentration, associated with the induction of a β-carbonic anhydrase, which may facilitate its solubilization. Moreover, if S depletion occurred, those metabolic changes may lead to an oxidative stress, correlated by the induction of stress tolerance proteins such as BnD22, a Water Soluble Chlorophyll binding Protein which presents a dual function of protection of chlorophyll against ROS and a protease inhibitor activity.

Introduction

Sulphate (SO_4^{2-}) is the main form of sulphur (S) absorbed by plants and is assimilated into many compounds, such as cysteine, methionine, glutathione and secondary metabolites with various functions in plant metabolism (Leustek & Saito, 1999). The decline of industrial SO_2 rejections leads to a SO_4^{2-} depletion in soil, which impacts on both grain yield and oil quality of rapeseed (Brassica napus L.; Dubousset et al., 2010). Recent transcriptomic and metabolomic approaches have shown that alterations in expression levels of numerous genes associated with metabolic and physiological changes allow Arabidopsis thaliana to respond to S deficiency ((Hirai & Saito, 2004; Nikiforova et al., 2005). S limitation first involves a decrease in cysteine and an increase of its precursor, O-acetylserine (OAS). OAS accumulation is then assumed to regulate numerous genes expression such as genes implied in S uptake, assimilation and redistribution which are induced, improving S acquisition and utilization for plant growth. Rapeseed is also able to enhance S remobilization to sustain the S demand for growth through the induction of some sulphate transporters (Parmar et al., 2007) (Dubousset et al., 2009, 2010). Nevertheless, extended S limitation leads to an accumulation of amino acids, which seems to down-regulate nitrogen uptake and assimilation. In the same time, processes that increase the turnover of organic S and stress defence responses are induced. When it goes on, S limitation is assumed to repress growth and reduce the shoot:root ratio (for review see Hawkesford & Kok, 2006).

The decrease in cysteine and methionine content by S restriction could have an impact on the expression of essential proteins. This may lead to differences between transcriptomic and proteomic profiles as observed by Higashi et al. (2006). Therefore, the study of S limitation impacts on proteome should be a relevant approach to identify the metabolic pathways affected, since it integrates both transcriptional and post-transcriptional controls. In this context, our goal was to combine proteomic and physiological studies in order to provide new insights about the rapeseed responses and in particular the leaf metabolism modifications caused by a long-term S depletion occurring at the vegetative stage.

Materials and methods

After 55 d of growth under greenhouse conditions (16h/20°C-day and 8h/15°C-night, 400 µmoles photons $m^{-2}.s^{-1}$), Brassica napus L. (cv Capitol) plants were supplied with 500 µM (Control) or 8.7 µM (Low S) of $MgSO_4$ during 35 d. Control and Low S plants were sampled in quadruplicate at Day 0 and after 14, 21, 28 and 35 d of treatment. The relative chlorophylls and anthocyanins amounts were measured each week by the Multiplex ® system (Force A, Orsay, France). Photosynthetic activity and transpiration were measured from Day 28 with a LI-6400 portable system (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA). Extraction of total proteins from leaf #16, 2-DE gels and protein identification by ESI-LC-MS/MS were performed according to protocols described by Desclos et al. (2008).

Results and Discussion

Growth and physiological modifications induced by S deprivation

Global shoot biomass is not significantly affected by Low S treatment (data not shown). This is consistent with studies conducted in B. oleracea (Koralewska et al., 2007, 2009) and oilseed rape (Dubousset et al., 2009). In these studies, the chlorophyll content of young leaves decreased in Low S plants, an observation not found in our experiment. Nevertheless, in young leaf (rank #16), a higher relative anthocyanins content and a lower photosynthetic activity, associated with a higher intercellular CO_2 concentration were measured after 35 d in Low S plants compared to control (Figs. 1A and 1B). These are signs of metabolic changes.

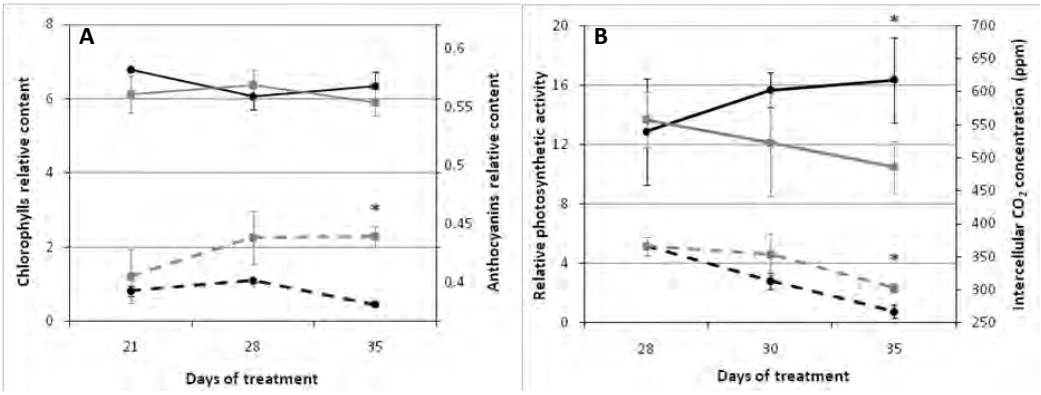


Figure 1: Chlorophylls (continuous lines) and anthocyanins (dotted lines) relative contents (**A**) and photosynthetic activity (continuous lines) and intercellular CO_2 concentration (dotted lines) (**B**) in the leaf rank #16 of control (Black) and S-restricted plants (Low S; Grey) after 21, 28, 30 or 35 d of treatment. Vertical bars indicate ± SE of the mean for n=3 and fit within the plot if not visible. *: Significant difference at $p \leq 0.05$.

Low S nutrition affects the proteome of young leaf (leaf rank #16)

At Day 35, in leaf #16, the total protein content was not significantly different between Control and Low S treatments (data not shown). Nevertheless, 2-DE analysis revealed 19 and 17 spots, respectively induced and repressed by Low S treatment, compared to the control. Using LC-MS / MS, 22 spots were clearly identified (Table I).

Proteomics changes associated to S metabolism

Induction of the putative Myrosinase-binding protein (spot no. 19) could provide S from glucosinolates degradation, suggesting that glucosinolates can be a S storage source in case of S deficiency. This finding is consistent with metabolome analysis performed in Arabidopsis thaliana that reported a decrease in glucosinolates accumulation for S restricted plants (Hirai & Saito, 2004). The slight induction observed for a vacuolar ATPase subunit (spot no. 22), could be implied in the induction of S remobilization through the induction of the sulphate efflux from the vacuole to sustain growth as previously described by Dubousset et al. (2009).

The THI1 (spot no. 4) repression may lead to a preferential allocation of cysteine for protein and GSH synthesis since this protein is involved in the chloroplastic thiamine biosynthesis (Machado et al., 1996) from glyceraldehyde-3-phosphate and cysteine, two molecules whose levels are affected by S limitation (Nikiforova et al., 2005). The Glutathione S-transferase (spot no. 1) repression indicates that the xenobiotics detoxification capacity in leaf #16 seems to be affected at 35 d of S restriction. As a consequence, the young leaf could be sensitive to abiotic stress (Ryu et al., 2009).

Table I: LC-MS/MS identification of protein repressed (negative value of variation) and induced (positive value of variation) in leaf #16 after 35 d of S restriction (Low S) compared to Control plants. Significant ANOVA was followed by a Tukey test (p≤0.05) carried out on the leaf-normalised spot volumes. Experimental and theoretical pI/Mr are also indicated. The assigned best-matched protein and its GenBank accession number are listed.

Spot No.	Factor of variation	Experimental pI / Mr	Theorical pI / Mr	Protein name / Species	NCBI Accession number
1	-1.42	6.5 / 24	8.5 / 59.1	Glutathione S-transferase / Brassica oleracea	gil171921127
2	-1.31	5.6 / 21	5.8 / 26.3	Photosystem I light-harvesting chlorophyll a / b-binding protein / Nicotiana tabacum	gil493723
3	-1.38	6.7 / 33	8.6 / 38.8	Contains similarity to ferredoxin-NADP+ reductase from Arabidopsis thaliana gblAJ243705 and contains ar oxidoreductase FAD / NAD-binding PFI00175 domain Arabidopsis thaliana	gil8778996
4	-1.8	5.5 / 31	5.8 / 36.6	THI1; protein homodimerization / Arabidopsis thaliana	gil15239735
5	-1.3	5.5 / 65	5.3 / 55.2	Mitochondrial chaperonin (HSP60) / Arabidopsis thaliana	gil2924773
6	-1.28	6.4 / 35	8.5 / 42.3	Malate dehydrogenase / Brassica rapa subsp. Pekinensis	gil207667274
7	-1.51	5.8 / 19	6.8 / 21.8	Germin-like protein / Arabidopsis thaliana	gil1755154
8	-1.43	6.2 / 19	6.8 / 21.8	Germin-like protein / Arabidopsis thaliana	gil1755154
9	-1.35	6.2 / 20	6.8 / 21.8	Germin-like protein / Arabidopsis thaliana	gil1755154
10	-1.45	6.8 / 30	6.2 / 27.5	Chain B, The Transient Complex Of Poplar Plastocyanin With Turnip Cytochrome F Determined With Paramagnetic Nmr / Brassica rapa	gil67463833
11	-1.36	5.5 / 29	5.3 / 26.3	AT2G37660 / Arabidopsis thaliana	gil227204455
12	-1.55	6.8 / 35	8.5 / 35.8	Mitochondrial malate dehydrogenase (NAD) / Arabidopsis thaliana	gil18404382
13	+11.51	6.3 / 19	8.4 / 23.5	Heat stress-induced protein / Brassica oleracea var. capitata	gil3319646
14	+3.08	5.3 / 20	5.1 / 23.3	Trypsin inhibitor propeptide / Brassica oleracea	gil841208
15	+5.27	5.7 / 19	7.8 / 22.7	Water-soluble chlorophyll protein / Brassica oleracea var. acephala	gil27530881
16	+2.92	5.4 / 59	5.1 / 55.3	ATP synthase CF1 alpha subunit / Brassica napus	gil262400756
17	+7.86	6.6 / 29	6.5 / 28.8	BCA3 (ß CARBONIC ANHYDRASE 4); carbonate dehydratase / zinc ion binding / Arabidopsis thaliana	gil15220853
18	+1.49	6.1 / 17	6.7 / 21.8	Cu-Zn Superoxide dismutase / Arabidopsis thaliana	gil3273753
19	+2.29	5.2 / 49	5.4 / 20.6	Putative myrosinase-binding protein 3 / Brassica rapa subsp. Pekinensis	gil33285912
20	+2.3	5.7 / 43	6.3 / 40.9	12-oxophytodienoate reductase / Arabidopsis thaliana	gil2765083
21	+1.86	5.4 / 51	7.6 / 48.7	Aminotransferase class I and II family protein / Arabidopsis thaliana	gil15217440
22	+1.32	5.2 / 57	5 / 54.7	Nucleotide-binding subunit of vacuolar ATPase / Arabidopsis thaliana	gil166627

Proteomics changes associated to C metabolism and protection against oxidative stress

The carbon metabolism appears to be affected by 35 d of S limitation, particularly the photosynthetic metabolism, that leads to a C fixation decline (Fig. 1B), and a higher intercellular CO_2 concentration. At the proteomic level, these disruptions are corroborated by the modulation of numerous proteins, such as the repression of a putative FNR (spot no. 3) and a chloroplast MDH (spot no. 6). The repression of the latter may indicate a relative reduction of malate export (Minárik et al., 2002). Nevertheless, this proteomic analysis also shows an induction of proteins implied in maintaining energy production in the young leaf subjected to Low S treatment, such as the ATP synthase α-subunit (spot no. 16) and BnD22 (Water-Soluble Chlorophyll binding Protein, spot no. 15), involved in chlorophyll protection against ROS and in maintenance of protein content (Desclos et al., 2008). Indeed, chlorophyll and protein contents are not affected by the S limitation applied in our study. The reduction of photosynthetic activity and the proteins modulations discussed above suggest an alteration of the coupling between light and dark photosynthesis reactions, which could lead to an accumulation of CO_2 at the cellular level. This

accumulation was measured at the intercellular level in our study. The β-Carbonic anhydrase (spot no. 17) which is directly involved in CO_2 metabolism, associated with the Calvin cycle (Jebanathirajah & Coleman, 1998), found strongly induced in our study, could then facilitate the CO_2 solubilisation and thus promote its fixation during the dark photosynthesis reactions.

This alteration of photosynthetic processes could also lead to the formation of ROS, such as $O_2^{\cdot-}$ by the Mehler reaction. The induction of the chloroplastic Cu-Zn SOD (spot no. 18) also suggests that S limitation causes an oxidative stress in the young leaf. This protein could then convert this toxic superoxide anion into H_2O_2. The induction of BnD22, and the repression of protein showing similarity with Germin-like proteins (spots no. 7, 8 and 9), which could have an oxalate oxydase activity generating H_2O_2 and CO_2, may also be involved in reducing oxidative stress. The higher anthocyanins content observed in the leaf #16 also suggests an induction of processes associated with oxidative stress protection after 35 d of S limitation.

In addition to its impact on S metabolism, THI1 repression could have a negative impact on C metabolism, whether on glycolysis/neoglucogenesis or on chlorophyll synthesis. Indeed, thiamine, a S containing molecule, is the precursor of thiamine pyrophosphate, a co-enzyme involved in C metabolism such as Pyruvate carboxylase, Pyruvate oxidase or Transketolase activities (Lindqvist & Schneider, 1993). This repression could cause chlorosis and mitochondrial DNA damage if S restriction is extended beyond 35 d, since this protein is also involved in mitochondrial DNA damage tolerance (Machado et al., 1996).

Proteomics changes associated with others metabolisms:

As for THI1, the repression of HSP60 (spot no. 5) is a sign of a mitochondrial stress caused by Low S. According to the Arabidopsis thaliana transcriptome response to S restriction (Hirai et al., 2003; Hirai & Saito, 2004), our proteomic study showed an induction of 12-oxophytodienoate reductase (spot no. 20), that catalyzes the last step of jasmonate biosynthesis. Jasmonate could have a positive effect on S metabolism in case of S limitation, through the induction of many genes, as suggested by the work of Jost et al. (2005), but could result, ultimately, to the death of cells expressing this phytohormone, particularly via the induction of an oxidative stress.

References

1. Desclos, M., et al., (2008) Plant Physiology **147**, 1830–1844.
2. Dubousset, L., et al., (2009) Journal of Experimental Botany **60**, 3239–3253.
3. Dubousset, L., et al., (2010) Journal of Experimental Botany **61**, 4313–4324.
4. Hawkesford, M. J. & Kok, L. J. D. (2006) Plant, Cell and Environment **29**, 382–395.
5. Higashi, Y., et al., (2006) The Plant Journal **48**, 557–571.
6. Hirai, M. Y., et al., (2003) The Plant Journal **33**, 651–663.
7. Hirai, M. Y. & Saito, K. (2004) Journal of Experimental Botany **55**, 1871–1879.
8. Jebanathirajah, J. A. & Coleman, J. R. (1998) Planta **204**, 177–182.
9. Jost, R., et al., (2005) Photosynthesis Research **86**, 491–508.
10. Koralewska, A., et al., (2009) Journal of Plant Physiology **166**, 168–179.
11. Koralewska, A., et al., (2007) Plant Biology **9**, 654–661.
12. Leustek, T. & Saito, K. (1999) Plant Physiology **120**, 637–643.
13. Lindqvist, Y. & Schneider, G. (1993) Current Opinion in Structural Biology **3**, 896–901.
14. Machado, C. R., et al., (1996) Plant Molecular Biology **31**, 585–593.
15. Minárik, P., et al., (2002) General Physiology and Biophysics **21**, 257–265.
16. Nikiforova, et al., (2005) Plant Physiology **138**, 304–318.
17. Parmar, S., et al., (2007) Plant Biology **9**, 647–653.
18. Ryu, H. Y., et al., (2009) Biochemical and Biophysical Research Communications **379**, 417–422.

Annexe 3

Acte de congrès rédigé pour le « 4th Sulphyton Workshop », du 5 au 8 septembre 2013 à Athènes, Grèce (Communication orale)

Alterations of seed yield and quality in sulphur-limited *Brassica napus* L.

Philippe D'Hooghe[1,2,3], Lucie Dubousset[1,2,3], Karine Gallardo[4], Stanislav Kopriva[5], Jean-Christophe Avice[1,2,3], Jacques Trouverie[1,2,3]*.

[1]Normandie Univ, France
[2]UNICAEN, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France
[3]INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France
[4]INRA, UMR1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France.
[5]John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich, NR4 7UH, UK.

* jacques.trouverie@unicaen.fr

Sulphur (S) limitation reduces seed yield and quality of various crops such as cereals, mainly used for producing flour, or oilseed rape, a high S demanding plant cultivated for its nutritional value for animal and human feeding. In this work, we describe the impacts of S restriction applied at the bolting (LS32), early flowering (LS53) or start of pod filling (LS70) stages on *Brassica napus* seed composition. For this purpose, lipids were analysed by Near-infrared spectroscopy and two-dimensional electrophoresis were performed on total proteins extracted from mature seeds. The major S compounds of mature seeds were also determined. The reduction of protein quality observed for all LS seeds was related to a reduction of S-rich seed storage protein (SSP) accumulation (as Cruciferin Cru4) at benefit of S-poor SSP (as Cruciferin BnC1). Through this adaptive response, the protein contents of LS70 and LS53 seeds were not affected, but it was reduced for LS32 seeds. The reduction of lipid content in LS53 and LS32 seeds was primarily associated with a reduction of C18 derivates. The ω6/ω3 ratio was increased in LS53 and LS32 seeds. Modulations of proteins associated with lipid storage and carbohydrate metabolism (reduction of caleosines, glyoxysomal malate synthase, thiazole biosynthetic enzyme THI1; accumulation of citrate synthase) could be involved in the alteration of lipid composition of LS53 and LS32 seeds. The accumulation of proteins associated with stress response and a lower level of glutathione in LS53 and LS32 seeds may decrease seed resistance to biotic/abiotic stresses during conservation and germination.

D'HOOGHE Philippe **2013**
Thèse de l'Université de Caen Basse-Normandie
École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement
UMR INRA-UCBN 950 EVA (Écophysiologie Végétale Agronomie et nutrition N, C, S).
Spécialité : Biologie Animale et Végétale

Titre : Impacts de la disponibilité en sulfate sur la physiologie de la feuille et sur la qualité, le métabolisme soufré et la germination de la graine de colza (*Brassica napus* L.)

Résumé :
Le colza est une oléagineuse très exigeante en soufre (S). L'étude des impacts de limitations en S sur la physiologie du colza et sa qualité grainière revêt un intérêt majeur dans un contexte de baisse des dépôts atmosphériques entrainant un appauvrissement des sols en S. Les objectifs étaient donc d'étudier l'incidence d'une limitation en S sur la physiologie de jeunes feuilles, et sur la qualité, le métabolisme soufré et la vigueur germinative des graines.
L'analyse physiologique (photosynthèse, flux de S par utilisation de traceur ^{34}S-sulfate), protéomique et biochimique (métabolites S, espèces réactives de l'O_2) a démontré qu'une limitation en S provoque des perturbations du métabolisme carboné et soufré de la feuille et de la graine, pouvant affecter la qualité grainière. Ainsi, une restriction en S au stade rosette se traduit par la chute de l'activité photosynthétique des jeunes feuilles et conduit à un stress oxydatif. Des restrictions en S à différents stades reproducteurs altèrent la qualité protéique et lipidique de la graine aboutissant à une accumulation amoindrie des acides oléique, linoléique, linolénique et des protéines de stockage (SSPs) riches en S. Une accumulation accrue de SSPs pauvres en S permet un maintien de la teneur en protéines de la graine en cas de restriction survenant en fin de cycle. L'accumulation de S dans les protéines de la graine apparaît principalement contrôlée par la synthèse protéique. La vigueur germinative des graines produites est réduite en cas de restriction précoce en S. Ces travaux ont également permis de démontrer que le péricarpe et la graine en développement sont capables d'assimiler le sulfate par la voie réductrice.

Mot clés : Physiologie végétale, Plantes -- nutrition, Plantes -- effets du soufre, Colza, Feuilles, Graines de colza, Protéomique végétale, Aliments -- qualité.

Title: Impacts of sulphate availability on leaf physiology and quality, sulphur metabolism and germination of seeds in oilseed rape (*Brassica napus* L.)

Abstract :
Oilseed rape is a high sulphur (S) demanding crop. Study the impacts of S limitations on oilseed rape physiology and seed quality is a major issue in a context of declining S atmospheric depositions on soil. The objectives were therefore to study the impact of S limitation on the physiology of young leaves, and on quality, sulphur metabolism and germination vigour of seeds.
The physiological (photosynthesis, S flows using ^{34}S labelling), proteomics and biochemical (S metabolites, reactive oxygen species) analyses showed that S limitation leads to disturbances of carbon and sulphur metabolisms in leaf and seeds, which may affect seed quality. An S restriction applied at vegetative stage results in a lower photosynthetic activity of young leaves and leads to oxidative stress. S restrictions applied at different reproductive stages reduce seed protein and lipid quality resulting in a lower accumulation of oleic, linoleic, linolenic acids and of S-rich seed storage proteins (SSPs). A higher accumulation of S-poor SSPs allows maintenance of the seed protein content if S restriction occurs at the end of the plant growth cycle. S accumulation in seed proteins appears mainly controlled by protein synthesis. Early S restriction leads to reduce seed germination capacity and vigour. These studies have also demonstrated that developing seeds and pod walls are able to assimilate sulphate by the reductive pathway.

Key words: Plant physiology, Crops -- nutrition, Plants -- effect of sulphur on, Rape, Leaves, Rapeseed, Plants proteomics, Food -- quality.