HAL
open science

Optimisation de la fertilisation soufrée pour améliorer le rendement et la qualité grainière du colza : impacts des interactions Soufre/Azote et du changement climatique, identifications d'idéotypes.

Emilie Poisson

▶ **To cite this version:**

Emilie Poisson. Optimisation de la fertilisation soufrée pour améliorer le rendement et la qualité grainière du colza : impacts des interactions Soufre/Azote et du changement climatique, identifications d'idéotypes.. Sciences agricoles. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMC264 . tel-02155831v1

HAL Id: tel-02155831

https://theses.hal.science/tel-02155831v1

Submitted on 14 Jun 2019 (v1), last revised 17 Jun 2019 (v2)

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.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES AGRONOMIQUES, BIOTECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Optimisation de la fertilisation soufrée pour améliorer le rendement et la qualité grainière du colza: impacts des interactions Soufre/Azote et du changement climatique, identifications d'idéotypes.

Présentée et soutenue par
Emilie POISSON

Thèse soutenue publiquement le 13/12/2018 devant le jury composé de		
M. OLIVIER LEPRINCE	Professeur des universités, AGROCAMPUS OUEST	Rapporteur du jury
M. CHRISTOPHE NGUYEN	Directeur de recherche à l'INRA, INRA Centre de Bordeaux Aquitaines	Rapporteur du jury
Mme SOPHIE BRUNEL-MUGUET	Chargé de recherche à l'INRA, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Membre du jury
M. FABIEN CHARDON	Chargé de recherche HDR, INRA de Versailles	Membre du jury
Mme MARIE-PASCALE PRUD'HOMME	Professeur des universités, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Président du jury
M. JEAN-CHRISTOPHE AVICE	Professeur des universités, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Directeur de thèse

Thèse dirigée par JEAN-CHRISTOPHE AVICE, Écophysiologie végétale, agronomie et nutritions N.C.S. (Caen)

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N,C,S

Remerciements

Voilà, c'est fini… ces trois années (et quelques semaines) de thèse sont sur le point de s'achever. En écrivant cette phrase, je ne m'en rends pas encore vraiment compte. Si j'ajoute à cela mes mois de stages de licence 3, de master 1 et de master 2 effectués au sein du laboratoire EVA, cela fait 5 ans que je baigne dedans (ce qui tombe plutôt bien pour un Poisson). Ces années et ce travail de thèse furent pour moi riches d'émotions, de rencontres et de collaborations. Je tiens donc à remercier toutes les personnes ayant participé, de près ou de loin, à cet épisode de ma vie.

En premier lieu, je remercie Marie-Pascale Prud'homme et Philippe Laîné, directrice et directeur adjoint de l'UMR 950 INRA-UCN EVA, pour m'avoir accueillie en son sein au cours de ces 5 dernières années. Le laboratoire EVA a la chance d'avoir une équipe de direction de qualité, engagée et passionnée (et puis c'est bien connu, tout le monde suit la direction, ça tient la route !). Marie-Pascale, un merci spécial pour votre gentillesse, votre perpétuel optimisme et vos cours de physiologie végétale tellement intéressants et passionnants (rien ne vaut les schémas dessinés au tableau à la craie !). Philippe, merci pour votre gentillesse et pour votre merveilleux gigantesque crumble aux pommes, je suis certaine que toute personne quittant le laboratoire en rêve encore parfois.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'examiner ce mémoire. Je suis très honorée qu'Olivier Leprince et Christophe Nguyen aient accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie pareillement Fabien Chardon et Marie-Pascale Prud'homme d'avoir accepté d'être examinateur et examinatrice de ce travail de thèse.

Je remercie la SAS PIVERT pour le financement de cette thèse, incluant le financement de mes nombreux déplacements notamment vers la Bourgogne mais également vers des contrées plus lointaines (seulement 15 000 km) afin d'avoir l'opportunité de participer à des congrès internationaux. Merci à l'école doctorale NBISE pour l'aide financière accordée lors de ma participation au congrès Brassica 2016 à Melbourne (Australie). Je n'oublierai jamais ce voyage fantastique…

Je continue mes remerciements à l'encontre de la SAS PIVERT et plus particulièrement à Cécile Armiel pour ses nombreux conseils RH, à tous les membres du projet POLYGONE notamment Jérôme Le Nôtre et Célia Pontet pour la coordination des nombreux COPIL et son aide imbattable en statistique. Je remercie également Terres Inovia et Dijon céréales (François Lévêque, Amandine Kihm et Vincent Vaccari) pour leur collaboration, m'ayant permis de mener des études au champ, ou de récupérer différents lots de graines de colza.

Il est temps à présent de remercier mes trois formidables encadrants de thèse (bien que deux parmi eux ne soient pas mes « officiels »… !). À tous les trois, je vous adresse mes plus sincères remerciements. Je souhaite souligner votre parfaite collaboration et complémentarité, car même si de premier abord avoir trois encadrants peut paraître « anarchique », ma thèse par sa dualité a rendu cette collaboration plus que positive. De plus, je suis convaincue que partager avec d'autres ses réflexions scientifiques permet d'ouvrir son esprit, de trouver de nouvelles idées et d'aller plus loin. Merci à tous les trois pour les nombreux trajets vers Dijon, en train ou dans le coffre de la

camionnette, toujours entrepris dans la joie et la bonne humeur malgré le dur labeur qui nous attendait au champ ou dans la serre (jusqu'à très tard dans la nuit). Et puis rien de mieux qu'une cassette de Françoise Hardy pour se redonner un petit coup de pêche pour les 6 heures de trajet retour, n'est-ce pas Jacques ? En cette fin de thèse, un grand merci pour vos nombreuses corrections (merci aussi Google drive, qui simplifie les corrections à 4 mains, même si nous avons pu dire adieu à quelques commentaires). Merci pour la confiance que vous m'avez accordée dès mon stage de Master 2 (où votre trio de choc m'encadrait déjà), en me permettant de continuer en thèse avec vous. Je pense sincèrement que j'ai eu énormément de chance de vous avoir en tant qu'encadrants, autant d'un point de vue professionnel que personnel.

Jean-Christophe, merci infiniment pour ces 5 années d'encadrement. On peut le dire, tu as été en quelque sorte mon « gourou » (quel Poisson n'a pas entendu parler de M. Avice ?). Merci également pour la qualité de tes enseignements, confirmant mon choix de poursuivre mes études vers le côté obscur des végétaux (ou le monde merveilleux des plantes si vous préférez). Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité (oui oui, malgré tes nombreuses heures de cours, ton implication dans une ribambelle de projets, l'encadrement de 6 thésards et étudiants…), ta rigueur et passion scientifique et ton perpétuel enthousiasme, qui m'impressionneront toujours. Jacques, merci également pour ta gentillesse et ta bienveillance, ton aide toujours volontaire lors des nombreuses récoltes, ta maîtrise de la typographie française (qui a son utilité, tout à fait), ta bonne humeur et ton humour. Tu as toujours été de bon conseil tout au long de ma thèse. J'espère que ton travail d'encadrement sera très prochainement (officiellement) reconnu (je ne veux pas te mettre la pression, non). Tu le mérites amplement. Sophie, la reine du cannelé, je ne sais par où commencer ! Tout d'abord, un énorme merci pour ton encadrement que j'ai énormément apprécié. Tu es une excellente chercheuse, force de proposition, des idées plein la tête, une vraie passionnée ! Merci pour nos petits « points Sophie » comme je les appelais qui me re-motivaient comme jamais, nos prises de têtes sur le modèle (heureusement, notre Dieu Alain était là), ton implication pour me faire participer à de nombreux congrès (même si vous me laissiez y aller seule, sniff… Mais l'expérience est d'autant plus enrichissante !), les rendez-vous RH privés au RU… Grâce à toi, j'ai aussi énormément progressé à l'écrit et à l'oral, et même en orthographe (« envoie » et non « envois »). Merci également pour ta gentillesse, ton écoute, ton énergie, ta folie et pour les innombrables franches rigolades que l'on a pu partager. Il faut dire que tu es très bon public face à mes pitreries ! Je pourrais continuer encore longtemps… Merci pour tout ! Et « Stay in touch » comme on dit !

Un immense merci à Alain Mollier, notre Dieu de la programmation avec R, pour avoir énormément contribué à cette thèse, notamment au niveau des programmes utilisés pour les simulations et les analyses de sensibilité. Sans toi, tout ce travail n'aurait pas été possible (du moins, pas aussi bien !). Merci également pour ta gentillesse et ta disponibilité, c'était un réel plaisir de travailler avec toi.

Je remercie Isabelle Mussio et Juliette Fauchot pour leurs conseils, leur aide et leur gentillesse lors de mon année d'enseignement en TP et TD de biologie végétale de Licence 1, qui fût une super expérience afin de développer son assurance en public et de tester ses aptitudes à l'enseignement. Merci également à mes collègues doctorantes enseignantes (girl power), Cylia, Aurore et Maëva pour l'entraide et le remplacement d'heure de cours pour dépanner.

Je tiens à remercier la plateforme PPHD de Dijon d'avoir accueilli ma culture de colza, et notamment Christophe Salon, Céline Bernard, Julien Martinet, Karine Palavioux et Jean-Yves Draoulec qui s'occupaient de la culture sur place. Un grand merci à toutes les personnes qui sont venues m'aider lors des récoltes au champ ou du transport des plantes entre Caen et Dijon, tout spécialement à Anne-Françoise, Patrick, Jacques, Jean-Christophe, Sophie, Dominique, Ayanlé et Jean-Yves Draoulec. Merci Dominique d'avoir mis au point le super portant afin de transporter tous les colzas vers Dijon sans les casser. Merci à Solenne Berardocco de l'UMR 1349 IGEPP de Rennes pour son aide pour les analyses d'acides gras des graines de colza.

Mes remerciements vont à toutes les personnes du laboratoire EVA, tout d'abord pour la bonne humeur générale qui y règne la plupart du temps, permettant de travailler dans la joie et la bonne humeur ! La salle café, lieu de toutes les rencontres, des mots fléchés du midi, de la pause de 16h pile, des gâteaux d'anniversaires… Merci tout le monde ! Merci infiniment à Anne-Françoise pour la mise en place de ma culture en serre, la gestion de la vernalisation en deux temps, les aides lors des trajets vers Dijon pour l'installation de la culture, les récoltes… Merci également pour tes passages dans notre bureau afin de nous booster, de nous re-motiver et surtout de sauver les plantes qui s'y trouvaient…! Merci à toutes les personnes qui ont participé à mes nombreuses récoltes en serre ou au champ : Patrick (le roi des racines), Josiane, Magali, Anne-Françoise, Aurélia, Jacques, Jean-Christophe, Sophie, Jéhanne, Olivier, Fanny, Jean-Bernard, Annette, Philippe E., Servane, Frédérine, Bénédicte, Josette, Jean-Yves, Emmanuelle, Maxence, Cylia, Élise, Julie, Ayanlé, Yacine et les nombreux stagiaires de Licence 3. Merci à Yacine, Ayanlé, et Marion pour votre travail et votre collaboration lors des manips aux champs, pour l'exploitation des données et les nombreuses mesures XRF. Merci à Patrick pour les dépannages informatiques et les relevés en serre. Merci à Magali et Josiane pour les quantités impressionnantes de broyages réalisés avec finesse, à Bénédicte pour les nombreux broyages volumineux réalisés avec minutie. Merci Josette, qui micro-pèse plus vite que ton ombre, pour m'avoir laissé envahir ton bureau de cartons d'échantillons à analyser. Merci à l'équipe de PLATIN', Jéhanne, Fanny et Frédérine pour les analyses IRMS au top ! Merci à Sophie V. pour la gestion de la paperasse, et pour nous aider à partir vers des contrées lointaines ou à réserver une chambre à l'hôtel Ibis de la zone industrielle de Troyes. Merci infiniment à Cylia, Victor et Maxence pour votre aide à l'élaboration de ma liste d'abréviations… ! Merci pour le gain de temps ! Merci Servane pour tes explications statistiques, et J-B pour nos discussions musicales. Merci à tous les chercheurs, Alain, Philippe L., Philippe E., Sophie, Marie-Pascale, Servane, Annette, Jean-Bernard, Emmanuelle, Frédéric, Jacques, Sylvain, Jean-Christophe, Frédérique, pour toutes les discussions que l'on a pu avoir sur tout élément scientifique ou non scientifique, et jadis pour vos formidables cours reçus tout au long de mon cursus Universitaire Caennais.

Enfin, les doc'&'co. Je vais commencer par remercier mes pioupious avec qui j'ai passé l'intégralité de ma thèse (voir plus pour certaine !). Ce fut un plaisir de partager ces trois années avec vous, Cylia et Maxence ! J'ai particulièrement aimé assister de mon bureau à vos discussions très animées et assez amusantes, il faut le dire, sur de très vastes sujets tels que la religion, la thèse, le bar « le déserteur »… Merci Maxence, monsieur commère, pour tes nombreuses initiatives de barbecue et de verre en ville permettant de partager de bons moments tous ensemble, dans la joie et la bonne humeur (le temps d'oublier notre thèse !). Cylia, merci pour ta gentillesse et bravo à toi

pour cette thèse, car partir loin de chez soi n'est pas toujours évident ! J'espère que nous t'avons permis de passer cette thèse dans la joie et la bonne humeur ! Élise, notre écologue, nous finissons finalement nos thèses ensemble ! Tu as raison, nous sommes très attachants, on ne nous quitte pas aussi facilement. Merci à toi pour les discussions endiablées ou les batailles d'eau, principalement contre Maxence, qui sont toujours très divertissantes pour moi ! Une pensée et un merci à la team des anciens doctorants pour leur gentillesse et moments passés ensemble dont Marine, Vincent et mes trois doctorettes Élise, Thaïs et Caroline (ma clarinettiste préférée ! Merci l'orchestre universitaire !). Merci pour votre soutien les filles, en connaissance de cause ! Je suis contente d'avoir tissé et maintenu des liens d'amitié avec vous, et bientôt de rejoindre la team des docteurs en physiologie végétale ! J'étais très contente de finir ma thèse avec une ribambelle de nouvelles têtes, toutes aussi sympathiques les unes que les autres. Bon courage à Galatéa, Aurélien, Hanh et Mohamed, je crois en vous ! Bon courage à tous les vieux nouveaux doctorants : Charlotte, Victor et Hans et merci pour tous les bons moments passés ensemble (la ballade du RU, le café du midi, les sorties au bar…). J'espère que vous perpétuerez la bonne humeur entre doctorants ! Merci aussi, bien évidemment à Aurélia, Dame Lornac, pour sa gentillesse, les soirées risotto, les longues discussions sur tout et n'importe quoi… N'hésite pas à venir me faire un coucou à Paris, je serai ravie. Merci à l'ornais qui stop au bar, Antoine, pour ton humour aussi pourri que le mien, me permettant de me sentir moins seule (ou enfin comprise ?). Bon courage pour ton tri de sol, auquel je n'ai malheureusement jamais eu l'opportunité d'aider… Zut alors !

Merci à tous mes amis qui ont suivi et subi mes états d'âmes pendant 3 ans et les ont rendus plus agréables : Camille (Darling), Manon, Agathe, Marjolaine, Aimeline, Maxime, Éléonore, Louise, Julie, Benoît, Sébastien, Myrène, Anne-Laure… Merci aussi à l'orchestre universitaire d'avoir mis de la musique toutes les semaines dans ma vie, qui m'a permis de sortir ma flûte, de participer à de supers projets (Zénith de Caen !) et de faire la rencontre de personnes qui me sont maintenant chers. Merci aussi à mes professeurs d'alto, Estelle et Jean-Philippe. Aller à ces cours ou à l'orchestre n'était que pur plaisir, bien que quelquefois souffrance… !

Enfin, je remercie ma famille, toujours là pour me soutenir. Tout d'abord mes parents, qui se sont rencontrés lors de leurs études de biologie à l'Université de Caen (dingue, c'est un signe !). Merci pour l'intérêt que vous portez à la nature et que vous avez transmis à vos quatre enfants. Merci papa de t'émerveiller devant un liseron des sables, merci pour tes : « chut ! Écoute ! ?!... une bergeronnette grise ! » lorsque l'on entend un sifflement d'oiseau, de t'arrêter en plein milieu de la route afin de récolter des plantes pour tes cours de sciences de la vie et de la terre… Merci d'être dans la lune, merci d'être simple. Merci maman d'être en totale admiration devant un chêne ou un châtaignier (nos arbres préférés !), d'envoyer des messages avec environ dix points d'exclamation et dix cœurs multicolores à la fin de chaque phrase, de nous transmettre autant d'amour. Merci bien évidemment pour votre soutien infaillible et votre générosité. Je sais bien que je peux entièrement compter sur vous ! Merci à Marie, mon p'tit chouki, d'avoir été et d'être toujours là, même quand j'étais de mauvaise humeur et qu'il ne fallait pas me parler de ma thèse (moi ?! mauvais caractère ?? tssss)… ! Merci pour les soirées passées chez toi et Cédrichou quand ça n'allait pas, les conversations de 3h dans la voiture en revenant de la musique (ou pas… il fait froid au bout d'un moment), les rigolades… Merci ma gueule, Adrien, d'avoir passé quelques années à Caen et d'avoir eu à supporter ta sœur notamment lors des répétitions et des soirées au COUR. Par contre, je ne

vous remercie pas, Marie et Adrien, de m'avoir abandonnée pour ma dernière année de thèse en déménageant à Montpellier et en Vendée… !! Nos petits moments passés ensemble me manquent… (J'rigoooole, enfin tranquille.. ! ahah). Merci au petit bouchon, Julie, pour le soutien, et notamment pour avoir agrandi la famille. Trop de love !! Il me tarde de tous vous revoir. Ca y est, je crois que l'on va enfin pouvoir m'appeler docteur globule barjo pour de vrai... ! Je remercie aussi les Cappy : Isabelle, Marc, Renaud, Clémentine, merci pour votre gentillesse et votre soutien. On est de la même famille il paraît maintenant… !

À mon doux… Merci infiniment pour ton soutien. Ces quatre années à être séparés sont enfin sur le point de se terminer. Une nouvelle étape inconnue et tellement excitante nous tend les bras et j'y cours sans la moindre hésitation. Tellement de choses se sont déroulées en quatre ans. Merci de m'avoir accompagnée en Australie (ou plutôt remercie moi ahah). J'ai les yeux encore remplis d'étoiles en y repensant. Mon cœur lui se remplit d'amour jusqu'à exploser. J'ai bien envie de te piquer ta citation préférée : « C'était hier et c'est demain […], Aussi longtemps que tu voudras, Nous dormirons ensemble ».

Liste des abréviations

2P2M : Plateau de profilage métabolique et métabolique

A

AA : Acide aminé
ABA : Acide abscissique
ADP : Adénosine di-phosphate
AH : Adénosyl-homocystéinase
ANOVA : Analyse de Variance
APK : Adénosine 5'-phosphosulfate kinase
APR : Adénosine 5'-phosphosulfate reductase
APS : Adénosine 5'-phosphosulfate
APSIM : Agricultural Production Systems Simulator
At : Arabidopsis thaliana
ATP : Adénosine triphosphate
ATPS : ATP sulfurylase

B

BIA : Biopolymère interaction assemblage
BL : big leaf
Bn : *Brassica napus* L.
BSA : Bovine sérum albumin

C

C : Carbone
Ca : Calcium
CaO : Calcium oxide
CBL : Cystathionine β-lyase
CGS : Cystathionine γ-synthase
CH_3-SH : Méthyl captane
CIPAN : Culture intermédiaire piège à nitrate
CITEPA : Centre interprofessionnel technique d'études de la pollution atmosphérique
Cl : Chlore
CLT : Transporteur de thiol
CMIP : Projet d'intercomparaison des modèles couplés (Coupled model intercomparison project)
CO_2 : Dioxyde de carbone
CoA : Coenzyme A
COMIFER : Comité français d'étude et de développement de la fertilisation raisonnée
COS : Carbonyl de soufre
Cru : Cruciférines
Cys : Cystéine

D

DAP : Di ammonium phosphate des semences et plants
DMS : Dimethylsulfide
DMSP : Dimethylsulfopropianate

E

EA : Elementary analyzer
EAbS : Efficience d'absorption du soufre
EAS : Efficience d'assimilation du soufre
ELISA : Enzyme linked immuno sorbent assay
EPIC : Erosion-Productivity Impact Calculator
ERS : Efficience de remobilisation du soufre
ET : Ecart Type
EUS : Efficience d'usage du soufre
EUtA : Efficience d'utilisation de l'azote
EUtS : Efficience d'utilisation du soufre

F

FAs : Acides gras ou fatty acids

G

GA : Acide gibbérellique
GCL : Glutamate cystéine ligase
GES : Gaz à effet de serre

GGT : γ-glutamyltransférase
GIEC (IPCC) : Groupes d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (Intergovernmental panel on climate change)
Glc : Glucose
Gln : Glutamine
Glu : Acide glutamique ou glutamate
GMC : modèles couplés océan-atmosphère de circulation générale (Global coupled ocean-atmosphere general circulation models)
GNIS : Groupement national interprofessionnel
GS : Glutamine synthétase
GS : Growth Stage
GSA : Global Sensitivity Analysis
GSiX : Glutathion conjugué
GSH : Glutathion réduit
GSHS : Glutathion synthétase
GSSG : Glutathion oxydé
GST : Glutathion S-transférase
γ-EC : γ-glutamylcystéine
γECS : γ-EC synthétase

H

H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
H_2S : Hydrogène sulfuré
Hcy : homocystéine
HN : High nitrogen
HS : High sulfur
HSO_3^- : Sulfite d'hydrogène

I

IACR : Institute of arable crop research
IGEPP : Institut de génétique, environnement et protection des plantes
INRA : Institut national de recherche agronomique
INSERM : Institut national de la santé et de la recherche médicale
IPSL : Institut Pierre Simon Laplace
IRMS : Spectromètrie de masse à rapport isotopique
IRN : Indice de récolte en azote
ITC : isothiocyanates

K

K_2O : Potassium oxide
K : Potassium
kDa : Kilo Dalton
Km : Constante de Michaelis

L

LA : Leaf area
LA : Local approach
LAI : Leaf area index
LHS : Échantillonnage par Hypercube Latin
LN : Limitation en N ou low nitrogen
LS : Limitation en S ou low sulfur

M

Met : Méthionine
Mg : Magnésium
MgO : Magnésium oxide
MN : Mid nitrogen
Mo : Molybdène
MOT1 : Molybdate transporter 1
MRP : Mul'drug resistance-associated protein
MS : Matière sèche
MS : Méthionine synthase
Mt : Millions de tonnes

N

N : Azote/Nitrogen
NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NHI : Indice de récolte du N ou nitrogen harvest index
NiR : Nitrite réductase
NIRS : Spectrométrie proche infrarouge

NR : Nitrate réductase
NT : Transporteur de nitrate

O

O_3 : Ozone
OAS : O-acétylsérine
OAS-TL : O-acétylsérine thiol-lyase
OMM : Organisation météorologique mondiale
OPH : O-phosphohomosérine

P

P_2O_2 : Pentoxyde de phosphore
P : Phosphore
PAI : Pod area index
PAPS : 3'-phosphoadéniosine-5'-phosphosulfate
PAR : Rayonnement photosynthétiquement actif
PNUE : Programme des nations unies pour l'environnement
PPHD : Plateforme de phénotypage haut débit
PRCC : Coefficient de corrélation de rang partiel

Q

QS : Quantité de soufre

R

RCP : Representative concentration pathway
REG : Réticulum endoplasmique granuleux
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
RuBisCO : Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
RUE : Efficience d'utilisation des rayonnements

S

S : Soufre
S^{2-} : Sulfide
SAH : S-adénosylhomocystéine
SAM : S-adénosylméthionine
SAMS : S-adénosylméthionine synthétase
SAS PIVERT : Picardie innovation végétale, enseignements et recherches technologiques
SAT : Sérine acétyltransférase
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
Ser : Sérine
SHI : Sulfur harvest index
SiR : Sulfite réductase
SLA : Surface foliaire spécifique
SMCSO : S-methylcystéine sulfoxide
SMM : S-méthylméthionine
SO_2 : Dioxyde de soufre
SO_4^{2-} : Sulfate
SOT : Sulfotransférase
SSP : Seed storage protein
SUE : Sulfur use efficiency
SULTR ou ST : Transporteur de sulfate
SuMoToRI : Sulphur model towards rapeseed improvement

T

TAG : Triacylglycéride
TDW : Total dry weight
Thr : Thréonine
TS : Thréonine synthase

U

U : Unité
UMR : Unité mixte de recherche
UV : Ultraviolet

W

WCRP : Projet du programme mondial de recherche sur le climat
WOSR : Winter Oilseed Rape

X

X–CysGly : Cystéinylglycine conjuguée
XRF : X ray fluorescence

Table des matières

Remerciements i

Liste des abréviations vi

CHAPITRE I - INTRODUCTION GÉNÉRALE 2
I. Contexte général 2
II. Positionnement des objectifs de la thèse au sein du programme POLYGONE 5

CHAPITRE II – SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE 8
I. La culture du colza d'hiver 8
I.1 Place du colza dans la filière des oléoprotéagineux 8
I.2 Le cycle de développement du colza et sa place dans les systèmes de cultures 9
I.3 La fertilisation soufrée et azotée du colza et leurs interactions 10
II. La nutrition et le métabolisme soufré 12
II.1 Importance et rôles des composés soufrés 12
II.2 Absorption, transport et assimilation du S dans la plante 14
II.2.a Absorption et transport 14
II.2.b Assimilation 16
III. Réponses de la plante face à une limitation en S et impacts sur la qualité des graines 17
III.1 Symptômes de déficience en S et réponses physiologiques 18
III.2 Réponses métaboliques et transcriptomiques 19
III.2.a Modification du métabolisme soufré 20
III.2.b Interaction avec le métabolisme carboné 21
III.2.c Interaction avec le métabolisme azoté 21
III.3 Impacts d'une limitation en S sur la qualité des graines 22
III.3.a La graine de colza : développement et germination 22
III.3.b Impacts physiologiques d'une limitation en S 24
III.3.c Impacts d'une limitation en S sur la qualité nutritionnelle des graines 25
IV. Quelles pistes pour améliorer la conduite et la gestion de la fertilisation S ? 27
IV.1 Amélioration de l'EUS en interaction avec l'azote 27
IV.1.a Amélioration du prélèvement en S 27
IV.1.b Amélioration de l'assimilation et de la remobilisation des réserves soufrées 28
IV.2 Variabilité génotypique / sélection variétale / concept d'idéotype 29
IV.3 Outils d'aide à la fertilisation S, indicateur de la nutrition S et de qualité des graines 30
IV.3.a Aide à la fertilisation et indicateur de la nutrition S 31
IV.3.b Diagnostic de la qualité des graines 34
IV.4 La modélisation agro-écophysiologique : principes et intérêts 35
IV.4.a Principes fondamentaux 35
IV.4.b Les modèles agro-écophysiologique dédiés à la culture du colza 36
IV.4.c L'utilisation des modèles agro-écophysiologiques dans un contexte de dérèglement climatique 37
V. Le modèle SuMoToRI 39

PLAN DE RECHERCHE : OBJECTIFS ET DÉMARCHES ASSOCIÉES 43

CHAPITRE III – MATÉRIELS & MÉTHODES 50

A. Expérimentations végétales *in planta*, conditions de cultures et analyses associées 50
I. Descriptif des cultures 50
I.1 En conditions contrôlées 50
I.1.a Dispositif expérimental mis en place pour l'étude des interactions entre la fertilisation soufrée et azotée sur la qualité des graines de colza 51
I.1.b. Dispositif expérimental mis en place pour l'étudie de l'impact du fractionnement ou du retard de l'apport en S sur la qualité des graines de colza 51

I.1.c. Mode de récolte des échantillons 52
I.2. Dispositif au champ 52
I.2.a. Essai soufre à Prenois 52
I.2.b. Essais au champ par Terres Inovia (2014-2015 et 2015-2016) 53
II. Analyses élémentaires et biochimiques 54
II.1. Détermination des teneurs en S et N totaux 54
II.1.a. Détermination des teneurs en S et N par EA-IRMS 54
II.1.b. Détermination de la teneur en S par fluorescence à rayon X 55
II.2. Extraction, dosage et électrophorégramme des protéines totales des graines 55
II.3. Détermination des teneurs en huile et en glucosinolates par Near InfraRed Spectroscopy (NIRS) et analyse de la composition lipidique des graines 56
III. Exploitation des données et analyses statistiques 56
III.1. Calcule des indices de récoltes et des efficiences d'usages en S et en N 56
III.2. Exploitation statistique des données 57

B. Expérimentations numériques *in silico* 57
I. Choix des scénarios climatiques et acquisition des variables environnementales pour les simulations avec le modèle SuMoToRI 57
I.1. Utilisation de bases de données climatiques pour l'acquisition de la température et du rayonnement journaliers 58
I.2. Détermination des fonctions de prélèvements en soufre 58
II. Méthodes d'analyses de sensibilité utilisées avec les données de simulations 60
II.1. Coefficient de corrélation de rang partiel (Partial Rank Correlation Coefficient) 60
II.2. Indices de Sobol 61

CHAPITRE IV – RÉSULTATS 64

A. EXPÉRIMENTATIONS IN PLANTA EN CONDITIONS CONTRÔLÉES ET DE PLEIN CHAMP 64

A.1 Seed yield components and seed quality of oilseed rape are impacted by sulfur fertilization and its interactions with nitrogen fertilization 65
Abstract 65
I. Introduction 65
II. Materials and methods 67
II.1 Experimental treatments and tissue sampling 67
II.2 S and N analyses and determination of SHI, NHI, SUE and NUE 69
II.3 Determination of seed nutritional quality 69
II.3.a Oil content 69
II.3.b Extraction and quantification of total proteins in seeds 69
II.4 Statistical analyses 70
III. Results 70

A. Impacts of different levels of S and N fertilization 70
III.1 Influence of S and N availability on DM distribution and seed yield 70
III.2 Effects of treatments on S and N partitioning 71
III.3 Effects of treatments on S and N use efficiencies 72
III.4 Changes in seed nutritional quality in response to the management of S and N fertilization 72

B. Effects of fractionated and delayed S inputs 73
III.5 Effects of fractionated or delayed S inputs on yield components and S and N plant status 73
III.6 Effects of fractionated or delayed S supply on seed nutritional quality 74
IV. Discussion 74
IV.1 Adjustment of S and N inputs to optimize growth, seed yield and S and N use efficiencies 74
IV.2 Importance of balancing S and N inputs to maintain seed nutritional quality 75
IV.3 Delaying or fractioning S inputs could be a lever for improving seed quality 76
IV.4 Towards new indicators to predict seed protein quality 77

V. Conclusion 78

A.2 Évaluation de l'impact de différents schémas de fertilisation soufrée sur le statut soufré et sur la qualité des graines de colza et validation d'indicateurs de la qualité protéique des graines en condition de plein champ 80

I. Introduction et objectifs 80
II. Matériel et méthode 81
II.1 Prenois 81
II.2 Essais Terres Inovia 2015 et 2016 81
III. Résultats et Discussion 82

A. Essai Prenois 82

III.A.1 Impacts des modalités de fertilisation soufrée sur le rendement grainier, les teneurs en huile, acides gras (ω6 et ω3) et protéines des graines 82
III.A.2 Impacts des modalités de fertilisation soufrée sur les teneurs en S et la qualité protéique des graines 82
III.A.3 Discussion partielle 83

B. Analyses des lots de graines issues des essais Terres Inovia 2015 et 2016 85

III.B.1 Rendement grainier, teneur en huile, en protéines et en S des graines des essais Terres Inovia 2015 85
III.B.2 Analyse de la qualité protéique des graines en relation avec la teneur en S des graines de colza sur les essais Terres Inovia 2016 86
III.B.2.a Teneurs en S dans les graines selon les sites et les génotypes 86
III.B.2.b Qualité protéique des graines sélectionnées 87
III.B.3 Discussion partielle 87

B. EXPÉRIMENTATION NUMÉRIQUES IN SILICO AVEC LE MODÈLE ÉCOPHYSIOLOGIQUE SUMOTORI 90

B.1 SuMoToRI model simulations for optimizing sulphur fertilization in oilseed rape in the context of increased spring temperatures 91

Abstract 91
I. Introduction 92
II. Material and methods 94
II.1 Description of the SuMoToRI crop model 94
II.2 Data Sources and Simulation Analysis Design 94
II.2.a Selection of locations 94
II.2.b Description of the Climatic Scenarios and Simulation Periods 95
II.2.c Initialization of the model 96
II.2.d Model outputs and statistical analyses 96
III. Results 97
III.1 Simulated End Dates 97
III.2 Plant performances at the onset of pod formation 98
III.3 Biomass simulations and leaf area expansion 98
III.4 S allocation and partitioning simulations 99
IV. Discussion 100
IV.1 Respective effects of location and scenario on SED, total and leaf biomass 100
IV.2 Impact of warmer temperatures on the shortening of the crop cycle and on plant biomass 101
IV.3 Impact on S storage within the plant and environmental issues 101
IV.4 Directions for S management and adapted varieties 102
V. Conclusion 103

B.2 Sensitivity analyses for improving sulfur management strategies in Winter Oilseed Rape 105
Abstract 105
I. Introduction 106
II. Materials and methods 108
II.1 Overview of the SuMoToRI model 108
II.2 Simulations and sensitivity analysis procedures 109
II.2.a Step 1: Choice of targeted plant parameters and setting of their variation range 109
II.2.b Step 2: Calculation of S uptake functions 109
II.2.c Step 3: Simulations of plant performances under contrasting S-supply conditions 110
II.2.d Step 4: Computation of the sensitivity indices: partial rank correlation coefficient 111
II.2.e Step 5: Computation of the sensitivity indices: functional decomposition of variance with Sobol indices 111
II.3 Software 111
III. Results 112
III.1 Plant performances and range of variations at the onset of pod formation 112
III.2 Impact of variation in plant parameters on plant performance and S status 113
III.2.a The variation in RUE was the main driver of TDW and displayed high stability across the conditions 113
III.2.b LAI_{GL} was mainly impacted by the C-allocation to the leaves 113
III.2.c $QS_{mobile.GL}$ was strongly impacted by RUE and the impact of β and SLA were depending on S supply 114
III.3 Identification of optimised parameter combinations under different S-fertilisation strategies 115
III.3.a Early and fractioned S supplies allowed the highest biomass production but different optimised plant parameter combinations 115
III.3.b The fractioned S supply allowed substantial increases in LAI_{GL} with moderate changes in the plant parameters 116
III.3.c High $QS_{mobile.GL}$ was driven by the S amount, whatever the timing of supply, with little impact on optimised parameter combinations 116
IV. Discussion 117
IV.1 Plant parameter rankings according to their impacts on plant performance under different S-fertilisation strategies 117
IV.2 A preliminary approach to design ideotypes adapted to specific S-fertilising strategies 118
IV.3 Towards new S management strategies 119
V. Conclusion 120

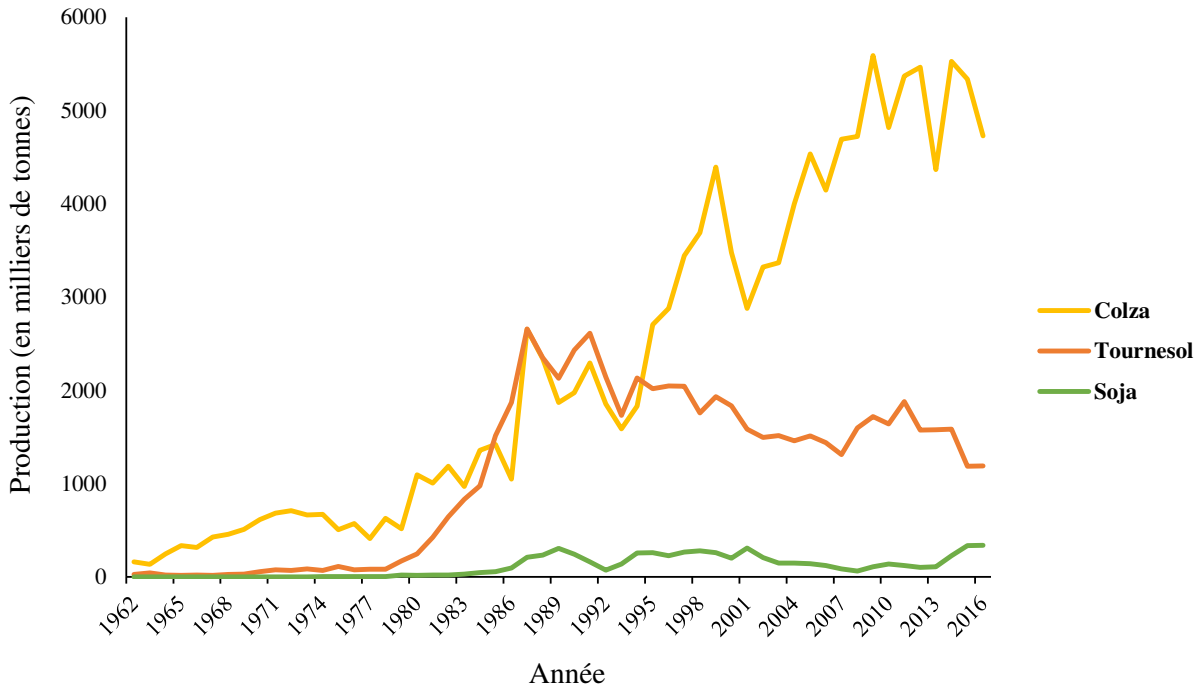
B.3 Perspectives d'évolution du modèle SuMoToRI pour intégrer l'effet des interactions SxN sur la qualité des graines : synthèse des comparaisons de simulations et des données observées 122
I. Introduction et objectifs 122
II. Matériel et méthode 123
II.1 Données climatiques, initialisation du modèle et paramétrage 123
II.1.a Acquisition des variables d'entrées : données climatiques et fonctions de prélèvement en S 123
II.1.b Valeurs initiales et paramétrage 124
III. Résultats 125
III.1 Comparaison des observations et des simulations en condition non limitante en N 125
III.1.a Apport unique de S à GS32 125
III.1.b Apport de S retardé ou fractionné 126
III.2 Comparaison entre les observations issues des conditions limitantes en N et les simulations réalisées avec les fonctions de prélèvement en S correspondantes 127
IV. Discussion 128
IV.1 Des pistes pour l'amélioration des simulations avec le modèle SuMoToRI 128
IV.2 La teneur en S foliaire : un indicateur précoce de la qualité de la graine ? 130

CHAPITRE V – DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 134
I. Optimisation des performances agronomiques du colza *via* l'adaptation des schémas de fertilisation S en interactions avec la fertilisation N et l'élévation de la température 135
I.1 Ajuster conjointement la fertilisation S et N est primordiale afin d'optimiser les performances et la qualité des graines du colza 135
I.2 Fractionner et retarder les apports en S : de nouvelles modalités de fertilisation à explorer ... 137
I.3 Les schémas de fertilisation S doivent être ajustés dans un contexte de dérèglement climatique caractérisé par une augmentation des températures printanières 139
I.4 Des idéotypes variétaux et culturaux adaptés aux objectifs de rendement et de qualité des graines 141
I.5 Perspectives 143
II. Vers de nouveaux indicateurs de la qualité protéique des graines de colza 144
II.1 La teneur en S des graines peut être utilisée comme un indicateur de la qualité protéique 145
II.2 Le modèle SuMoToRI : un outil de prédiction de la qualité des graines ? 146
II.3 Perspectives 147

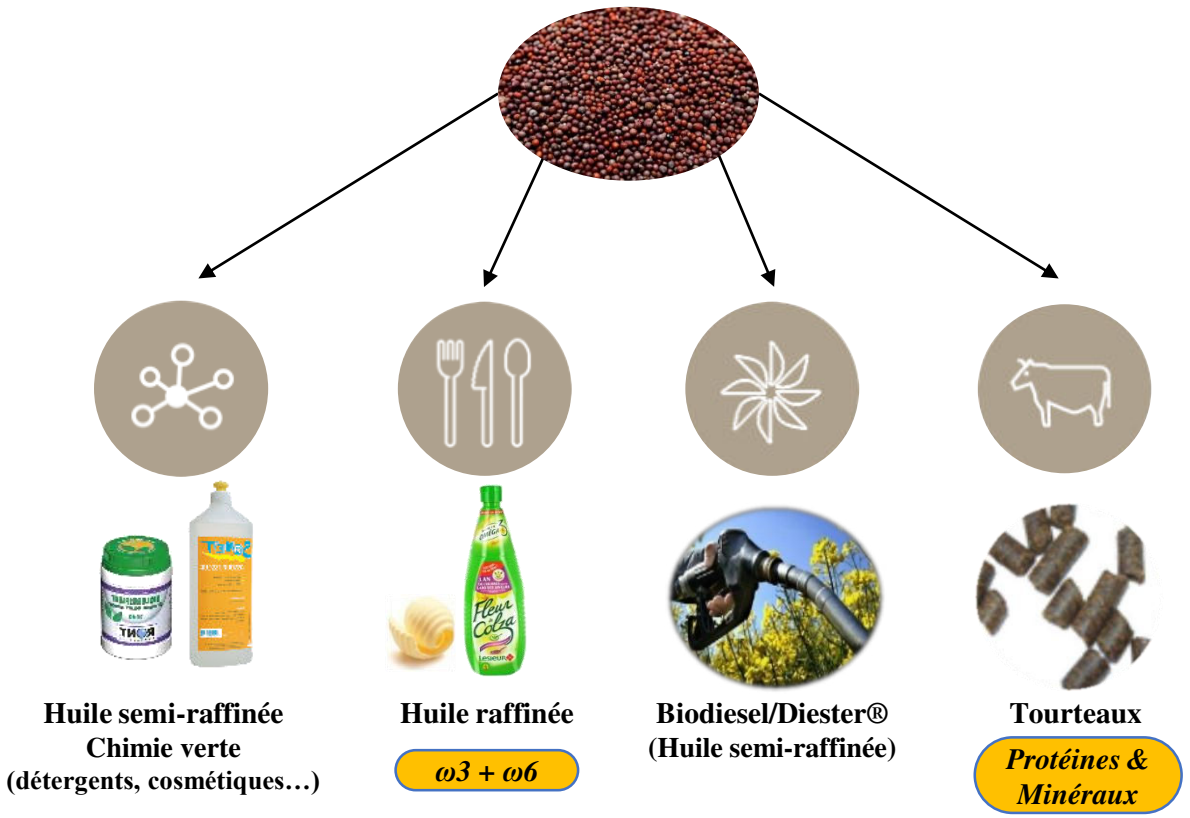
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 151

CHAPITRE I

Introduction générale



<u>Figure I.1</u> : Évolution de la production de graines d'oléoprotéagineuses (colza, tournesol et soja) en France métropolitaine en milliers de tonnes de 1962 à 2016. (D'après FAOSTAT).



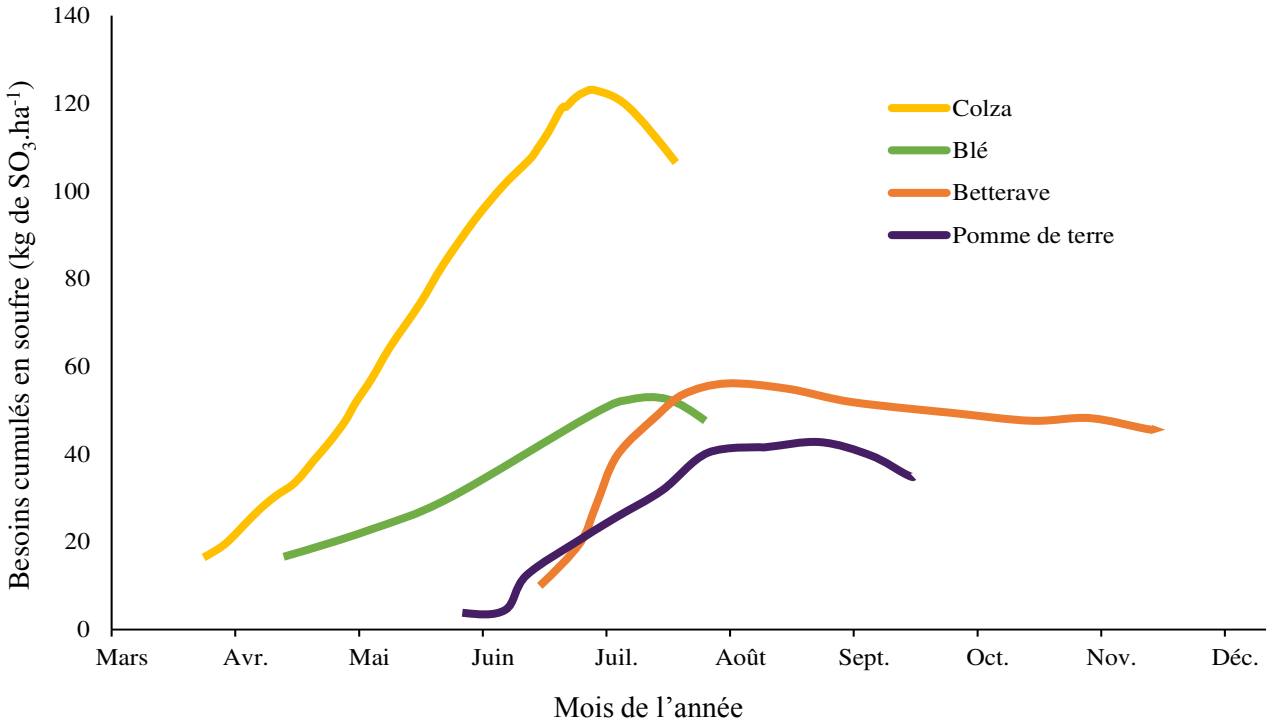
<u>Figure I.2</u> : Principales utilisations des graines de colza "00" dans l'industrie alimentaire et non alimentaire. Le diester® est obtenu par estérification de l'huile semi-raffinée par du méthanol. Les esters d'huile de colza sont également utilisés pour la confection de solvants et d'encres. L'huile 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. (D'après PROLEA).

CHAPITRE I - INTRODUCTION GÉNÉRALE

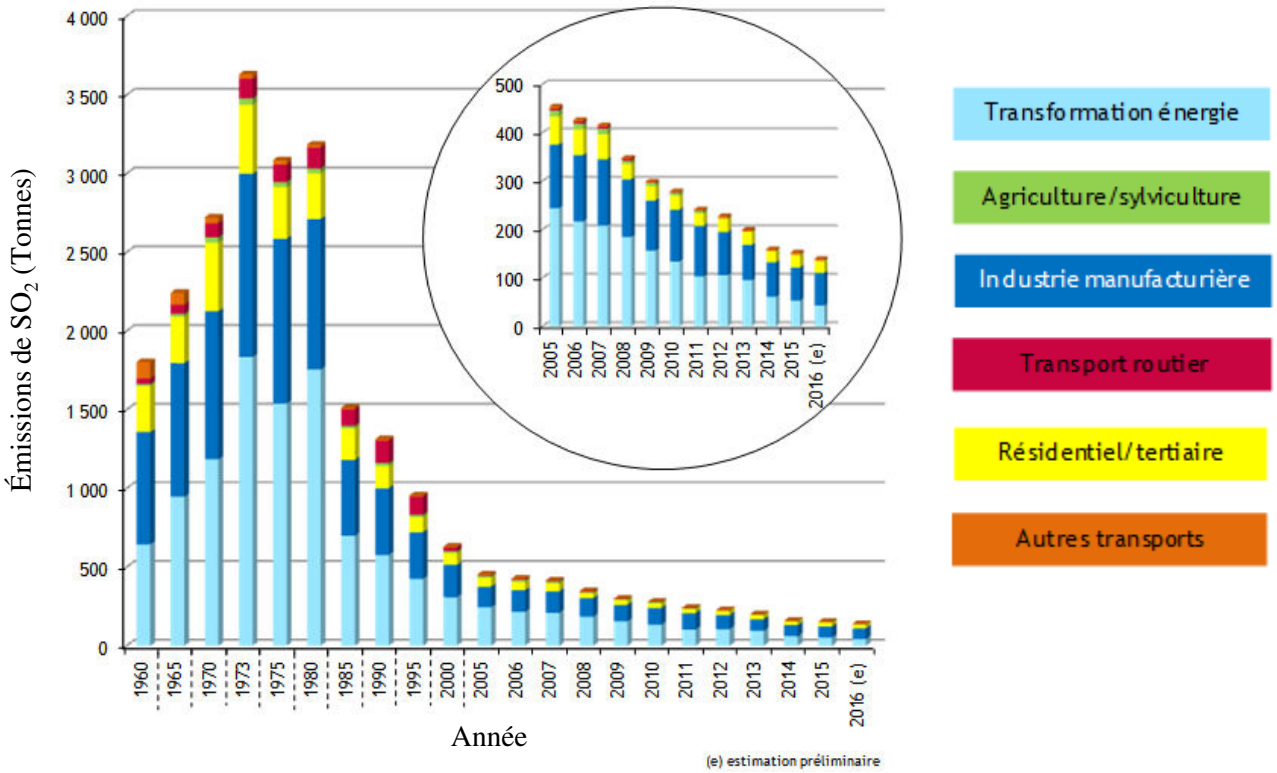
I. Contexte général

L'agriculture est pour la majorité de la population mondiale une activité vitale assurant son alimentation. Elle permet aussi de nourrir les animaux d'élevages et de fournir en matières premières de multiples domaines notamment industriels (biocarburants, bioplastiques, biomatériaux, métabolites secondaires d'intérêt pour la chimie verte, la cosmétique, la santé, etc). Depuis la « révolution verte » survenue dans les années 1960, l'amélioration des cultures *via* l'utilisation intensive d'engrais principalement azotés, de produits phytosanitaires et de variétés sélectionnées à haut rendement a permis d'augmenter considérablement la production alimentaire afin de répondre aux besoins d'une population mondiale en pleine expansion (Davies, 2003). Malgré ces améliorations, les crises alimentaires notamment de 2008 et 2011 ont remis en cause la capacité à nourrir la population mondiale. Leurs origines sont complexes et multifactorielles (Godfray *et al*., 2010), prenant en compte la croissance de la population, l'augmentation du prix des denrées alimentaires de base et du coût des engrais (indexé au prix du pétrole), les modifications du climat, le manque de terres agricoles cultivables (en compétition avec d'autres domaines d'activités humaines), le gaspillage alimentaire, etc. L'enjeu majeur de l'agriculture d'aujourd'hui et de demain est donc d'améliorer le rendement des productions végétales et de maintenir la qualité des produits récoltés tout en étant plus respectueuse de l'environnement et mieux raisonnée. Pourtant, en 2015, la consommation mondiale en fertilisants azotés a atteint 109 millions de tonnes contre 80 millions de tonnes en 2000 (FAOSTAT), alors que plus de la moitié de l'azote (N) apportée aux cultures est actuellement perdue dans l'environnement et que la production de ces engrais dépend elle-même de l'énergie fossile, conduisant à des émissions de gaz à effet de serre supplémentaires ainsi qu'à une augmentation des coûts des engrais (Lassaletta *et al*., 2014).

Quasiment absente du paysage agricole français il y a 40 ans, la culture du colza (*Brassica napus* L.) fait maintenant partie des oléoprotéagineux les plus cultivés en France (4,7 millions de tonnes en 2016) devant le tournesol (1,2 millions de tonnes en 2016) (**Figure I.1**). En 2016, sa production de graines a atteint 22,3 millions de tonnes en Europe et 68,9 millions de tonnes dans le monde (FAOSTAT). Les graines de colza présentent de nombreux débouchés alimentaires et industriels (**Figure I.2**). Riches en huile et en protéines, elles sont utilisées pour la production d'huile de table (alimentation humaine), de biocarburants et de dérivés d'huile à haute valeur ajoutée (produits cosmétiques, lubrifiants, etc) mais aussi de tourteaux principalement destinés à l'alimentation animale.



<u>Figure I.3</u> : Besoins annuels cumulés en soufre de différentes cultures végétales de janvier à décembre. (D'après Terres Inovia).

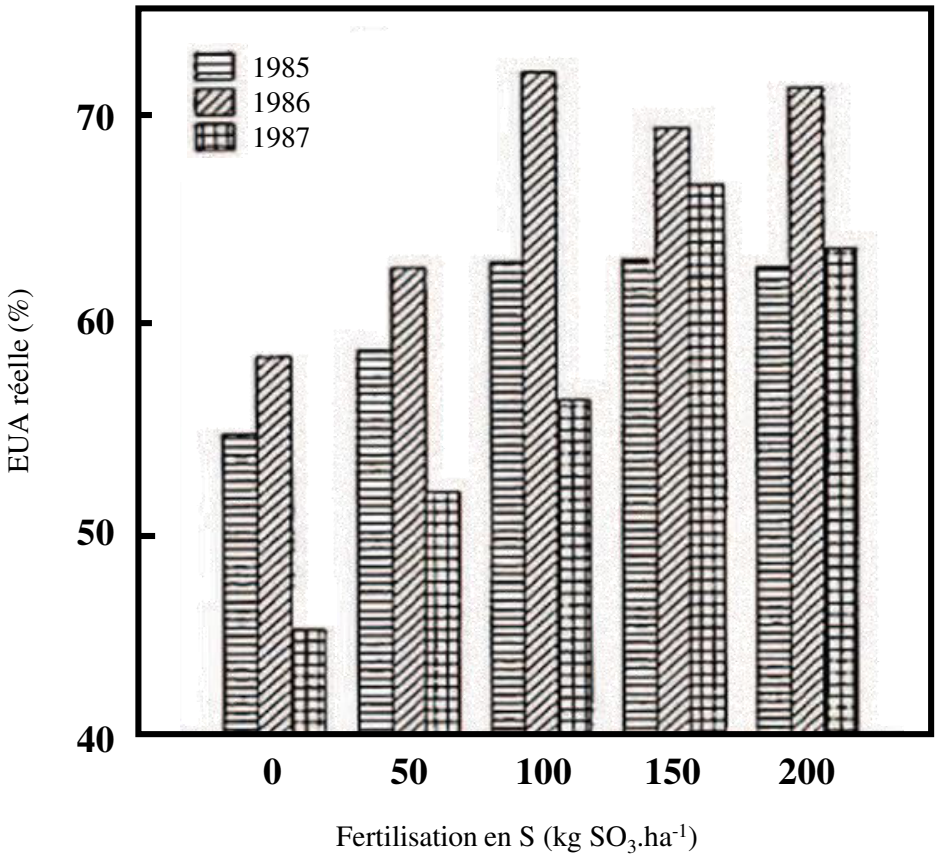


<u>Figure I.4</u> : Évolution des émissions de dioxyde de soufre (SO_2) dans l'atmosphère en France métropolitaine entre 1960 et 2016 selon les secteurs d'activités.
(e) : estimation préliminaire. (CITEPA).

Parmi les éléments nutritifs majeurs, l'azote (N) et le soufre (S) sont connus pour être essentiels à la croissance, au développement ainsi qu'au bon fonctionnement des plantes. Le colza, comme tous les membres de la famille des Brassicacées (*Brassicaceae*), est une culture exigeante en N (il est qualifié de « pompe à nitrates ») mais aussi en S dont les besoins, s'élevant à environ 120 kg de $SO_3.ha^{-1}$, sont supérieurs à ceux d'autres grandes cultures comme le blé (40 à 60 kg de $SO_3.ha^{-1}$; Oenema et Postma, 2003) (**Figure I.3**). Une bonne alimentation en S est nécessaire afin de garantir des rendements stables ou élevés et une qualité satisfaisante des graines. En effet, les graines de colza sont composées d'un taux important de protéines soufrées (Zhao *et al*., 1997) gage de qualité nutritionnelle pour l'alimentation animale. Cependant, depuis les trois dernières décennies, la mise en place de politiques environnementales visant à réduire les émissions industrielles atmosphériques soufrées telles que le dioxyde de soufre (SO_2) (Protocole d'Helsinki en 1985, Protocole d'Oslo en 1994, Protocole de Kyoto en 1997) a conduit à une chute de la disponibilité en S des sols (Scherer, 2001 ; Schnug et Evans, 1992). En France, les émissions de SO_2 dans l'atmosphère ont chuté de 96 % entre 1973 et 2016 (**Figure I.4**). Ces diminutions d'émissions de S dans l'atmosphère ont réduit la déposition du S dans les sols et ont contribué à l'oligotrophisation des sols en S. L'apparition de symptômes de carence en S sur les cultures est alors devenue de plus en plus fréquente, en particulier en Europe de l'Ouest (McGrath *et al*., 2002).

Une faible disponibilité en S peut conduire à une chute du rendement de 40 à 50 % (Terres Inovia) et affecter les composantes associées au rendement (poids de mille grains, nombre de siliques, graines par siliques, etc). En France, l'institut technique de référence des professionnels de la filière des huiles et des protéines végétales (oléagineuses et protéagineuses) et de la filière chanvre (Terres Inovia) préconise d'apporter 75 $kg.ha^{-1}$ de S sous forme assimilable (trioxyde de soufre, SO_3 qui en s'oxydant donnera du sulfate, SO_4^{2-}) en début de montaison afin de prévenir les risques de carence. Plusieurs études ont montré qu'une carence en S survenant au stade rosette ou début de montaison aboutit à un abaissement du rendement et de la qualité de l'huile (Dubousset *et al*., 2010) et des protéines de stockage (moins riches en acides aminés soufrés, D'Hooghe *et al*., 2014). Appliquée au stade montaison, une restriction de l'apport de S provoque une réduction de la remobilisation du N foliaire au profit des graines ainsi qu'une réduction de la viabilité et de la vigueur germinative des graines produites (D'Hooghe *et al*., 2014). Si la limitation en S se manifeste aux stades reproducteurs, le rendement n'est pas affecté mais la qualité protéique et/ou lipidique de la graine peuvent être significativement altérées (D'Hooghe *et al*., 2014 ; Dubousset *et al*., 2010).

D'autres études ont mis en évidence de fortes interactions entre les métabolismes N et S (Coleto *et al*., 2017 ; Hesse *et al*., 2004 ; Karmoker *et al*., 1991 ; Koprivova *et al*., 2000). Une limitation en



<u>Figure I.5</u> : Influence de la fertilisation soufrée sur l'efficience d'utilisation réelle de l'azote (EUA réelle) par le colza d'hiver (variétés double zéro, cv. Wiebke et Glumander) suivie trois années consécutives sur le même site (1985, 1986 et 1987) au nord de l'Allemagne. D'après Schnug *et al*., (1993).

S peut diminuer l'efficience d'utilisation du N (**Figure I.5**) et réciproquement (Fismes *et al*., 2000 ; Salvagiotti *et al*., 2009 ; Schnug *et al*., 1993). De plus, l'impact d'une limitation en S varie selon la disponibilité en N (Janzen et Bettany, 1984) ou lorsque l'un des deux éléments est apporté en quantité trop faible ou en excès, ayant un impact négatif sur le rendement et/ou la qualité des graines (Fismes *et al*., 2000 ; Joshi *et al*., 1998 ; Malhi et Gill, 2007).

Ces résultats soulignent l'importance de l'alimentation en S sur l'élaboration de la qualité des graines de colza et la nécessité de prendre en compte les interactions nutritionnelles SxN afin d'améliorer l'efficience d'utilisation de ces 2 éléments tout en préservant voire en augmentant la qualité grainière. Ils mettent également en évidence l'importance de raisonner les apports en fertilisants S en fonction des apports en N afin d'optimiser le triptyque « bilan agro-environnemental, rendement et qualité des graines récoltées ».

Par ailleurs, dans un contexte d'optimisation de l'usage des fertilisants et de transition énergétique forcée, mettre au point ou tester de nouvelles pratiques de fertilisation peut être prospecté *via* une approche de modélisation, qui permet (i) de construire en amont un cadre d'analyse écophysiologique des flux nutritionnels (prélèvement, assimilation, remobilisation) et des régulations associées, (ii) de prédire la croissance du végétal dans une large gamme de conditions environnementales (e.g. apports contrastés en N et S, température et rayonnement incident) et enfin (iii) d'identifier et de valider des indicateurs utilisables pour la sélection variétale et le pilotage de la fertilisation (vers la définition d'idéotypes variétaux et culturaux). Le dérèglement climatique, dont la hausse des températures prédites au cours des prochaines décennies, pourrait avoir des incidences sur le rendement des cultures et la qualité des graines récoltées (DaMatta *et al*., 2010 ; Hampton *et al*., 2013 ; Madan *et al*., 2012 ; Namazkar *et al*., 2016 ; Regitano Neto *et al*., 2016). Par ailleurs, il a déjà été souligné des interactions existant entre la hausse des températures et la nutrition soufrée (effets compensatoires ou additionnels ; Brunel-Muguet *et al*., 2015a). De ce fait, pour développer des systèmes à faibles intrants, il est nécessaire de prendre en compte conjointement les effets de la température et de la nutrition S, spécialement chez le colza qui est une culture particulièrement exigeante en S.

Dans ce contexte général, cette thèse, réalisée au sein de l'UMR INRA-UCN 950 EVA et financée par la SAS PIVERT (Picardie Innovation Végétale, Enseignements et Recherches Technologiques) dans le cadre de son programme de recherche GENESYS et plus spécifiquement du projet POLYGONE WP1P14, s'est focalisée sur l'impact de différentes stratégies de fertilisation S en interaction avec la fertilisation N, le réchauffement climatique attendu sous nos latitudes et la

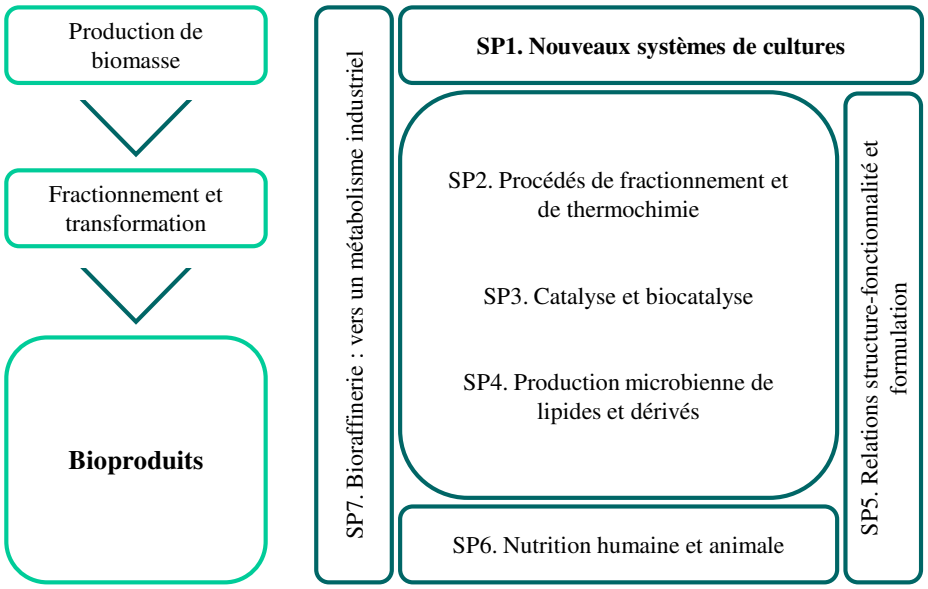


Figure I.6 : Schéma de l'ensemble des thématiques de recherche du programme GENESYS. Cette thèse se positionne au sein du SP1. (D'après https://www.institut-pivert.com/programme-genesys/).

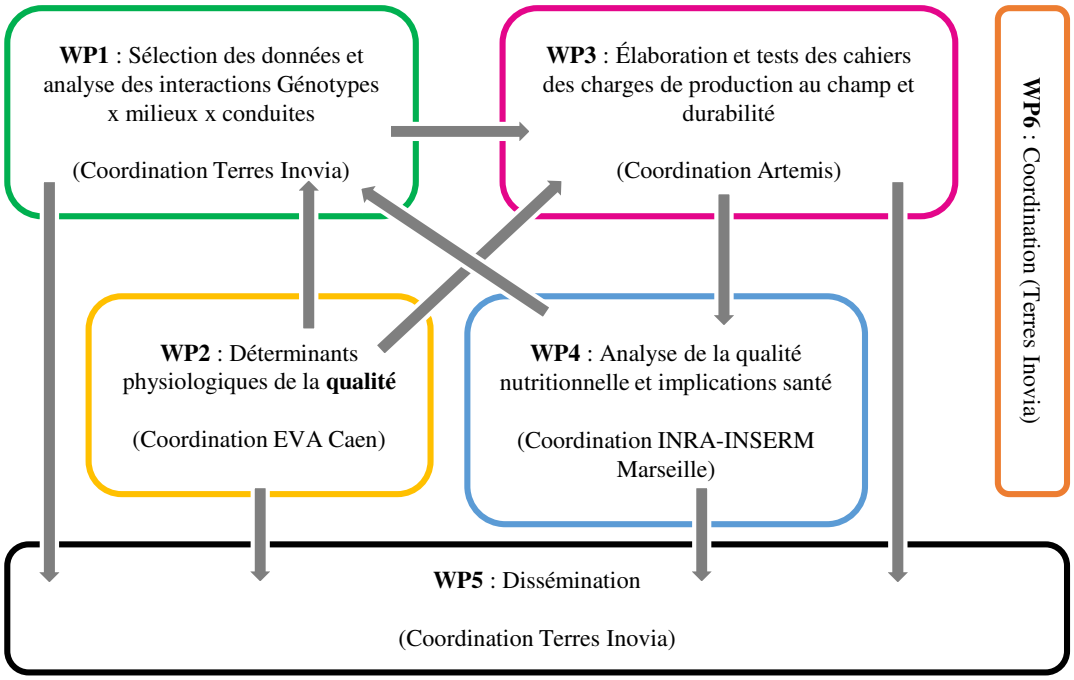


Figure I.7 : Représentation schématique du projet POLYGONE et de ses différents lots de tâches ou "Work package" (WP). Cette thèse se positionne au sein du WP2 (Déterminants physiologiques de la qualité).

variabilité de certains caractères de la plante, sur les performances agronomiques, les composantes du rendement et la qualité des graines du colza.

II. Positionnement des objectifs de la thèse au sein du programme POLYGONE

La SAS PIVERT est une société innovante du domaine de la bioéconomie, créée en 2012 et soutenue par l'État à travers le Programme Investissements d'Avenir. Elle vise à accélérer l'industrialisation de l'innovation en chimie du végétal, en développant et commercialisant de nouveaux produits et procédés. Le Programme GENESYS est un programme de recherche structurant pour le développement de la bioraffinerie oléoprotéagineuse. Il porte sur tout le cycle de la biomasse, depuis la production agricole jusqu'à la synthèse de bioproduits, en utilisant des procédés de transformation (fractionnement, chimie, biotechnologie, etc) (**Figure I.6**).

Le sujet de thèse est adossé au programme POLYGONE GENESYS-PIVERT associant des partenaires académiques (UMR INRA/UCN EVA Caen, UMR AgroEcologie Dijon, UMR NORT INRA/INSERM/Université Marseille) et privés (Terres Inovia, Dijon Céréales, PIAE Artemis) sur la problématique de « l'amélioration de la qualité des huiles et des tourteaux de colza par maîtrise des interactions avec le milieu et les conduites » (niveaux de fertilisation S/N et climat) et les conduites (dose, fractionnement des apports de fertilisants).

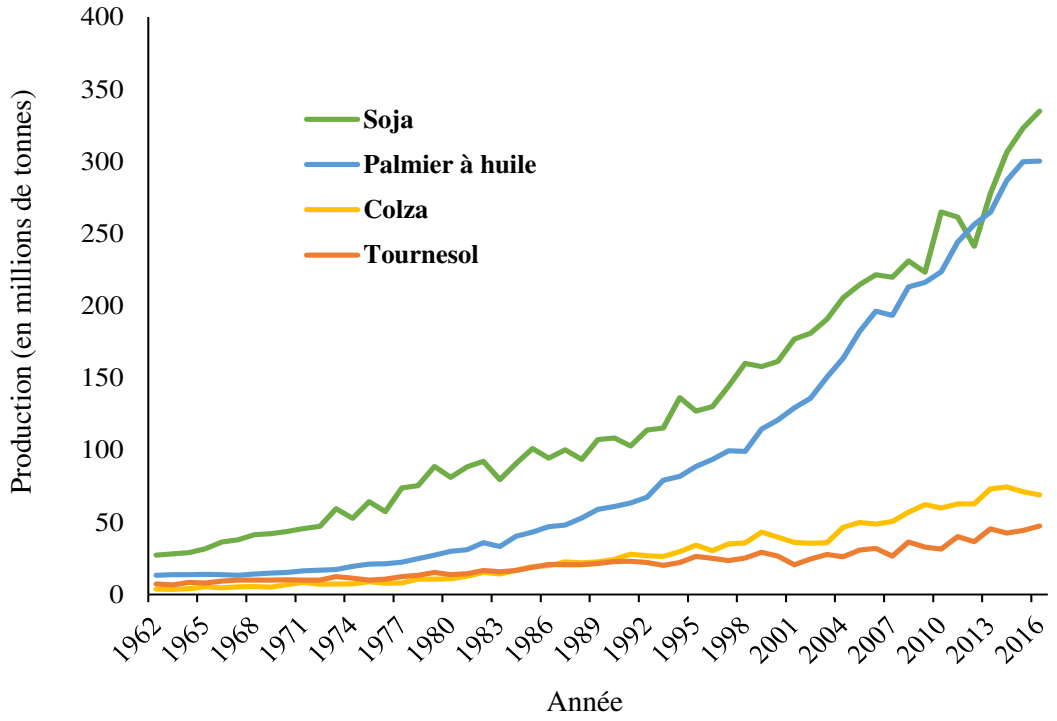
Le sujet de thèse s'inscrit plus spécifiquement dans le lot de tâches 2 (WP2) intitulé « Déterminants physiologiques de la qualité » du projet POLYGONE (**Figure I.7**) et comporte 2 volets complémentaires (volets « Physiologie » et « Modélisation ») dont les objectifs principaux visent à (i) analyser différentes stratégies de fertilisations S et N sur les performances agronomiques et la qualité protéique des graines de colza, (ii) identifier des indicateurs de la qualité des graines de colza en lien étroit avec la fertilisation S et N et (iii) optimiser les performances agronomiques du colza par une approche de modélisation en testant différentes stratégies de fertilisation en S dans différents contextes climatiques ou avec des combinaisons de paramètres définissant des idéotypes variétaux.

Ce mémoire de thèse débute par une synthèse bibliographique résumant les différents aspects agronomiques et économiques de la culture du colza, l'importance du S pour son développement et sa croissance ainsi que les impacts d'une limitation en S en particulier sur la qualité des graines et enfin les différentes voies d'améliorations de la gestion de la fertilisation S et N. Les dispositifs expérimentaux ainsi que les méthodes d'analyses mis en œuvre pour répondre aux objectifs de ce travail de recherche sont décrits dans le chapitre « Matériels et méthodes ». Les résultats sont ensuite

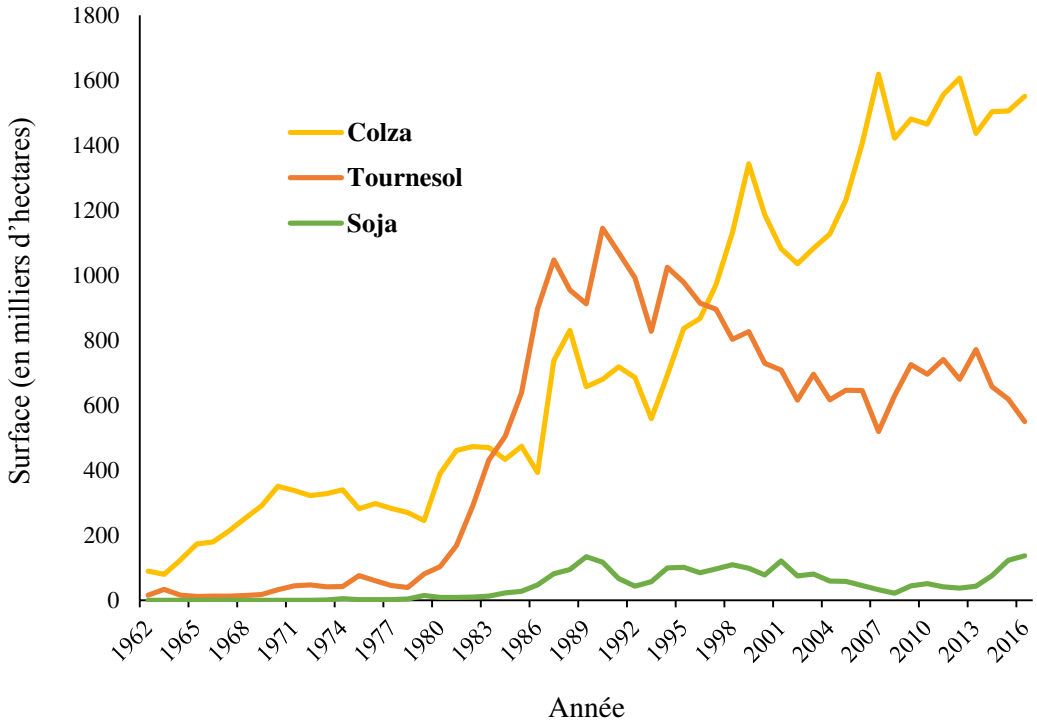
présentés sous la forme de 3 publications scientifiques (en anglais) et 2 parties résultats supplémentaires (en français). L'ensemble de ces résultats est synthétisé et suivi d'une réflexion prospective présentée dans le chapitre « Discussion générale et perspectives ».

CHAPITRE II

Synthèse bibliographique



<u>Figure II.1</u> : Évolution de la production d'oléoprotéagineuses (soja, palmier à huile, colza et tournesol) dans le monde de 1962 à 2016. (D'après FAOSTAT).



<u>Figure II.2</u> : Évolution des surfaces cultivées d'oléoprotéagineuses (colza, tournesol et soja) en France métropolitaine de 1962 à 2016. (D'après FAOSTAT).

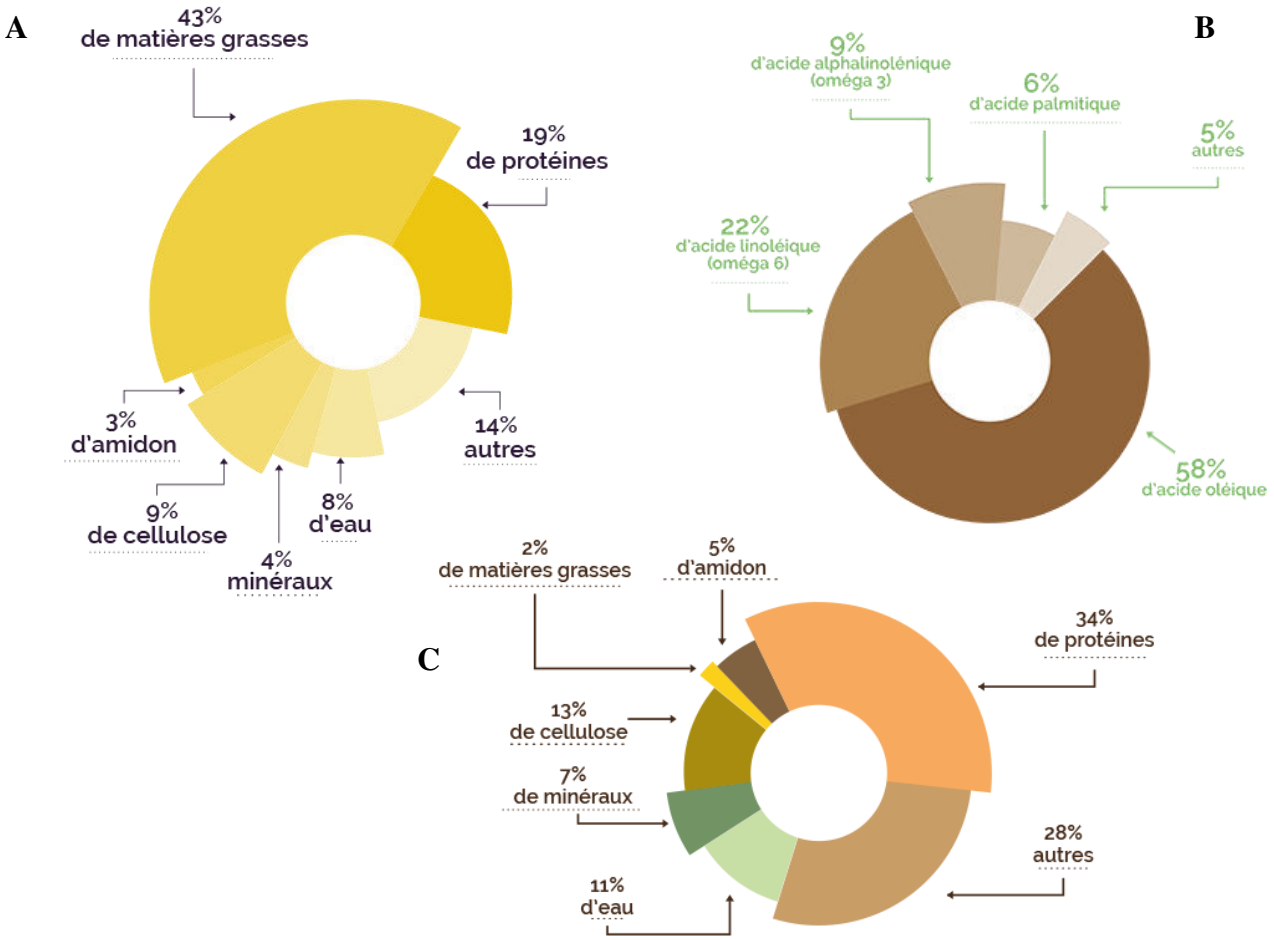
CHAPITRE II – SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La culture du colza d'hiver

I.1 Place du colza dans la filière des oléoprotéagineux

La production mondiale de graines oléoprotéagineuses est en constante progression depuis les années 1970 et avec une production de graines quadruplée en 40 ans, le colza est désormais l'un des principaux oléoprotéagineux cultivés dans le monde, plaçant sa culture au 3e rang après le soja et le palmier à huile (**Figure II.1**). L'Union Européenne est actuellement le premier producteur mondial de colza (FAOSTAT), avec une production de plus de 22,2 Mt de graines en 2016, soit plus de 32 % de la production mondiale (68,8 Mt). Elle est suivie par le Canada (18,4 Mt), la Chine (15,2 Mt) et l'Inde (6,4 Mt). Avec une production de graines de colza de plus de 4,7 Mt en 2016, la France est, avec l'Allemagne, le premier producteur européen (FAOSTAT). Les surfaces exploitées pour sa culture ont fortement augmenté depuis les années 70 mais restent assez stables depuis 2005 avec environ 1,5 millions d'hectares (**Figure II.2**), se plaçant ainsi devant la culture du tournesol (0,5 millions d'ha et 19 Mt de graines).

Le colza est cultivé principalement pour ses graines riches en huile (en moyenne 43 % de la composition totale) mais également en protéines (en moyenne 19 % de la composition totale) (**Figure II.3.A**). Après récolte, les graines subissent le processus de trituration permettant de séparer l'huile brute du tourteau résiduel, riche en protéines. L'huile de colza est riche en acide linoléique (22 %) appartenant aux oméga-6 et en acide α-linolénique (9 %) de la famille des oméga-3, deux acides gras polyinsaturés essentiels (*i.e.* non synthétisés par les animaux) (**Figure II.3.B**). De plus, son faible ratio ω6/ω3 inférieur à 2/1 (très en-dessous des recommandations de l'OMS comprises entre 5/1 et 10/1), ainsi que sa forte teneur en vitamine E en font une huile d'excellente qualité pour l'alimentation humaine (Covington, 2004 ; Foster *et al.*, 2009). L'huile de colza est également valorisée pour des usages non alimentaires, tels que la production de biocarburant (Diester®), de biolubrifiants, de détergents ou de produits cosmétiques (Terres OléoPro). Le tourteau de colza, résidu obtenu après trituration des graines et aggloméré sous forme de granulés, est utilisé essentiellement dans l'alimentation animale. Il est composé de glucides, de lipides, de minéraux et majoritairement de protéines riches en acides aminés essentiels tel que la lysine, la thréonine ou la méthionine (**Figure II.3.C**) indispensables au développement des animaux d'élevage (volailles, porc, ruminants, agneaux). Les bovins peuvent également consommer 4 à 5 kg de tourteaux de colza par jour. Grâce à leurs qualités nutritionnelles, les tourteaux de colza remplacent facilement les



<u>Figure II.3</u> : **Composition standard de la graine (A), de l'huile (B) et du tourteau (C) de colza « 00 », caractérisé par de faibles teneurs en acide érucique et en glucosinolates.** (Terres Univia).

<u>Figure II.4</u> : **Planche botanique de colza d'hiver *Brassica napus* L.** issu de l'Atlas des plantes médicinales de Köhler. (Source : http://caliban.mpiz- koeln.mpg.de/koehler/RAPS.jpg).

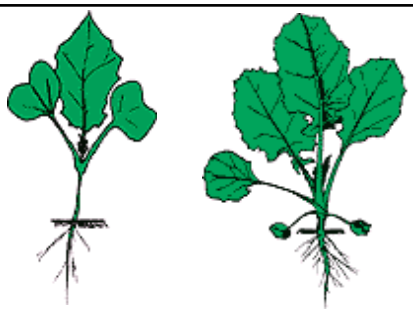
tourteaux de soja provenant le plus souvent de l'exportation et contribuent également à l'amélioration de la qualité du lait (Papas *et al*., 1979), de la viande (Solomon *et al*., 1991) ou des œufs (Gheisari et Ghayor, 2014). Dans un contexte d'accroissement de la demande mondiale en protéines destinées à l'alimentation humaine, la graine de colza représente également une alternative prometteuse pour les nouvelles sources de protéines végétales. À titre d'exemple, le développement de nouveaux processus d'extraction sur graines de colza permettent la production d'isolats de protéines avec des profils fonctionnels optimisés pour plusieurs applications alimentaires (mayonnaise, produits de boulangerie, etc) (Von Der Haar *et al*., 2014).

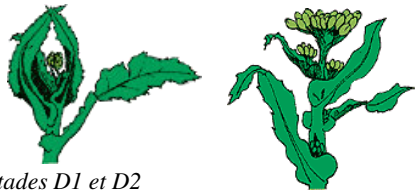
Cependant, le colza présente certains désavantages d'un point de vue nutritionnel car ses graines contiennent des composés pouvant être toxiques ou antinutritionnels pour les humains ou les animaux. Les variétés traditionnelles de colza produisent une huile contenant de l'acide érucique (C22:1) qui à forte dose peut être toxique pour les animaux (Hung *et al.*, 1977). En outre, la qualité nutritionnelle du tourteau de colza peut être réduite par la présence de glucosinolates, molécules soufrées dont les produits de dégradation sont responsables de problèmes d'inappétence chez les animaux, en causant divers désordres physiologiques (Mawson *et al*., 1993 ; Mawson et Heaney, 1994). Afin de pallier ces aspects négatifs, de nouvelles variétés « 00 » dites « double zéro » (en anglais « double low » pour « low erucic acid and low glucosinolate ») ont été mises au point par sélection variétale pour atteindre des teneurs en acide érucique inférieures à 2 % de la fraction lipidique et des teneurs en glucosinolates inférieures à 25 µmol par gramme de graines sèches (Nesi *et al*., 2008). Cependant, à faible dose, les glucosinolates et composés présents dans la plupart des espèces de Brassicacées (brocoli, radis, roquette, moutarde, chou, etc) sont reconnus pour avoir des effets bénéfiques sur la santé notamment en diminuant le risque d'apparition de cancers (Brennan *et al*., 2005 ; Kapusta-Duch *et al*., 2012 ; London *et al*., 2000 ; Sapone *et al*., 2007 ; Seow *et al.*, 2005).

I.2 Le cycle de développement du colza et sa place dans les systèmes de cultures

Le colza, membre de la famille des Brassicacées, est issu du croisement naturel entre le chou (*Brassica oleracea* L.) et de la navette (*Brassica campestris* L.) (**Figure II.4**). C'est une plante herbacée annuelle, monoïque, mellifère, à racine pivotante et tige rameuse et aux feuilles possédant des morphologies différentes selon leur position nodale et le stade de développement de la plante. Les feuilles inférieures (développement au stade rosette) sont pétiolées et découpées et les feuilles supérieures (développement à la montaison) sont lancéolées et entières.

<u>Tableau II.1</u> : Principaux stades repères du cycle de développement du colza. La nomenclature anglo-saxonne (GS : Growth Stage) est indiquée entre parenthèses. Un stade est atteint lorsque 50 % des plantes sont à ce stade. (D'après Terres Inovia).

À l'automne	
 Stade A	**A- Stade cotylédonaire** **Levée** : les jeunes plantes marquent la ligne. **Stade A (GS10)** : stade cotylédonaire. Pas de feuilles "vraies''. Seuls les deux cotylédons sont visibles.
 *Stades B1 et B4*	**B- Formation de la rosette** **Stade B** : apparition des feuilles. Pas d'entre-nœuds entre les pétioles. Absence de vraie tige. **Stade B1 (GS11)** : 1 feuille vraie étalée ou déployée. **Stade B2 (GS12)** : 2 feuilles vraies étalées ou déployées. **Stade B3 (GS13)** : 3 feuilles vraies étalées ou déployées. **Stade B4 (GS14)** : 4 feuilles vraies étalées ou déployées. **Stade Bn (GS1n)** : n feuilles vraies étalées ou déployées. Jusqu'à B9 (GS19) ou davantage de feuilles étalées ou fin de la formation de la rosette.

Au printemps	
 Stade C2	**C- Montaison** **Stade C1 (GS30)** : reprise de végétation. Apparition de jeunes feuilles. **Stade C2 (GS31)** : entre-nœuds visibles. On voit un étranglement vert clair à la base des nouveaux pétioles. C'est la tige.
 *Stades D1 et D2*	**D- Boutons accolés** **Stade D1 (GS50)** : boutons accolés encore cachés par les feuilles terminales. **Stade D2 (GS53)** : 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 (GS57)** : les pédoncules floraux s'allongent en commençant par ceux de la périphérie.
 Stade F1	**F- Floraison** **Stade F1 (GS60)** : premières fleurs ouvertes. **Stade F2 (GS61)** : allongement de la hampe florale. Nombreuses fleurs ouvertes.
 Stade G1 et G4 *Dessins : A Gravaud*	**G- Formation des siliques** **Stade G1 (GS65)** : 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 (GS71)** : les 10 premières siliques ont une longueur comprise entre 2 et 4 cm. **Stade G3 (GS72)** : les 10 premières siliques ont une longueur supérieure à 4 cm. **Stade G4 (GS73)** : les 10 premières siliques sont bosselées. **Stade G5 (GS81)** : grains colorés

Comme chez les céréales, il existe deux principaux types de développement chez le colza : le colza de printemps qui est bien adapté aux conditions climatiques d'Amérique du nord (Canada) et le colza d'hiver qui est privilégié en Europe.

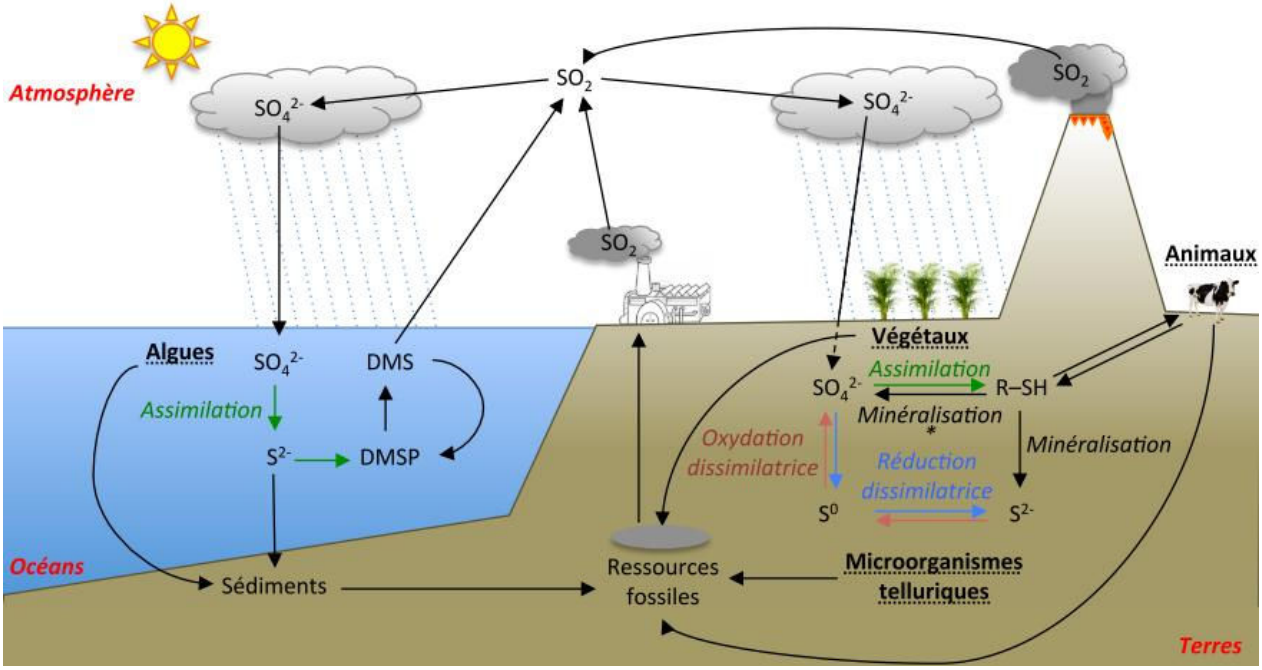
Le colza de printemps, semé entre mars et avril et récolté en août de la même année, a une phase rosette très courte qui ne nécessite pas de période de vernalisation mais une photopériode longue. Le **Tableau II.1** présente le cycle du colza d'hiver et les différents stades repères de développement. Le cycle peut être découpé en 3 phases : la phase végétative, la phase reproductrice et la phase de maturation. Après le semis, le colza développe avant l'hiver une rosette, formée d'une vingtaine de feuilles. Afin de permettre l'initiation florale, le colza a besoin d'une période de froid (la vernalisation) où la croissance va être fortement ralentie. Après la vernalisation (< 10°C pendant au moins 40 jours), le colza initie sa phase reproductrice par la montaison (reprise de la croissance végétative) suivie par la floraison (phase reproductrice). Les entre-nœuds supérieurs deviennent visibles par élongation, l'inflorescence s'ébauche au sommet de la tige et les ramifications de la tige se développent en parallèle. La floraison dure de 4 à 6 semaines. Après fécondation, la formation du fruit est assez rapide mais sa maturation demande en moyenne 6 à 7 semaines. À maturité, les siliques deviennent déhiscentes et les graines peuvent ainsi être libérées au moindre choc.

Dans les systèmes de rotation des cultures, le colza a de nombreux atouts. Il permet de faciliter le contrôle des maladies des céréales d'hiver, mais également de limiter l'apparition des adventices. Un précédent colza améliore le potentiel de rendement du blé suivant de 7 à 30 % par rapport à un précédent blé (GNIS). Le colza d'hiver est une culture qui a une très forte capacité à absorber l'azote et est donc qualifié de nitrophile ou encore de « pompe à nitrate », ce qui lui permet de jouer un rôle de CIPAN (culture intermédiaire piège à nitrate) et de limiter le lessivage des sols en nitrate pendant l'hiver (Terres Inovia). Grâce aux isothiocyanates (ITC), produits issus de la décomposition des glucosinolates provenant des résidus de culture, le colza peut avoir un rôle assainissant des sols (processus de biofumigation).

I.3 La fertilisation soufrée et azotée du colza et leurs interactions

La croissance, le développement et la productivité du colza peuvent être perturbés par de nombreux facteurs, notamment par le manque ou par le déséquilibre d'un ou de plusieurs éléments nutritifs dans le sol.

L'azote (N) fait partie des éléments essentiels au développement des plantes et représente le premier élément apporté par les fertilisants, suivie par le phosphore (P), le potassium (K) et le soufre (S). Le colza a des besoins importants en N, variables selon le stade de développement. Ils sont plus



<u>Figure II.5</u> : 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 (* minéralisation *via* activité arylsulfatase). Les animaux dépendent de source de S organique. Le S peut être libéré dans l'atmosphère par les océans, les volcans, et l'activité anthropique sous forme de composés volatiles qui seront oxydés au niveau atmosphérique. DMS : dimethylsulfide, DMSP : dimethylsulfopropianate. D'après D'Hooghe (2013), modifié d'après Takahashi *et al*. (2011b).

<u>Tableau II.2</u> : Principaux engrais soufrés utilisés en France. (D'après Terres Inovia).

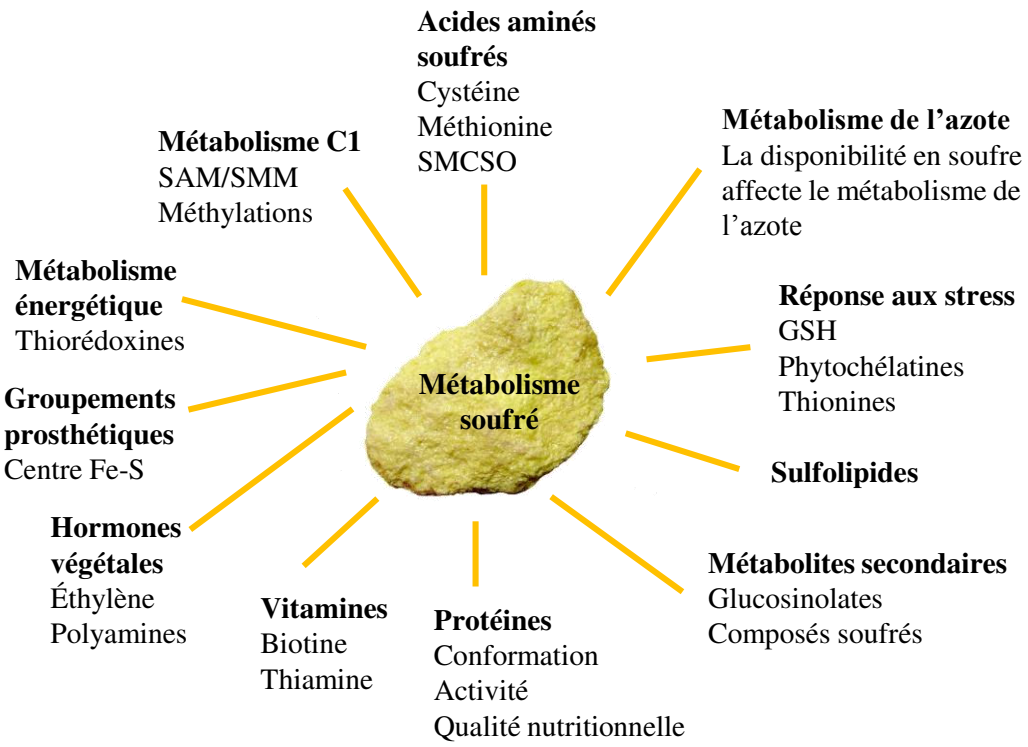
Engrais	Concentration de SO_3	Apport minimal pour 75 unités de $SO_3.ha^{-1}$		Élément associé au soufre
		en kg	en litre	
Sulfate d'ammoniaque	60 %	125	-	21 % N
Sulfonitrate d'ammoniaque 26	32,5 %	230	-	26 % N
Ammonitrate soufré 26 - 13	13 %	580		26 % N
Solution azotée soufrée 26 - 14 (1)	14 kg SO_3/100 l	678	536	26 kg N / 100 l
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 granule (sulfate de magnésium)	50 %	150	-	25 % MgO
Polysulfate ™	48 %	155	-	14 % K_2O 6 % MgO 17 % CaO

(1) Densité de 1,265

forts en fin d'hiver et au printemps, lorsque le colza reprend sa croissance après la vernalisation jusqu'au début de floraison (Rossato *et al.*, 2001). Les premiers apports en N sont donc appliqués à la sortie de l'hiver afin de compléter la fourniture du sol au printemps et de satisfaire les besoins de la plante (Terres Inovia). Il peut être effectué 1, 2 ou 3 apports d'N en fonction de la disponibilité en N du sol et des besoins des plantes allant de 40 à 100 kg $N.ha^{-1}$ par apport (Terres Inovia). Ces apports sont fractionnés sur 3 stades du développement (reprise de végétation, début de montaison, boutons accolés et/ou boutons séparés) afin de mieux répondre au besoin de la culture. Malgré ses forts besoins en N et sa capacité d'absorption élevée du N minéral, le colza possède une faible efficience d'utilisation de l'azote (EUtA ou NUtE pour « Nitrogen Utilization Efficiency » correspondant à la production de graines par quantité d'engrais N apportée), généralement autour de 50 % (Schjoerring *et al.*, 1995). Ainsi, le N étant mal remobilisé depuis les tissus foliaires vers les graines, son indice de récolte en N (IRN ou NHI pour « Nitrogen Harvest Index ») est également assez faible.

Le soufre (S) fait aussi partie des 6 macronutriments indispensables au bon développement des plantes qui peuvent le prélever au niveau de l'atmosphère ou du sol (**Figure II.5**). Dans le sol, la majeure partie du S est stocké sous forme organique (60 à 95 %) et peut être retrouvé par exemple dans l'humus, les résidus de cultures ou la biomasse microbienne. Cependant, c'est principalement le S sous forme minérale (sulfate, SO_4^{2-}) présent dans le sol qui est absorbé par les plantes. Le S organique doit être converti ou minéralisé par les micro-organismes du sol avant de pouvoir être absorbé et utilisé par la plante (**Figure II.5**). Les besoins en S sont variables selon les espèces et le stade de développement. Comme de nombreuses Brassicacées, le colza est une espèce présentant de forts besoins en S. Malgré ses fortes capacités d'absorption du sulfate, le colza est caractérisé par une faible efficience d'utilisation du S (EUtS ou SUtE pour « Sulfur Utilization Efficiency » correspondant à la production de graines par quantité d'engrais S apportée) en condition non limitante (Dubousset *et al.*, 2010). Comme l'indice de récolte en N, l'indice de récolte en S (SHI pour « Sulfur Harvest Index », correspondant à la quantité de S retrouvée dans les graines par rapport à la quantité de S de la plante entière) est lui aussi faible, atteignant seulement 20 % en condition de plein champ dans une étude de McGrath et Zhao (1996). De plus, une forte proportion de S peut-être perdue lors de la chute des feuilles au moment de la sénescence séquentielle ou monocarpique, avec des teneurs pouvant atteindre 2 à 3 % de la matière sèche.

Le S nécessaire aux cultures peut être apporté par différentes voies dont la principale est la fertilisation. Il existe différents types de fertilisants soufrés, associés avec d'autres éléments (N, P, K, Mg ou Ca) (**Tableau II.2**). La formulation à choisir dépend du type de sol, des précédents



<u>Figure II.6</u> : Représentation schématique des fonctions physiologiques du soufre et de son implication dans la biosynthèse de divers métabolites chez les végétaux. GSH : glutathion réduit, SAM : S-adénosylméthionine, SMM : S-méthylméthionine, SMCSO : S-méthylcystéine sulfoxyde. D'après Nikiforova *et al*. (2004), adaptation de D'Hooghe (2013).

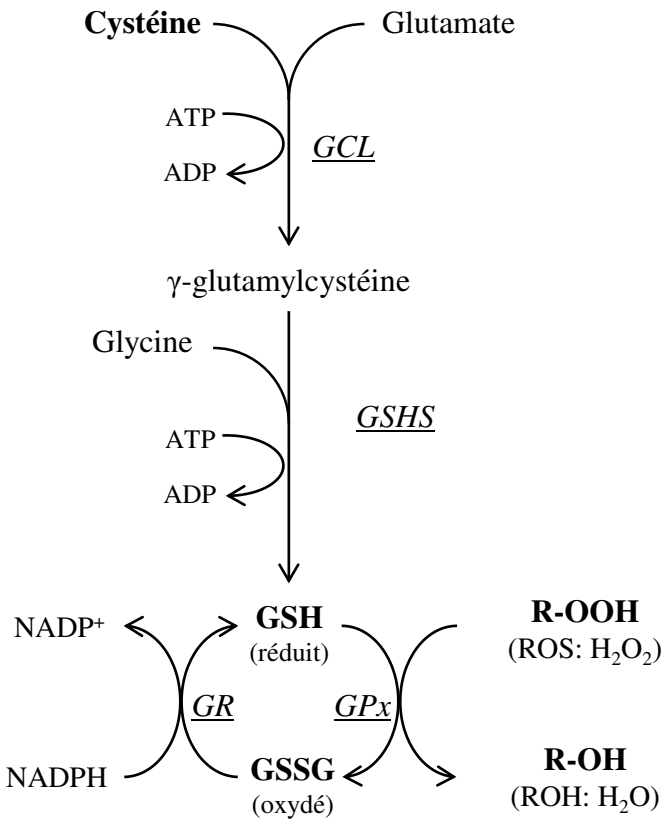
culturaux et du climat. L'apport de S est donc généralement réalisé au printemps, au même moment que l'un des deux premiers apports en N. Certains fongicides principalement utilisé contre l'oïdium dans le cas de la vigne, du blé, de l'arboriculture fruitière, des cultures légumières et horticoles, possèdent du S dans leur composition et peuvent ainsi apporter ≈ 1,5 kg $SO_3.ha^{-1}$. L'épandage de fumier ou de lisier permet d'apporter environ 12 kg $SO_3.ha^{-1}$ (COMIFER). Avant les années 1980, les retombées atmosphériques de SO_2 produites par la combustion des énergies fossiles (charbon et pétrole) étaient l'une des principales sources de S pour les cultures (≈ 80 kg $SO_3.ha^{-1}$). Ces émissions étant néfastes pour l'environnement (pour cause de pluies acides) et pour la santé (irritations et inflammations du système respiratoire et oculaire), des politiques de réduction de ces rejets industriels ont été mises en place (Protocole d'Helsinki en 1985, Protocole d'Oslo en 1994, Protocole de Kyoto en 1997) et ont permis de les réduire de 96 % entre 1973 et 2016 (4,5 kg $SO_3.ha^{-1}$, CITEPA, **Figure I.4**). Cette diminution de la déposition en SO_2 associée à l'exportation du S par les cultures intensives et les possibles pertes par lixiviation ont conduit à une oligotrophisation des sols en S et ont fait apparaître de façon récurrente des phénomènes de carence en S chez de nombreuses cultures (McGrath *et al*., 2002 ; McNeill *et al*., 2005 ; Scherer, 2001 ; Schnug *et al*., 1993). La fertilisation en S est donc devenue un sujet de préoccupation très prégnant au cours de la dernière décennie. Ainsi, il est préconisé par Terres Inovia d'apporter 30 unités de S (équivalent à 75 unités de SO_3, **Tableau II.2**) de façon systématique sur les cultures de colza (Terres Inovia). Cela reste une recommandation empirique car cet apport n'est pas toujours adapté aux conditions de culture (aléas climatiques, caractéristiques du sol, fertilisation, etc), aux précédents culturaux et au statut soufré du sol et de la plante. Il est également nécessaire de prendre en compte les interactions S, N et C pour comprendre l'impact d'une carence en fertilisants S. Ces interactions seront décrites plus en détails dans le **Chapitre III.2**.

II. La nutrition et le métabolisme soufré

II.1 Importance et rôles des composés soufrés

Le soufre est un macroélément essentiel dans le métabolisme des végétaux car il entre dans la composition de nombreuses molécules aux fonctionnalités très variées telles que les acides aminés (cystéine et méthionine), les protéines, les vitamines et de nombreux composés secondaires (**Figure II.6**).

La cystéine fait partie avec la méthionine des acides aminés soufrés (*i.e.* essentiel pour la méthionine et non essentiel pour la cystéine). Elle joue un rôle particulièrement important dans la



<u>Figure II.7</u> : Synthèse et cycle redox du glutathion. Le glutathion sous sa forme réduite (**GSH**) est synthétisé à partir de 3 acides aminés; le glutamate, la cystéine et la glycine ceci en deux étapes nécessitant de l'énergie sous forme d'ATP, faisant intervenir consécutivement deux enzymes: la glutamate cystéine ligase (*<u>GCL</u>*) et la glutathion synthétase (*<u>GSHS</u>*). Le GSH peut par la suite être impliqué dans des réactions d'oxydo-réduction en utilisant par exemple une glutathione peroxydase (*<u>GPx</u>*) afin de réduire un composé oxydant pouvant être une espèce réactive de l'oxygène (ROS) comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le GSH est alors convertit sous sa forme oxydée (GSSG) et est régénéré sous sa forme réduite par une réaction enzymatique faisant intervenir la glutathion réductase (*<u>GR</u>*) qui nécessite le co-facteur NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) afin de finir le cycle redox. *Les enzymes sur le schéma sont en italique soulignées.*

structure des protéines grâce à son groupement thiol permettant d'établir des ponts disulfures qui définissent la structure tertiaire des protéines (Lewandowska et Sirko, 2008). La cystéine est le précurseur de la synthèse d'autres molécules soufrées comme la méthionine et le glutathion, tripeptide existant sous forme réduite (GSH) ou oxydée (GSSG), qui est un co-facteur contrôlant l'état d'oxydo-réduction des groupements thiols cellulaires (**Figure II.7**). Le glutathion va par exemple permettre la régénération de l'acide ascorbique ou vitamine C (réaction de défense anti-oxydante) ou la régulation d'activités enzymatiques. Il a un rôle de protection des cellules contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) lors de réponses à différents stress (Foyer et Noctor, 2011 ; Ribas *et al*., 2014). Le glutathion peut notamment intervenir dans la détoxication de xénobiotiques (substances étrangères comme les herbicides ; Dixon *et al*., 2010). Le GSH est aussi le précurseur de la synthèse des phytochélatines, permettant une certaine résistance des plantes face aux ions métalliques (Leustek et Saito, 1999). Il existe un acide aminé soufré dérivé de la cystéine, le S-methylcystéine sulfoxyde (SMCSO ou méthiine), dont les rôles ne sont pas encore très clairs chez les végétaux (Edmands *et al*., 2013) (**Figure II.6**). Il a été proposé différentes voies de synthèse du SMCSO : par méthylation directe de la cystéine, pour former la S-méthyl-L-cystéine, suivie d'une oxydation (Thompson et Gering, 1966), ou par production de S-méthyl-L-cystéine par réaction de la sérine avec du méthyl mercaptan, en utilisant le fragment thiométhyle de la méthionine, à nouveau suivie d'une oxydation (Arnold et Thompson, 1962). Le SMCSO est retrouvé en forte concentration chez les Brassicacées telles que le chou-fleur ou les choux de Bruxelles (Marks *et al*., 1992), et notamment chez le colza où son accumulation peut représenter 12 à 32 % des acides aminés totaux foliaires et est une forme de transport très importante du S dans le phloème (Gaudin, 2013). Le groupement thiol de la cystéine est impliqué dans la formation des centres fer-soufre de protéines telles que la nitrogénase, indispensable à la fixation du N_2 chez les légumineuses, ou la ferrédoxine, protéine extrinsèque de la membrane thylakoïdienne, permettant le transfert d'électrons vers le NADP lors de la phase lumineuse de la photosynthèse. La cystéine est également impliquée dans la voie d'assimilation du nitrate et de l'ammonium et permet le transfert d'électrons lors du fonctionnement de la nitrite réductase. D'autres molécules soufrées interviennent dans une multitude de voies clés du métabolisme, comme la photosynthèse, le cycle de Krebs (coenzyme-A), l'assimilation du N et du S, la synthèse et la dégradation des protéines ou encore la réponse au stress oxydatif (Lindahl et Kieselbach, 2009 ; Takahashi *et al*., 2011b).

La méthionine, acide aminé essentiel initiateur de la traduction des protéines, est également le précurseur de la S-adénosylméthionine (SAM), une molécule impliquée dans les processus de méthylation notamment lors de la synthèse des chlorophylles, de certaines bases azotées (retrouvées

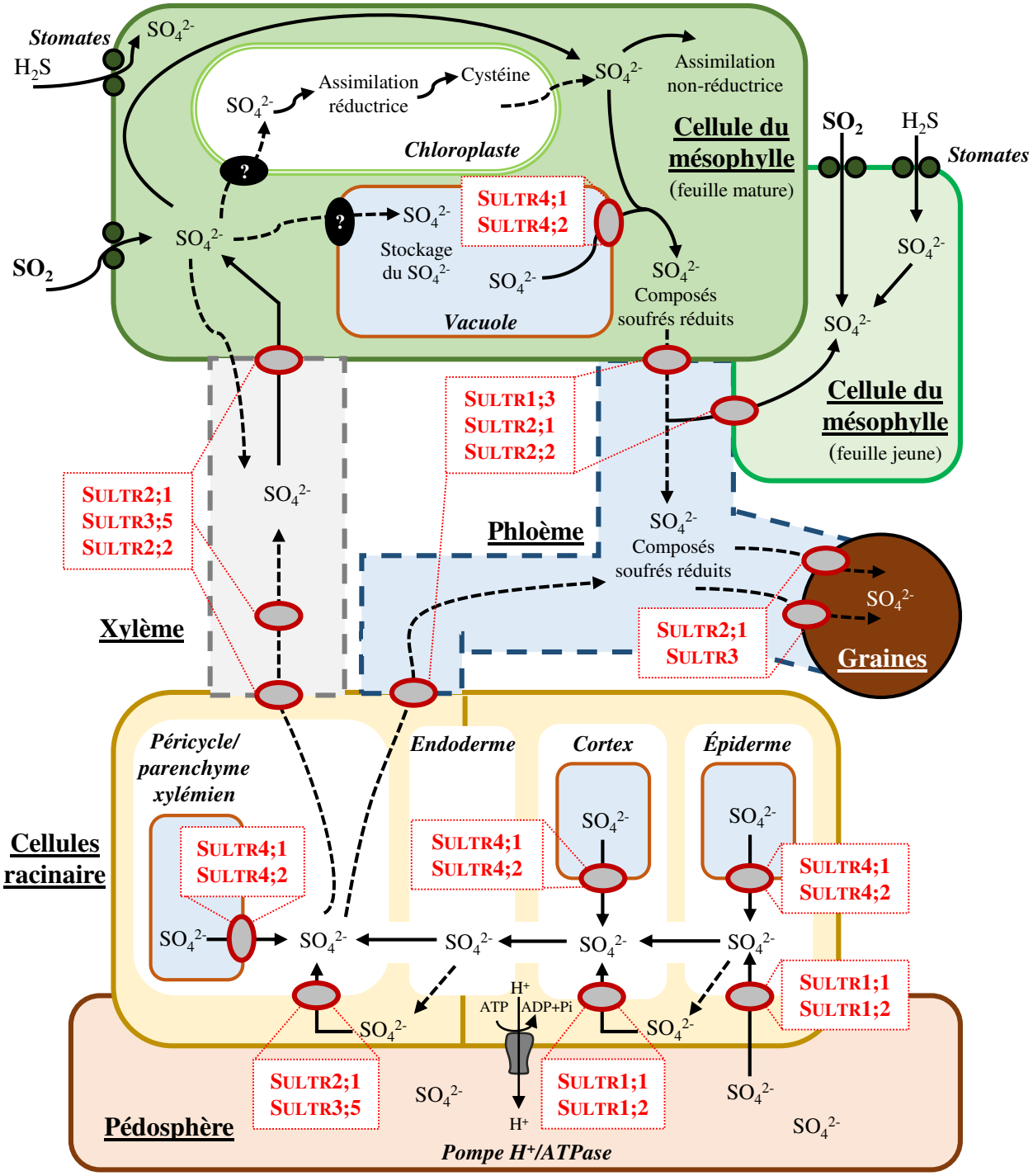


Figure II.8 : Acquisition et transport du sulfate (SO_4^{2-}) chez les Brassicacées.
Le SO_4^{2-} absorbé au niveau racinaire peut-être stocké dans la vacuole ou assimilé dans les plastes des cellules racinaires. Il est cependant rapidement soit transporté vers les parties aériennes *via* le xylème. Par la suite, le SO_4^{2-} est déchargé dans les cellules du mésophylle où il est soit stocké dans les vacuoles (pool mobile de SO_4^{2-} disponible pour la remobilisation), soit assimilé par les voies d'assimilation réductrice (dans les chloroplastes) et non réductrice (voir Figure II.11). Les composés réduits susceptibles d'être véhiculés *via* le phloème sont le glutathion, les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine, méthiine (SMCSO)) et autres dérivés de la méthionine tels que la S-méthylméthionine (SMM). Les ovales rouges indiquent les transporteurs de SO_4^{2-} (SULTR) permettant le transport du SO_4^{2-} au travers de la membrane plasmique ou l'efflux de SO_4^{2-} de la vacuole. Les flèches en pointillées indiquent des voies de transport putatives. Modifié d'après D'Hooghe (2013), Buchner *et al*. (2004) et Takahashi *et al*. (2011b).

dans des composés tels que les polyamines, la nicotianamine et les phytosidérophores) et de l'éthylène (hormone végétale) (Hesse et Hoefgen, 2008 ; **Figure II.6**). La SAM est le précurseur de la S-méthylméthionine (SMM) qui peut être une forme de transport du S réduit dans la plante *via* le phloème (Bourgis *et al*., 1999).

Le soufre entre aussi dans la composition des sulfolipides qui sont localisés dans les membranes thylakoïdiennes. En rendant plus fluide ces membranes, les sulfolipides permettent d'augmenter l'efficacité de la photosynthèse (Ahmad et Abdin, 2000a, 2000b). Les glucosinolates et isothiocyanates, molécules soufrées donnant aux Brassicacées leur goût piquant (moutarde, choux, etc), jouent un rôle dans la défense des plantes face à des stress biotiques (e.g. invasion d'insectes ; activités antibactériennes et antifongiques) ou abiotiques (Lambrix, 2001 ; Rausch et Wachter, 2005 ; Wittstock et Halkier, 2002). Le soufre intervient également dans la synthèse d'acide lipoïque et de thionines qui sont aussi connus pour permettre une meilleure résistance face aux pathogènes (**Figure II.6**).

II.2 Absorption, transport et assimilation du S dans la plante

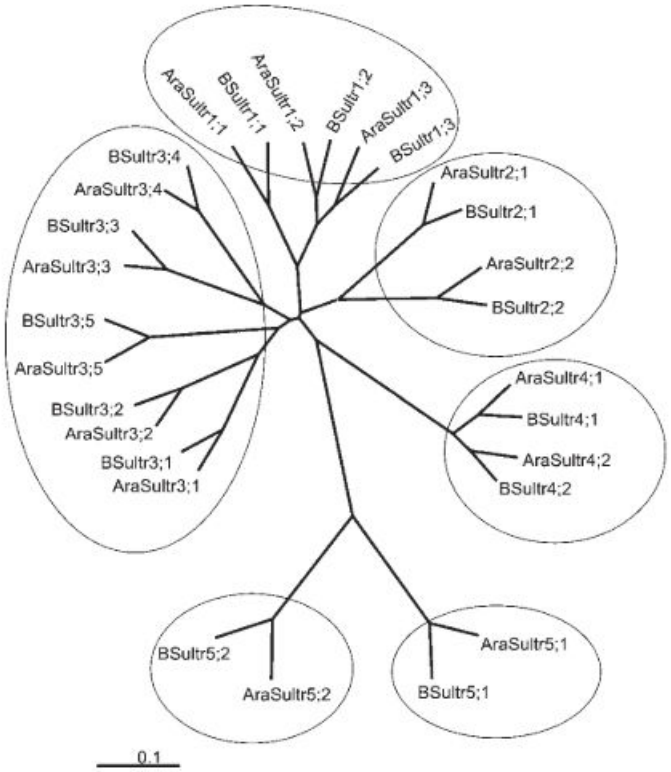
II.2.a Absorption et transport

L'acquisition du S peut se faire au niveau foliaire par différentes formes de S présentes dans l'atmosphère : le dioxyde de S (SO_2) qui est la forme la plus abondante présente dans l'atmosphère, l'hydrogène sulfuré (H_2S), le carbonyl de S (COS) et le méthyl captane (CH_3-SH) très néfaste pour la couche d'ozone. Il existe 3 voies possibles d'entrée du S atmosphérique (principalement le SO_2) : la voie majoritaire et privilégiée est l'entrée par les stomates (**Figure II.8**), mais le S peut aussi traverser la cuticule sous forme de dépôt humide (pluie acide) ou sec. Au sein de l'apoplasme des cellules du mésophylle, le S sera par la suite solubilisé puis converti en sulfite d'hydrogène (HSO_3^-) qui sera à son tour converti en sulfate (SO_4^{2-}) par la sulfite oxydase. Le SO_4^{2-} pourra passer la membrane plasmique *via* un système de symport ($SO_4^{2-}/3H^+$; voir ci-après les différents transporteurs). L'acquisition du S par voies atmosphériques ne constitue qu'une part mineure de l'absorption de S chez les Brassicacées, surtout dans un contexte de diminution des émissions industrielles en S (Leustek et Saito, 1999).

Au niveau racinaire, le sulfate (SO_4^{2-}) est la forme principale de S absorbée par les plantes. Une fois prélevé, le SO_4^{2-} peut être stocké au niveau vacuolaire ou assimilé par les cellules racinaires (**Figure II.8**). Cependant, il est assez rapidement distribué dans le reste de la plante pour subvenir à ses besoins. L'absorption et le transport du sulfate sont possibles grâce à la présence de transporteurs de sulfate, dont la localisation peut être racinaire, foliaire, phloémienne, xylémienne

<u>Tableau II.3</u> : Les différents groupes de transporteurs de sulfate (SULTR) chez les Brassicacées : localisation et fonctions.

Groupe	Isoforme	Localisation	Rôle des transporteurs
1	SULTR1;1 SULTR1;2	Racinaire et foliaire	Transporteurs à haute affinité de sulfate pédosphérique, induis en cas de carence en S. SULTR1;2 est responsable de la majeur partie de l'absorption.
	SULTR1;3	Phloémique	Transport à haute affinité des tissus sources aux puits. Induit en cas de carence en S.
2	SULTR2;1 SULTR2;2	Racinaire et foliaire	Transport longue distance du sulfate. Sortie/entrée du xylème dans les racines et les feuilles (SULTR2;1) et chargement puis transport par le phloème dans les racines et les feuilles (SULTR2;2).
3	SULTR3;1 SULTR3;2 SULTR3;3 SULTR3;4 SULTR3;5	Foliaire (feuilles âgées) et graines (fruit)	Transport et allocation de sulfate entre l'embryon et l'enveloppes des graines. Potentiellement impliqué dans le déchargement par le phloème au niveau des tissus reproducteurs et distribution du sulfate dans la graine. Le produit d'expression du gène *Sultr3;5* interagit avec celui du gène *Sultr2;1* pour augmenter la V_{max} de ce dernier pour le transport de sulfate.
4	SULTR4;1 SULTR4;2	Ubiquiste (tonoplastique)	Remobilisation (efflux) du sulfate stocké au niveau vacuolaire. Induit en cas de carence en sulfate.
5	SULTR5;1	Racinaire et foliaire	Inconnu
	SULTR5;2		Transporteur de haute affinité à Molybdène



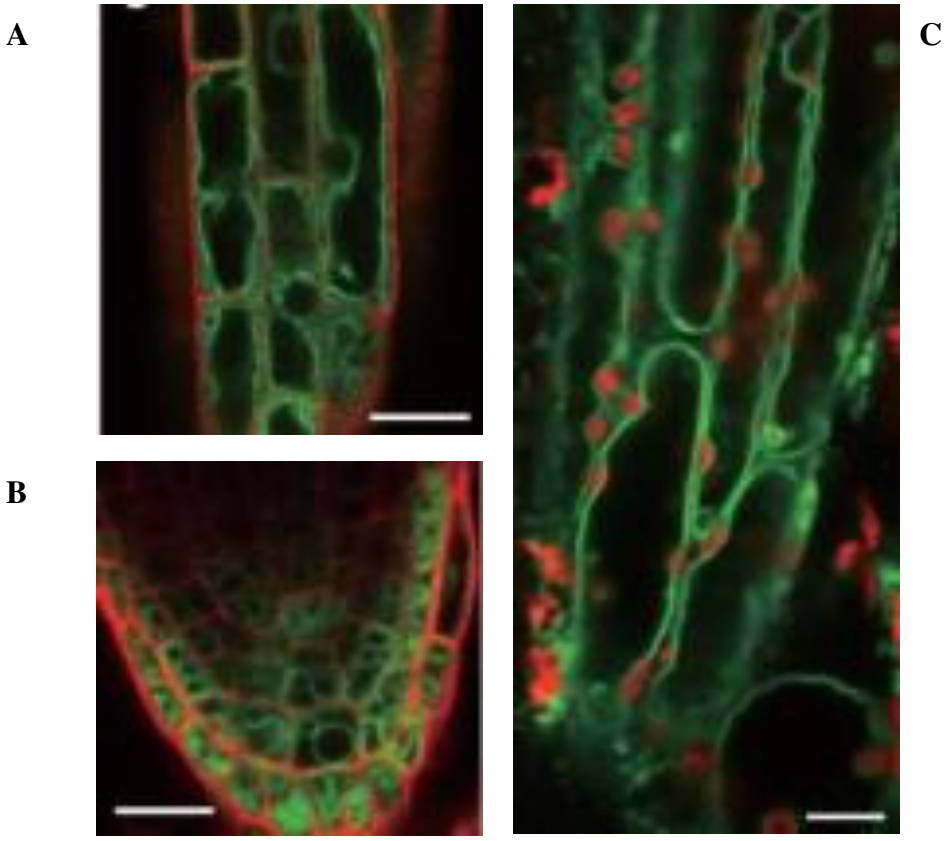
<u>Figure II.9</u> : Phylogénie des gènes codants des transporteurs de sulfate chez *A. thaliana* et *B. napus* (Parmar *et al.*, 2007).

ou grainière (**Figure II.8** ; **Tableau II.3**). Il en existe 14 chez *Brassica napus* et *Arabidopsis thaliana*, plante modèle faisant partie de la même famille que le colza, répartis en 5 groupes sur la base de leurs homologies de séquences (**Tableau II.3 ; Figure II.9** ; Buchner, 2004 ; Hawkesford, 2003 ; Parmar *et al*., 2007). Ces transporteurs fonctionnent comme des symports ($SO_4^{2-}/3H^+$) dont l'énergie nécessaire est fournie par un gradient de protons maintenu par une pompe H^+/ATPase. Chaque transporteur présente un profil d'expression une localisation, une activité et donc une fonction spécifique. Leurs expressions peuvent être modulées différemment en réponse à différents stress, notamment face à une limitation en S (Parmar *et al*., 2007).

Le sulfate est prélevé au niveau racinaire grâce à deux transporteurs du groupe 1 (SULTR1;1 et SULTR1;2) qui ont une haute affinité pour le sulfate (Km de 3,6 ± 0,6 µM et 6,9 ± 1,0 µM respectivement) et sont exprimés au niveau de l'épiderme et du cortex racinaire chez *A. thaliana* (**Figure II.8** ; **Tableau II.3**). Cependant, le transporteur SULTR1;2 semble être responsable de la majeure partie de l'absorption. Le transporteur SULTR1;3, également de haute affinité pour le sulfate, est un transporteur spécifique du phloème, localisé dans les cellules compagnes, et qui participerait directement au flux de S des organes sources (racines ou feuilles matures par exemple) vers les organes puits (jeunes feuilles ou graines) (Yoshimoto *et al*., 2003). En effet, le transport du S entre les différents organes de la plante se fait par le phloème sous forme essentiellement de SO_4^{2-} par l'intermédiaire de différents transporteurs (Hawkesford et De Kok, 2006 ; Takahashi *et al*., 2011a) mais également sous forme de GSH (Foyer *et al*., 2001), de méthionine (Balint et Rengel, 2011a), de SMM (Bourgis *et al*., 1999) et de SMCSO (Marks *et al*., 1992) qui constitue une forme majeure de transport de S organique dans la sève phloémienne chez le colza (Gaudin, 2013).

Les transporteurs du groupe 2 ont une faible affinité pour le sulfate (Km > 100 µM) et sont localisés dans les cellules des vaisseaux conducteurs xylémiens pour SULTR2;1 et phloèmiens pour SULTR2;2 (Hawkesford, 2003). Le transporteur SULTR2;1 est exprimé au niveau racinaire, dans les cellules du parenchyme xylémien et du péricycle et intervient dans le transport du sulfate des racines vers les feuilles (**Figure II.8**). Il est également exprimé au niveau foliaire dans les cellules parenchymateuses du xylème et du phloème, permettant le transport du sulfate entre l'apoplaste et les tissus conducteurs. Le transporteur SULTR2;2 est quant à lui plutôt impliqué dans la réallocation du sulfate dans la plante.

Les implications des transporteurs du groupe 3 dans le transport du sulfate ne sont pas encore clairement établies. En effet, la localisation de l'expression des gènes est dépendante de l'espèce étudiée et du stade de développement de la plante. SULTR3;5 aurait un impact positif sur l'activité du transporteur SULTR2;1, suggérant un rôle du transporteur SULTR3;5 dans le transport du sulfate



<u>Figure II.10</u> : Localisation tonoplastique des transporteurs SULTR4;1 et SULTR4;2 par constructions de gènes fusionnés avec de la GFP (« Green Fluorescence Protein »). Agrandissement sur des cellules épidermiques de l'apex racinaire avec le gène SULTR4;1-GFP (**A**) et GFP-SULTR4;2 (**B**). *La paroi cellulaire est contre-colorée avec de l'iodure de propidium.* Péricycle de l'hypocotyle avec localisation du gène SULTR4;2-GFP (**C**). *Le rouge montre l'autofluorescence des chloroplastes.*
Échelle : 20 µm (**A** et **B**), 10 µm (**C**). (Kataoka *et al.*, 2004b)

depuis 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'*A. thaliana*, interviendraient dans le transport du sulfate entre les différents tissus de la graine au cours de son développement (Zuber *et al*., 2010). Contrairement aux transporteurs des groupes 1 et 2, les transporteurs du groupe 3 ne sont pas régulés par la disponibilité en S.

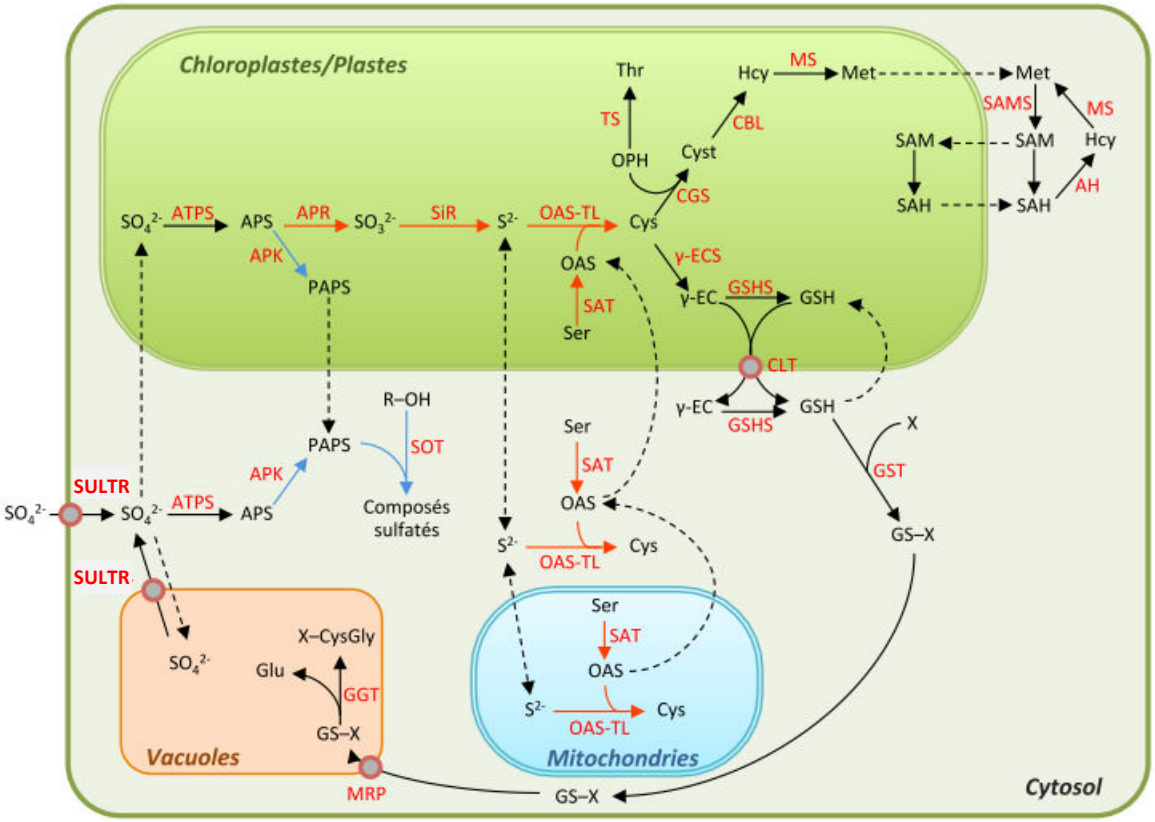
Les transporteurs du groupe 4 (SULTR4;1 et SULTR4;2) sont localisés dans le tonoplaste et sont responsables de l'efflux de sulfate depuis la vacuole (**Figure II.10** ; Kataoka *et al*., 2004b). Ils sont préférentiellement exprimés au niveau foliaire et racinaire dans les cellules périvasculaires chez *A. thaliana*. Ils sont fortement induits lors de la remobilisation et redistribution du sulfate vacuolaire préalablement stocké des organes sources (*i.e.* feuilles matures, des feuilles âgées, racines) aux organes puits (*i.e.* organes en croissance, graines) (Abdallah *et al.*, 2010 ; Blake-Kalff *et al.*, 1998 ; Girondé *et al*., 2014).

Les transporteurs du groupe 5 ont des fonctionnalités encore peu connues. Ils comprennent deux isoformes chez *A. thaliana* (AtSULTR5;1 et AtSULTR5;2) qui ont été initialement annotés en tant que transporteur de sulfate. Cependant, ce dernier groupe présentant moins de 13 % d'identité avec les autres groupes, il a été considéré comme une famille indépendante pouvant présenter une autre fonction que le transport de sulfate. Ainsi, le transporteur du groupe 5, précédemment annoté SULTR5;2, a ensuite été identifié comme étant le premier transporteur de molybdate chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Tejada-Jimenez *et al*., 2007) et *A. thaliana* (Baxter *et al.*, 2008 ; Bittner, 2014 ; Tomatsu *et al*., 2007) et a donc été renommé MOT1.

II.2.b Assimilation

Si l'acquisition du S (atmosphérique) se fait par voie foliaire, les composés gazeux peuvent rapidement se dissoudre dans l'apoplaste des feuilles, passer la membrane plasmique et intégrer la voie d'assimilation du sulfate, mais ces mécanismes sont encore mal connus (De Kok *et al*., 2005). De plus, cette voie n'est pas la plus courante et la plus efficace pour répondre aux besoins des plantes en S. L'acquisition majoritaire de S se fait par absorption racinaire de sulfate, qui une fois transporté jusqu'aux cellules foliaires, peut être soit stocké dans la vacuole, soit assimilé *via* deux voies métaboliques (**Figure II.11**) :

- **La voie d'assimilation non-réductrice dans le cytoplasme**. Le sulfate est directement activé en adénosine 5'-phosphosulfate (APS) par l'ATP sulfurylase (ATPS). L'APS est alors phosphorylée en 3'-phosphoadéniosine-5'-phosphosulfate (PAPS) par une APS kinase (APK) puis une réaction de sulfatation permet la synthèse de divers métabolites sulfatés tels



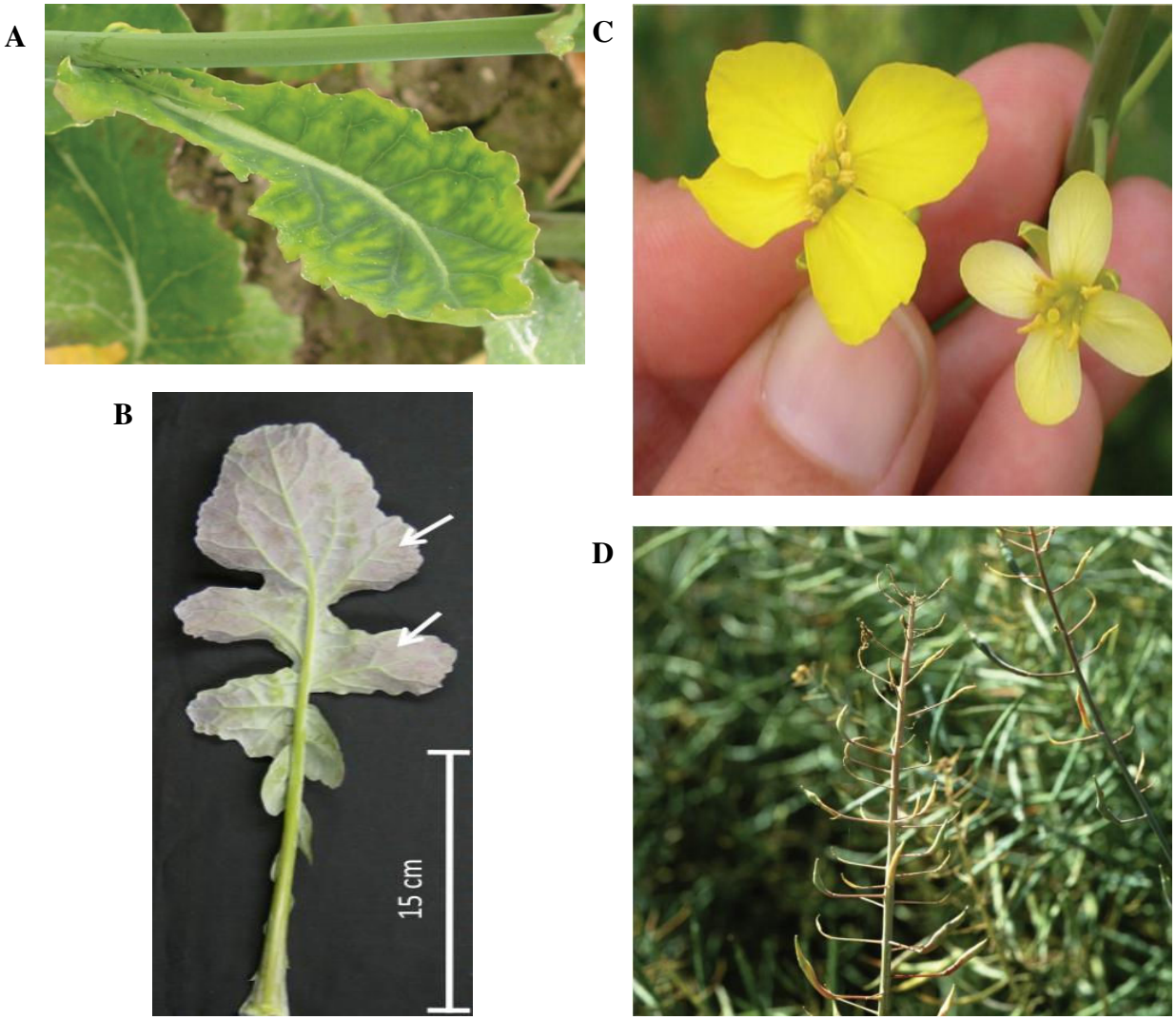
<u>Figure II.11</u> : Voies d'assimilation du soufre chez les Brassicacées.
Les ions et les métabolites sont indiqués en noir, les enzymes et transporteurs en rouge. Les cercles rouges représentent les transporteurs permettant le transport de métabolites au travers d'une membrane. Les lignes pointillées 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, est 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.
<u>Abréviations utilisées pour les métabolites</u> : APS : adénosine 5'-phosphosulfate, Cys, cystéine, Cyst : cystathionine, Glu : glutamate, GSH : glutathion réduit, GSiX : 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.
<u>Abréviations utilisées pour les enzymes et transporteurs</u> : 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, γECS : γ-EC synthétase, MRP : mul'drug resistance-associated protein, MS : méthionine synthase, OAS-TL : OAS thiol-lyase, SAMS : SAM synthétase, SAT : sérine acétyltransférase, SiR : sulfite réductase, SOT : sulfotransférase, SULTR : transporteur de sulfate, TS : thréonine synthase.
Traduit de Takahashi *et al*. (2011b), D'Hooghe (2013).

que des phytosulfokines ou des glucosinolates (très présents chez les Brassicacées) *via* l'action de sulfotransférases. Le principe repose sur la conjugaison du groupement sulfate du PAPS à une molécule organique comprenant un groupement hydroxyle libre. Cependant, chez les végétaux, l'assimilation non-réductrice n'est pas la voie majeure d'assimilation du sulfate.

- **La voie d'assimilation réductrice réalisée dans les plastes**. C'est la voie majoritaire d'incorporation du sulfate dans le métabolisme (Leustek et Saito, 1999). Une fois transporté au sein du plaste (cellule de racine) ou du chloroplaste (cellule du mésophylle) *via* des mécanismes encore inconnus, le sulfate va être activé en APS par une ATPS puis réduit en sulfite (SO_3^{2-}) par une APS réductase (APR), enzyme clé de cette voie d'assimilation (Kopriva et Koprivova, 2004 ; Koprivova et Kopriva, 2014). Au cours de cette réaction, le pouvoir réducteur nécessaire est apporté par le GSH (glutathion réduit). Le sulfite, qui peut être intégré à ce moment dans les sulfolipides, est cependant majoritairement réduit en sulfide (S^{2-}) par une sulfite réductase (SiR). Le sulfide permettra de produire le premier acide aminé soufré, la cystéine, en étant conjugué à la sérine préalablement activée en O-acétylsérine (OAS) par la sérine acétyltransférase (SAT : appartenant au complexe Cystéine Synthase). Cette réaction est catalysée par l'O-acétylsérine thiol-lyase (OAS-TL), une enzyme appartenant également au complexe Cystéine Synthase (Droux *et al.*, 1998). La cystéine produite peut alors être incorporée au sein du glutathion, des protéines, ou encore de vitamines et de coenzymes (Kopriva *et al.*, 2009 ; Leustek et Saito, 1999 ; **Figure II.6**).

III. Réponses de la plante face à une limitation en S et impacts sur la qualité des graines

De nombreux facteurs, tels que la diminution drastique des émissions de S dans l'atmosphère (**Figure I.4**), ont conduit à une forte diminution de la disponibilité des sols en S (McGrath *et al.*, 2002) faisant apparaître dans certaines régions d'Europe des carences en S pour les espèces les plus exigeantes en S. Le colza est une culture particulièrement exigeante en S et très sensible aux carences pouvant avoir des effets négatifs sur différents aspects du développement et de la physiologie de la plante. Les nombreux effets métaboliques et moléculaires d'une carence en S (Hawkesford et De Kok, 2006 ; Lewandowska et Sirko, 2008), variables selon le stade de développement où survient la limitation en S et l'importance des réserves en S préalablement accumulées (Dubousset *et al.*, 2010), peuvent conduire à terme à une baisse du rendement ou de qualité des graines.



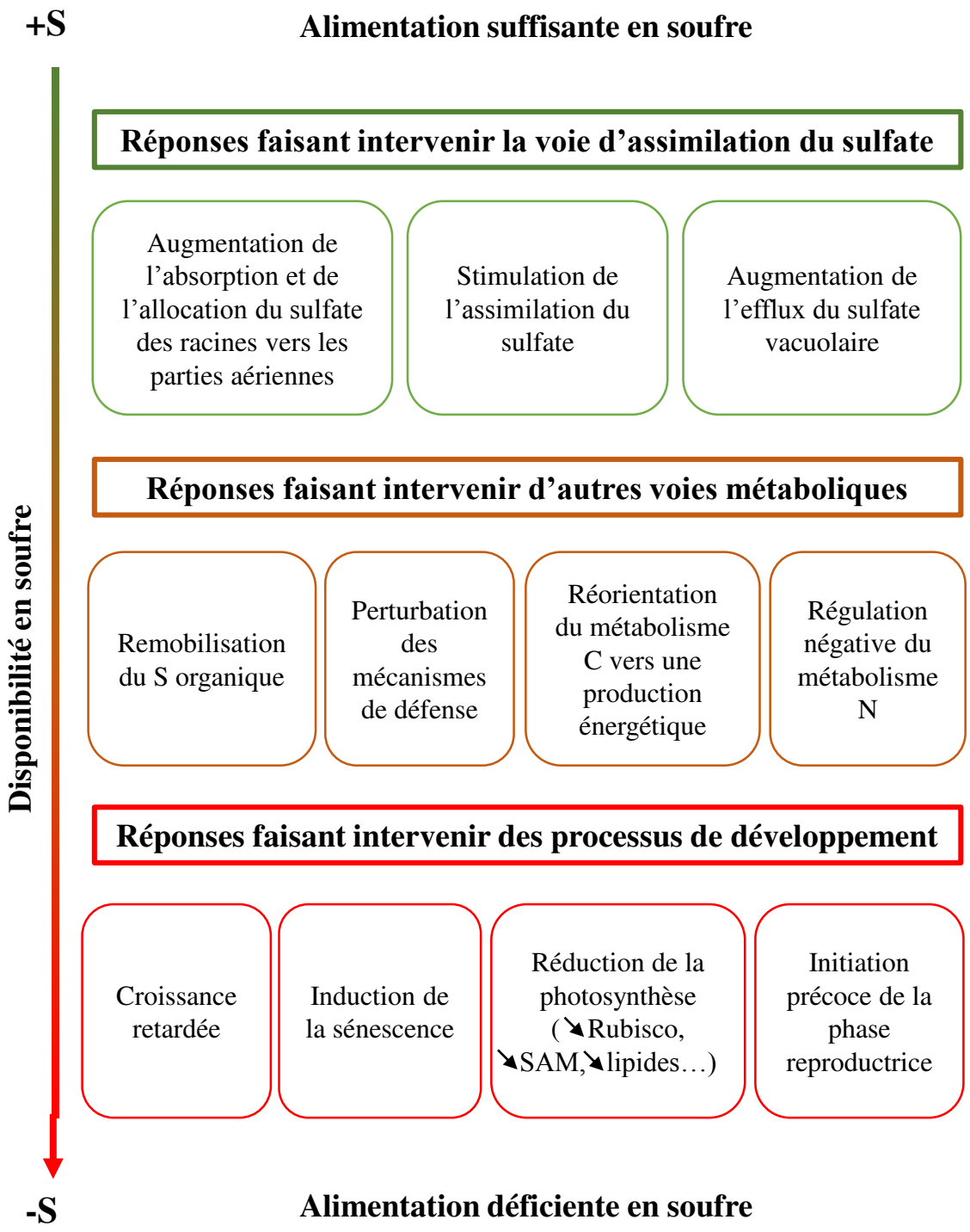
<u>Figure II.12</u> : Symptômes visuels de carence sévère en S. Chloroses sur les jeunes feuilles (**A**), apparition d'anthocyanes au niveau du limbe d'une feuille mature (les flèches blanches montrent le pic d'anthocyanes ; D'Hooghe *et al*., 2013b) (**B**), changements morphologiques des pétales (**C**) et déformation des siliques avec réduction du nombre de graines par siliques et enrichissement en anthocyanes (**D**) chez le colza en cours de maturation lors d'une carence sévère en S (Haneklaus *et al*., 2008).

Il est donc important de connaître les effets d'une limitation en S chez le colza afin de mieux l'intégrer dans les schémas de fertilisations et les pratiques culturales, tout en prenant en compte les interactions existant entre les métabolismes S, N et C. Le métabolisme S est en effet finement coordonné avec les métabolismes N et C (Hesse *et al*., 2004 ; Kopriva et Rennenberg, 2004), ce qui complexifie la compréhension de la réponse à une limitation ou privation en S.

Cependant, la compréhension des mécanismes physiologiques ou moléculaires spécifiquement impliqués lors d'une limitation en S chez le colza sont encore peu connus, la majorité des études se focalisant sur *A. thaliana*. Étant de la même famille (Brassicacées), les données disponibles chez *Arabidopsis* permettent néanmoins d'appréhender les réponses physiologiques et métaboliques du colza face à une limitation en S.

III.1 Symptômes de déficience en S et réponses physiologiques

Des symptômes de carence en S peuvent apparaître assez précocement chez le colza, dès les premiers stades de croissance des feuilles (Schnug et Haneklaus, 1998). Dans le cas d'une restriction sévère en S au stade végétatif (C2 ou GS32 ; Lancashire *et al*., 1991), des signes de chlorose apparaissent au niveau des jeunes feuilles, sous forme de marbrures caractéristiques qui commencent sur les bords puis se propagent sur le limbe (**Figure II.12A** ; Haneklaus *et al*., 2008). Si la limitation en S perdure dans le temps, les feuilles matures peuvent devenir de couleur pourpre-rougeâtre suite à l'accumulation d'anthocyanes (**Figure II.12.B ;** D'Hooghe *et al*., 2013b) indiquant l'apparition d'un stress oxydatif. Bien que systématiques lors de carences en S, ces symptômes ne sont pas spécifiques et peuvent être la cause de carence en d'autres éléments (Schnug et Haneklaus, 1998). La croissance des feuilles est affectée, diminuant ainsi le rapport de biomasse des parties aériennes sur celle des parties racinaires (Blake-Kalff *et al*., 1998). Lors de la floraison, d'autres symptômes apparaissent encore comme des fleurs aux pétales plus petits, de forme ovale et de couleur pâle en comparaison aux plantes non carencées qui présentent des pétales plus grands, plus arrondis et de couleur jaune vif (**Figure II.12.C**). Les répercussions d'une limitation en S appliquée dès le stade végétatif sur la formation des siliques et des graines peuvent être sévères, conduisant à un accroissement de la fréquence des avortements de siliques, à une diminution de la taille et du nombre de siliques et une baisse du nombre de graines qu'elles contiennent (Terres Inovia ; **Figure II.12.D**). En effet, étant donné la précocité de la limitation en S, les colzas n'ont accumulé que très peu de réserves soufrées (principalement sous forme de sulfate dans les vacuoles des feuilles) permettant de répondre à leurs besoins tout au long de leur cycle de développement. La remobilisation du S endogène n'est donc pas suffisante pour soutenir le développement et le rendement en graines est alors significativement réduit, pouvant chuter de plus de 45 % par rapport



<u>Figure II.13</u> : Modèle de hiérarchisation des modifications physiologiques et métaboliques induites par une limitation en S chez les végétaux. D'après Hawkesford et De Kok (2006), Hoefgen et Nikiforova (2008) et Lewandoswka et Sirko (2008).

à des plantes bien alimentées en S (Dubousset *et al.*, 2010 ; Janzen et Bettany, 1984 ; Malhi *et al.*, 2007 ; McGrath et Zhao, 1996).

De façon générale, la perception d'une limitation en S par la plante fait intervenir une cascade de réponses aboutissant à de nombreux changements physiologiques (**Figure II.13**). Selon l'intensité de la limitation en S, différentes modifications métaboliques et transcriptomiques vont avoir lieu, ayant des répercussions sur les métabolismes S, C et N (voir paragraphe III.2). Ces réponses peuvent être hiérarchisées en trois niveaux, selon l'intensité de la limitation en S. **Le premier niveau de réponse** (**Figure II.13**), lorsque la limitation en S est modérée, concerne principalement l'utilisation du S. En effet, l'absorption, l'assimilation et la remobilisation du S à partir des réserves de sulfate vacuolaires sont régulées par la disponibilité en S (Saito, 2004). **Le deuxième niveau de réponse** face à une limitation plus intense, a un retentissement sur d'autres voies métaboliques comme celles du C et de l'N qui sont finement coordonnées avec le métabolisme du S (Kopriva et Rennenberg, 2004 ; Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004) (**Figure II.13**). Pour subvenir aux besoins en S, la plante va s'orienter vers une remobilisation de composés soufrés organiques ce qui peut conduire à une perturbation des capacités de défense face à une attaque pathogène étant donné l'implication de ces composés soufrés tels que le glutathion et les glucosinolates dans les mécanismes de défense (Bloem *et al.*, 2004 ; Rausch et Wachter, 2005). **Enfin, le dernier niveau de réponse** implique des processus de développement (**Figure II.13**). L'activité photosynthétique va être fortement réduite notamment *via* la diminution de l'expression des gènes codant la Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygénase (RuBisCO). Ceci va conduire à une augmentation de la photorespiration, de la sénescence, à une diminution de la croissance de la plante (majoritairement des parties aériennes conduisant à une augmentation du rapport massique racines:parties aériennes) et à l'initiation précoce du développement des organes reproducteurs. Les principales réponses métaboliques et moléculaires à une restriction des apports en S sont décrites ci-après.

III.2 Réponses métaboliques et transcriptomiques

Les perturbations métaboliques en réponse à une limitation en S sont étroitement liées à des modifications de l'expression de protéines pouvant être par exemple des enzymes ou des transporteurs, résultant ou non de régulations transcriptomiques (Maruyama-Nakashita, 2003 ; Maruyama-Nakashita *et al.*, 2006). Chez *A. thaliana*, plus de 825 gènes présentent une modification de leur expression lors d'une limitation en S (Nikiforova *et al.*, 2004). Ces modifications se produisent au sein des métabolismes soufré, carboné et azoté étant donné leurs fines interactions intervenant au cours des processus de prélèvement (Fismes *et al.*, 2000), d'assimilation (Friedrich

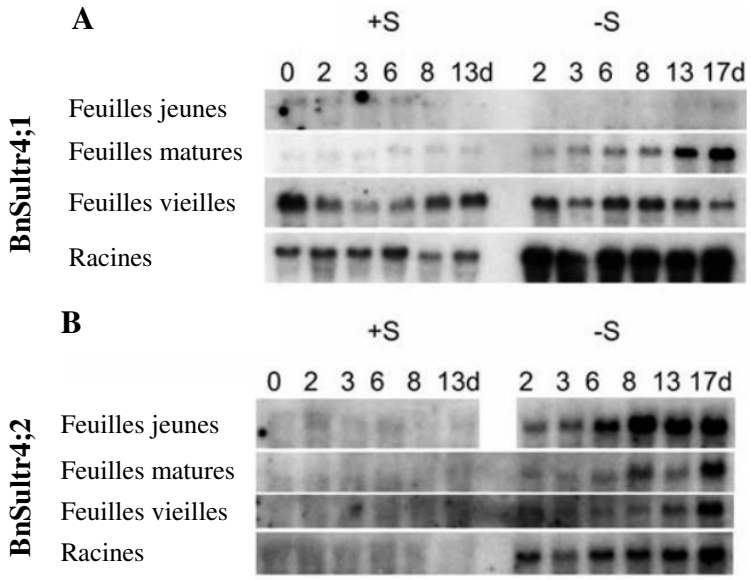


Figure II.14 : Niveaux d'expression (northern blots) des transporteurs de sulfate vacuolaires *BnSultr4;1* (A) et *BnSultr4;2* (B) dans différents organes de colzas soumis (-S) ou non (+S) à une privation en S appliquée au stade végétatif. *Bn pour Brassica napus*. D'après Parmar *et al*. (2007).

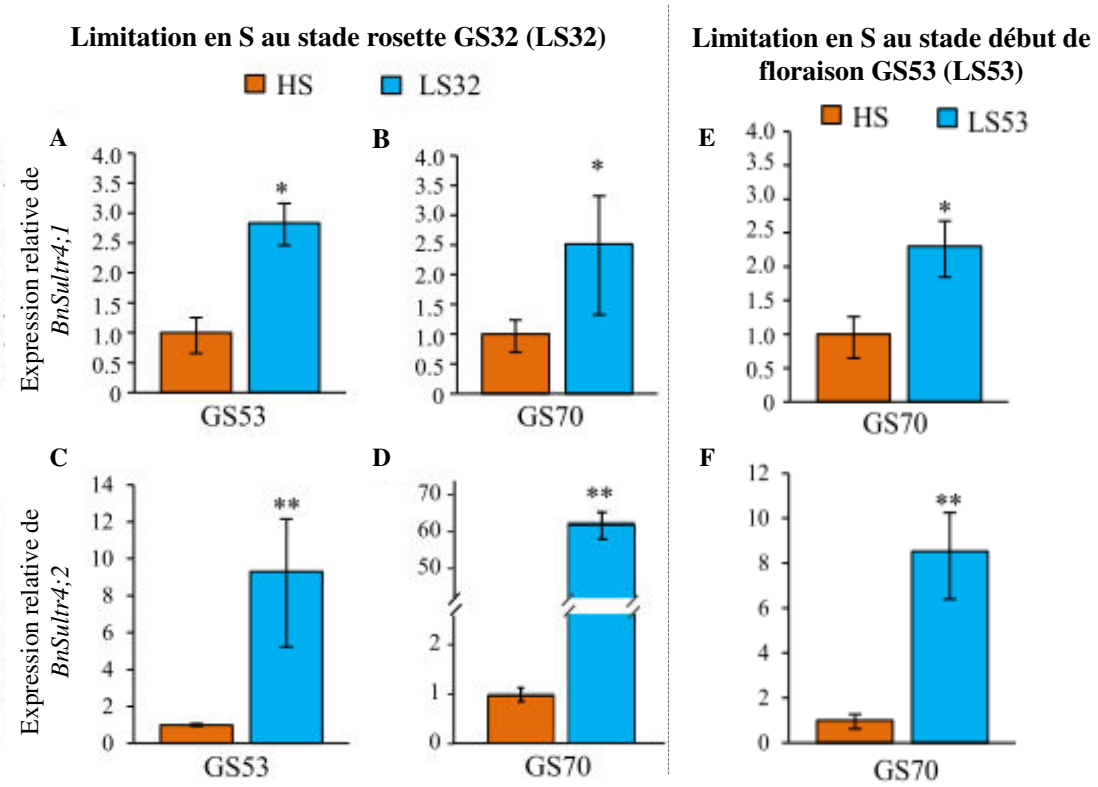


Figure II.15 : L'expression des gènes *BnSultr4;1* et *BnSultr4;2* varie en fonction du stade de début de limitation en S. Expression relative des gènes BnSultr4;1 (**A, B, E**) et ***BnSultr4;2*** (**C, D, F**) observées à GS53 (début de floraison) et/ou GS70 (début du remplissage des siliques) dans les feuilles sources de colzas soumis à une limitation en sulfate au stade GS32 (début de montaison, A, B, C et D) ou GS53 (début de floraison, E et F). Les plantes limitées en S (LS32 et LS53 : alimentées avec du sulfate 8.7 µM à partir de GS32 ou GS53) ont été comparées aux plantes témoins (HS : alimentées avec du sulfate 508.7 µM). Pour chaque stade de développement, la valeur 1 est attribuée au niveau de transcrits observés dans les feuilles sources des plantes HS. *Les différences significatives entre les traitements sont indiquées par des astérisques (n = 4; ∗ P <0.05; ∗∗ P <0.01)*. D'après Girondé *et al.* (2014).

et Schrader, 1978 ; Kopriva et Rennenberg, 2004) et de remobilisation (Dubousset *et al*., 2009, 2010).

III.2.a Modification du métabolisme soufré

Chez le colza et *A. thaliana*, une diminution de la disponibilité en S entraine une baisse importante des teneurs en sulfate et en composés soufrés réduits dans l'ensemble de la plante (Blake-Kalff *et al*., 1998). Parmi eux, les teneurs en glutathion, en cystéine et en SAM diminuent. Lors d'une limitation en S, l'absorption et l'assimilation du sulfate sera augmentée *via* une augmentation de l'expression des gènes codant les transporteurs impliqués dans les premières étapes de l'absorption et de la redistribution du sulfate.

En cas de déficience en sulfate, il est observé une forte induction de l'expression des gènes codant les transporteurs du groupe 1 (*Sultr1;1* et *Sultr1;2*) permettant une augmentation de l'absorption du sulfate (Parmar *et al*., 2007). Parallèlement, l'induction de l'expression des gènes et du groupe 4 (transporteurs vacuolaires ; *Sultr4;1* et *Sultr4;2*) au niveau des racines et des feuilles matures (Parmar *et al*., 2007 ; **Figure II.14**), permet une augmentation de la remobilisation du sulfate stocké dans les vacuoles vers les organes aériens en croissance (Dubousset *et al*., 2009 ; Kataoka *et al*., 2004b). L'expression du gène codant le transporteur SULTR2;1 est augmentée au niveau racinaire favorisant le transfert du S vers les parties aériennes mais est cependant réduite au niveau foliaire, pouvant limiter la remobilisation du S des feuilles âgées vers les feuilles jeunes (Takahashi *et al*., 2000). Au niveau foliaire, des études par marquage isotopique au ^{34}S ont montré que l'augmentation de l'expression des transporteurs vacuolaires SULTR4;1 et SULTR4;2 est corrélée à une remobilisation du sulfate vacuolaire des feuilles âgées vers les feuilles jeunes en croissance ou vers les organes reproducteurs et les graines (Girondé *et al*., 2014) (**Figure II.15**).

Une limitation en S va stimuler l'assimilation du sulfate par la forte induction de l'expression de gènes codant notamment l'APR et l'ATPS, augmentant ainsi l'activité de ces enzymes impliquées dans l'assimilation du sulfate (Koralewska *et al*., 2007 ; Lappartient *et al*., 1999 ; Reuveny *et al*., 1980). Il existe aussi des régulations post-traductionnelles, permettant à la plante de s'adapter assez vite à une limitation en S (Droux *et al*., 1998), comme la régulation du complexe cystéine synthase comprenant les enzymes sérine acétyl-transférase (SAT) et O-acétylsérine thiol-lyase (OAS-TL). Lors d'une limitation en S, de l'OAS va s'accumuler et induire la dissociation du complexe, rendant la SAT inactive, tandis que l'ensemble des OAS-TL restent actives (Wirtz et Hell, 2006 ; **Figure II.16**). Les gènes codant la SAM synthétase et l'adénosylhomocystéinase, enzymes impliquées dans le recyclage de la SAM en méthionine, sont induits lors d'une restriction en S (Nikiforova *et al*., 2004) ainsi que les gènes codant les enzymes des cycles glutathion-peroxydase et ascorbate-

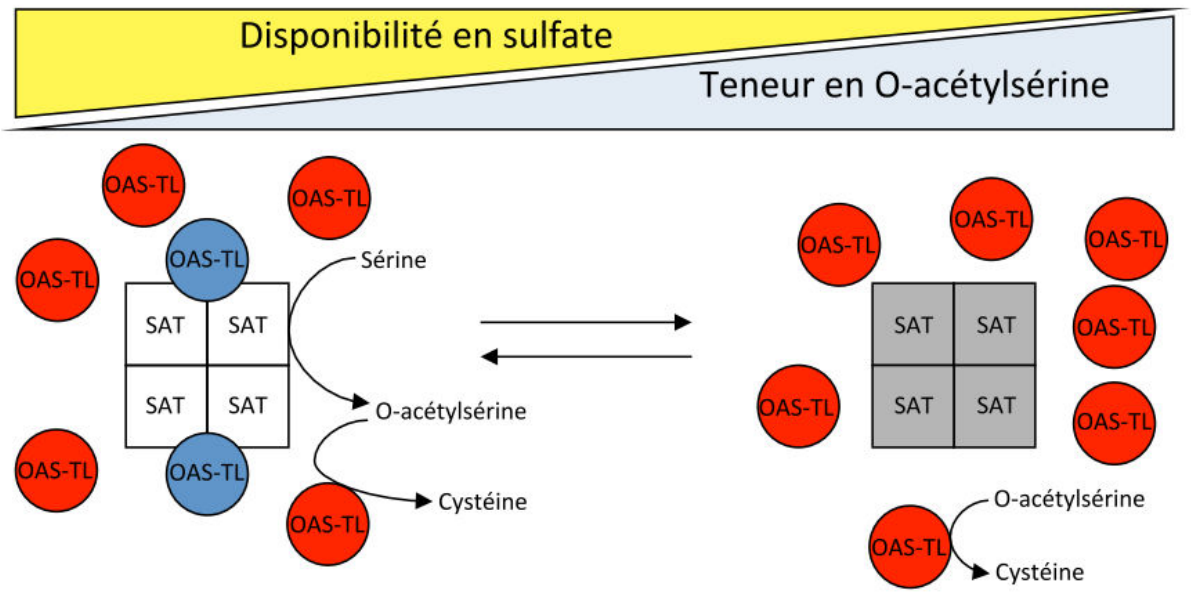


Figure II.16 : Équilibre du complexe cystéine synthase (SAT/OAS-TL) en fonction de la disponibilité en sulfate. Les carrés blancs et gris représentent la sérine acétyltransférase (SAT) active et inactive respectivement. Les cercles rouges et bleus représentent l'O-acétylsérine thiol-lyase (OAS-TL) active et inactive, respectivement. D'après Wirtz et Hell (2006).

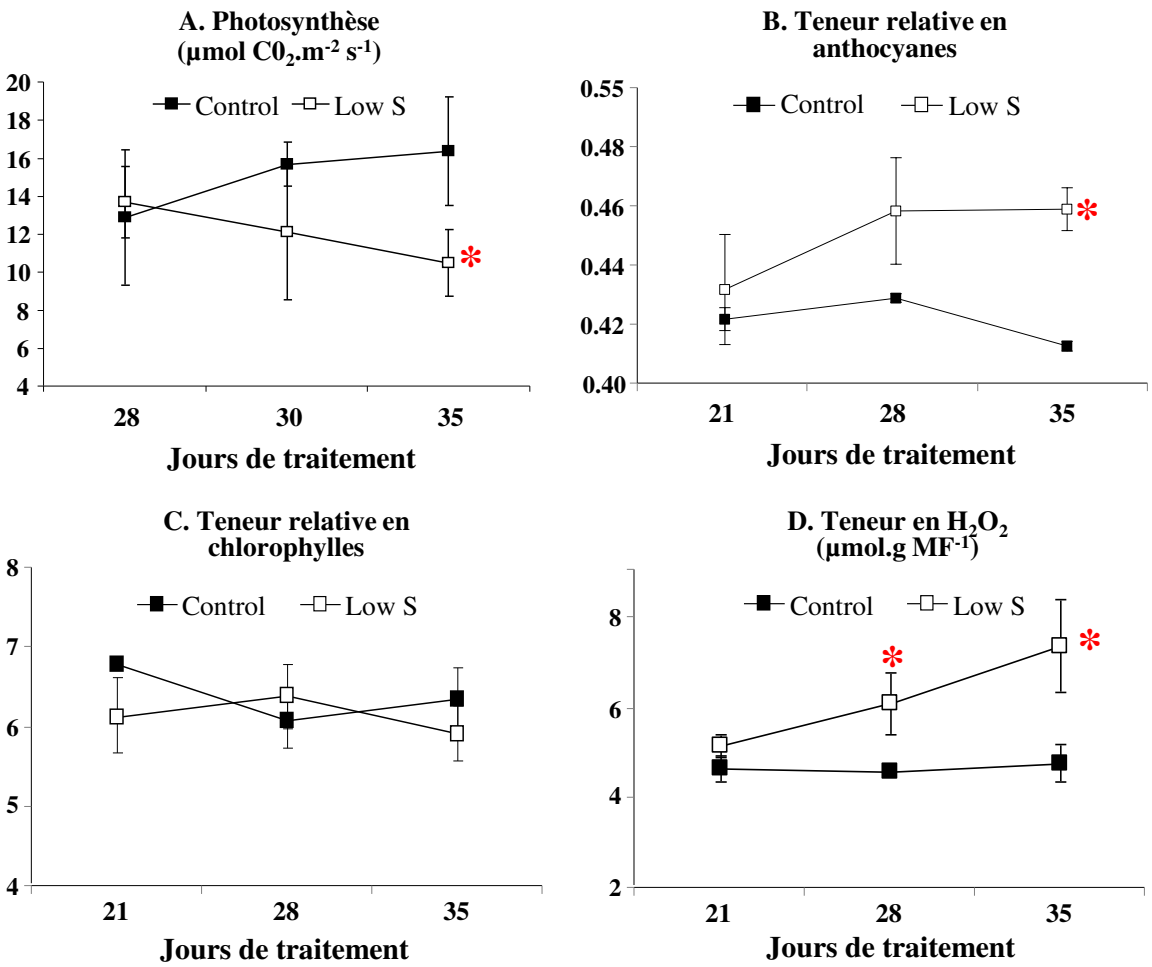


Figure II.17 : Impact d'une limitation en sulfate (Low S) appliquée pendant 35 jours chez un colza au stade rosette sur l'activité photosynthétique (A) et les teneurs relatives en anthocyanes (B), en chlorophylles (C) et en H_2O_2 (D) dans les feuilles matures. *L'astérisque indique une différence significative ($p < 0.05$).* D'après D'Hooghe *et al.* (2013b).

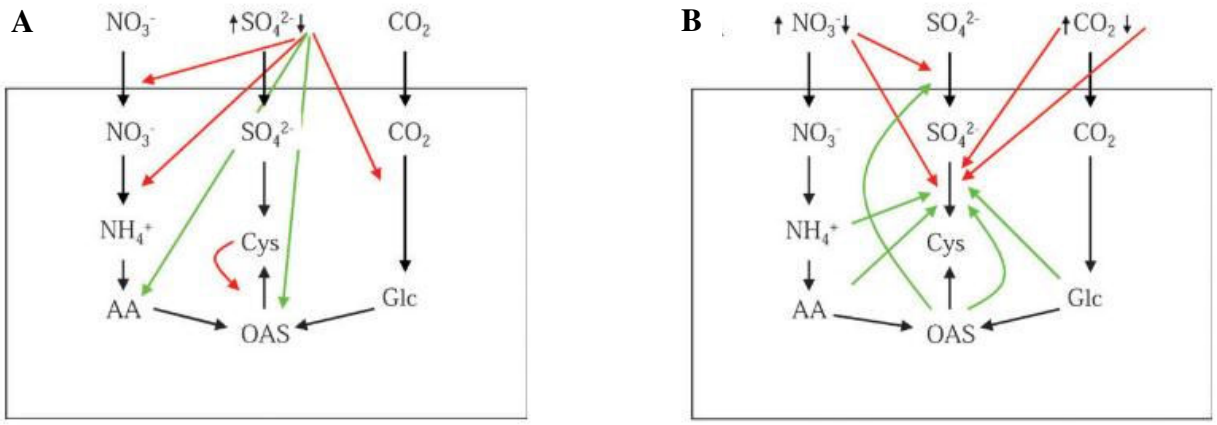
glutathion, permettant de maintenir le glutathion sous sa forme réduite (propriétés de défense contre les stress).

III.2.b Interaction avec le métabolisme carboné

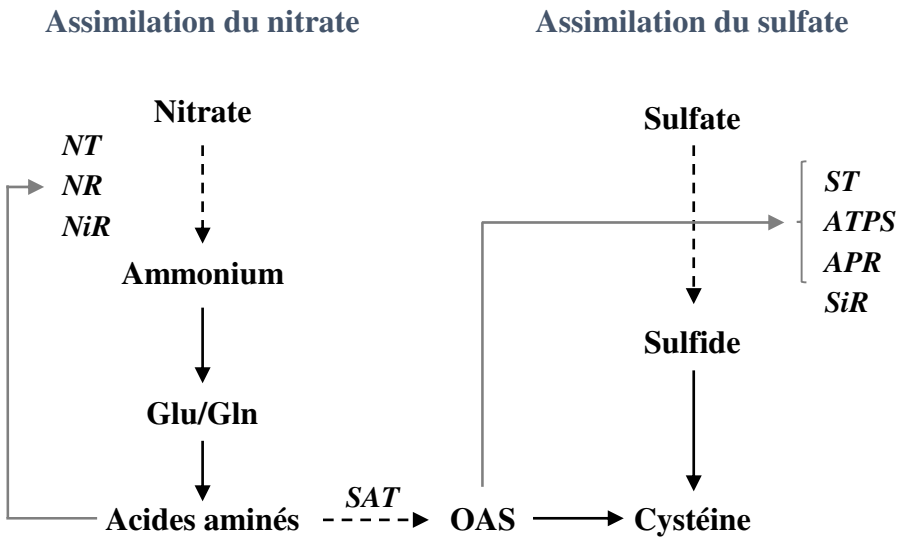
Une limitation en S appliqué pendant 35 jours au stade rosette chez le colza va diminuer l'activité photosynthétique et est associée avec l'accumulation d'anthocyanes au niveau des feuilles matures (D'Hooghe *et al*., 2013b ; **Figure II.17-A** et **B**). Cependant, la diminution de l'activité photosynthétique n'est pas liée à une baisse de la teneur en chlorophylles (**Figure II.17-C**), qui reste maintenue à un niveau comparable aux plantes bien alimentées en S mais serait la cause d'une altération des phases finales du transfert d'électrons (répression de la plastocyanine et de la ferrédoxine NADP réductase), entraînant un stress oxydatif *via* la production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au niveau chloroplastidial (D'Hooghe *et al*., 2013b). Celui-ci est confirmé par l'accumulation d'anthocyanes (**Figure II.17-B**) et d'H_2O_2 (**Figure II.17-D**), ainsi que l'induction de systèmes de protection contre ce stress oxydatif (D'Hooghe *et al*., 2013b). Les teneurs en GSH étant limitantes dans un contexte de limitation en S (réduction de l'expression de la glutathion S-transférase), de nouveaux systèmes sont mis en places afin de répondre au stress oxydatif. Les travaux de (Nikiforova *et al*., 2003) chez *A. thaliana* suggèrent que la réduction des capacités photosynthétiques observée face à une limitation en S (**Figure II.18-A**) pourrait aussi être liée à de nombreuses altérations des centres fer-soufre des protéines du photosystème I. Une perte de fluidité membranaire des thylakoïdes causée par la diminution de sulfolipides qui peut aussi conduire à un stress oxydatif (Nikiforova, 2005). De plus, l'activité photosynthétique va être réduite notamment *via* la diminution de l'expression des gènes codant la Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygénase (RuBisCO), enzyme principale de la photosynthèse (**Figure II.18-A**). Après un stade avancé de limitation en S, la teneur en SAM, précurseur de la synthèse de chlorophylle, diminue contrairement à la teneur en méthionine, pouvant être expliqué par l'induction de l'expression de gènes codant deux enzymes (SAMS : SAM synthétase et AH : adénosyl-homocystéinase) impliquées dans le recyclage de la SAM en méthionine (Nikiforova *et al*., 2004).

III.2.c Interaction avec le métabolisme azoté

Selon Janzen et Bettany (1984), l'impact d'une limitation en S est aggravé par une fertilisation en N trop élevée. Dans leur expérimentation, les plantes ne recevant pas d'N ne présentaient pas de symptômes apparents de stress en S, alors que les plantes recevant une fertilisation en N, en particulier à une dose élevée, présentaient des symptômes suggérant de graves désordres physiologiques de la nutrition N.



<u>Figure II.18</u> : Représentation schématique des interactions entre l'assimilation du S, de l'N et du C. (**A**) Régulation de l'assimilation du N et du C en fonction de la disponibilité en S et des composés soufrés. (**B**) Régulation de l'absorption et de la réduction du sulfate (SO_4^{2-}) par l'assimilation de l'azote (nitrate : NO_3^-) et du carbone (dioxyde de carbone : CO_2). *Les flèches rouges représentent la répression des étapes métaboliques, les vertes l'induction des processus ou l'augmentation de la teneur en métabolites (flèches dirigées vers les métabolites).* AA : acides aminés, Glc : glucose, OAS : O-acétylsérine (Kopriva et Rennenberg, 2004).



<u>Figure II.19</u> : Interactions du métabolisme S avec le métabolisme N. Lien présumé de l'assimilation des nitrates et des sulfates *via* la O-acétylsérine (OAS). Le schéma présenté montre le parallélisme des deux voies d'assimilation de l'absorption à la réduction et à l'oxydation des composés inorganiques dans les composés organiques. Les lignes pleines représentent les flux de métabolites, les lignes grises sont des boucles de contrôle probables. OAS : O-acétylsérine, Gln : glutamine, Glu : acide glutamique/glutamate, NT : transporteur de nitrate, NR : nitrate réductase, NiR : nitrite réductase, ST : transporteur de sulfate, ATPS : ATP sulfurylase, APR : APS réductase, SiR : sulfite réductase, OASTL : O-acétylsérine (thiol)-lyase, SAT : sérine acétyltransférase.
D'après Hesse *et al.*, (2004).

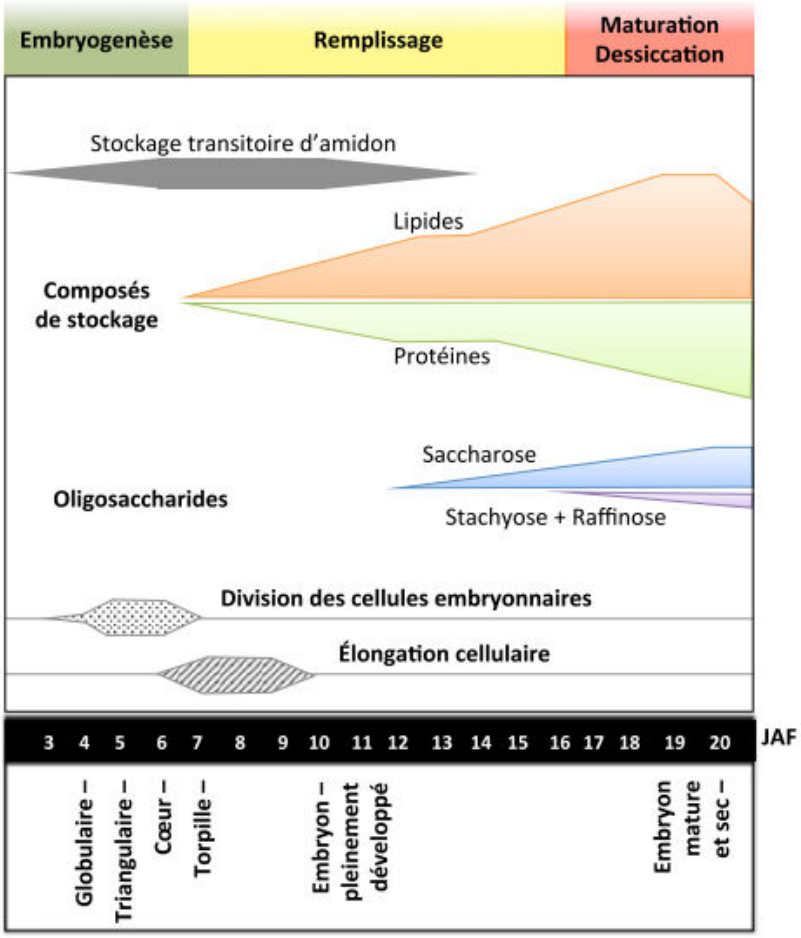
La baisse importante de la teneur en sulfate et en composés soufrés survenant lors d'une limitation en S conduit à un déséquilibre du ratio N/S notamment chez l'orge, l'épinard et le colza (Karmoker *et al*., 1991 ; McGrath et Zhao, 1996 ; Prosser *et al*., 2001) (**Figure II. 18-A**). Chez *A. thaliana*, la diminution de la synthèse d'acides aminés soufrés entraîne une accumulation d'acides aminés non soufrés telles que la sérine, précurseur de l'OAS elle-même précurseur de la cystéine, la glycine, la glutamine, l'asparagine ou encore le tryptophane (Nikiforova, 2005 ; Nikiforova *et al*., 2004) et régule positivement l'expression de l'APS réductase et des transporteurs de sulfate (**Figure II.19**). Ces accumulations d'acides aminés vont inhiber les voies d'absorption et d'assimilation du nitrate, *via* la baisse des activités nitrate réductase (NR) et glutamine synthétase (GS) (Kopriva et Rennenberg, 2004) dû à la répression des gènes codant ces enzymes (Hirai *et al*., 2005 ; Hirai et Saito, 2004 ; Nikiforova, 2005) (**Figures II.18-A** et **II.19**). 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.

III.3 Impacts d'une limitation en S sur la qualité des graines

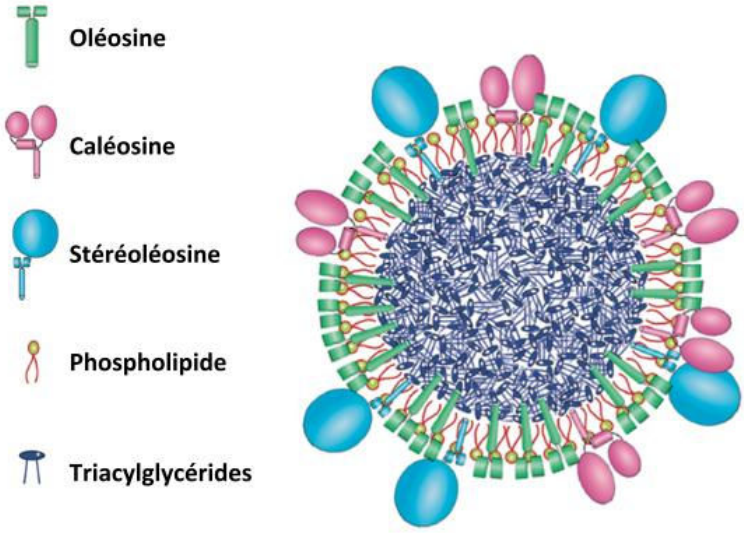
Dans le cycle de vie des spermatophytes ou « plantes à graines », la graine est l'organe de dissémination contenant et protégeant l'embryon, dans l'attente de conditions favorables à la germination. Elle contient des réserves (huile, protéine, glucides), accumulées au cours de sa formation, fournissant l'énergie nécessaire à la germination et au développement de l'embryon. Les graines de colza sont réputées pour leur richesse en huile et en protéines riches en acides aminés soufrés (méthionine et cystéine). Lors d'une limitation en S, le rendement ainsi que la qualité des graines peuvent être grandement affectés, d'autant plus lorsque la restriction survient tôt dans le cycle de développement. En revanche, si les réserves en S accumulées au cours du cycle sont suffisantes, les graines de colza peuvent, grâce à des compensations métaboliques spécifiques, maintenir le rendement grainier et/ou la qualité nutritionnelle des graines lors d'une limitation en S modérée. Après un rappel des connaissances sur le développement et la germination des graines d'oléoprotéagineux, les impacts d'une déficience en S seront décrits plus particulièrement sur la qualité nutritionnelle et physiologique de la graine de colza.

III.3.a La graine de colza : développement et germination

La graine est composée de trois principaux tissus constitués après une « double fécondation », caractéristique des Angiospermes : le tégument (tissus protecteurs), l'albumen (tissus de réserves) et l'embryon. Tout au long du développement de la graine, de nombreux évènements physiologiques



<u>Figure II.20</u> : 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) par D'Hooghe (2013).

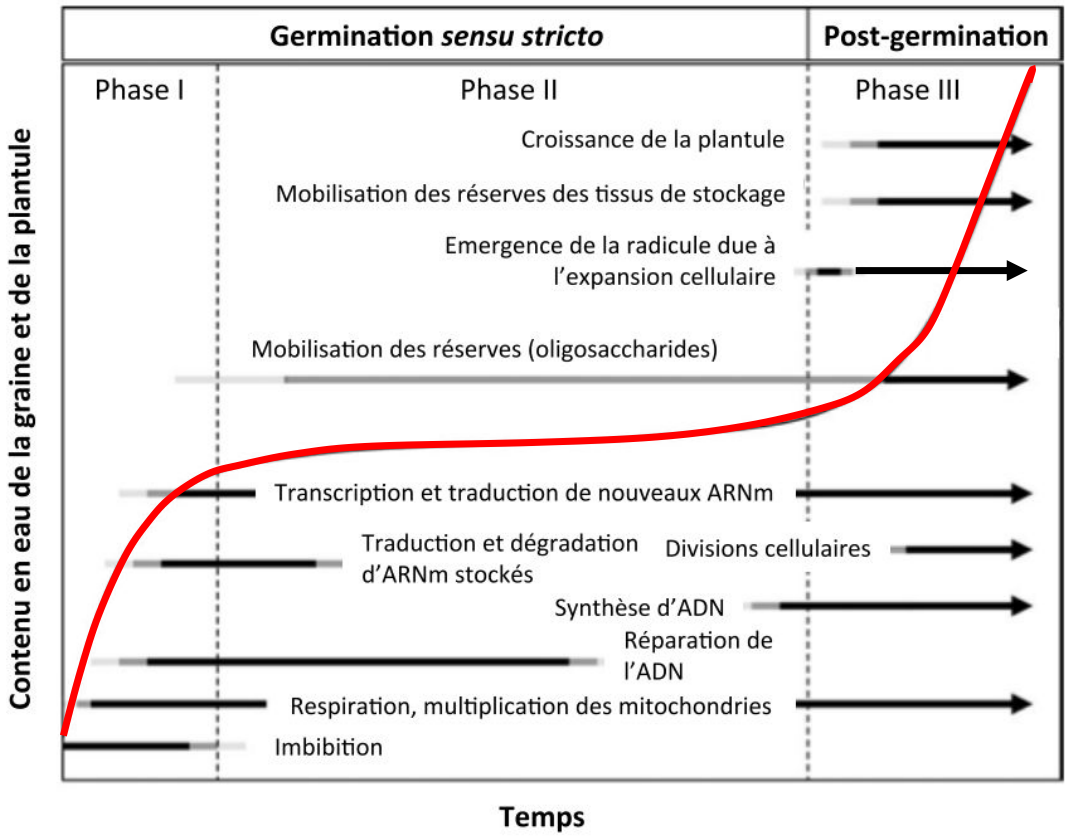


<u>Figure II.21</u> : Représentation schématique de la structure d'un corps lipidique ou oléasome. Les triacylglycérides (TAGs, lipides de réserves) synthétisés sont séquestrés au sein de ces oléasomes, entourés par une monocouche de phospholipides dans laquelle sont incluses des protéines telles que les oléosines, les caléosines et les stéréoléosines (Shimada et Hara-Nishimura, 2010).

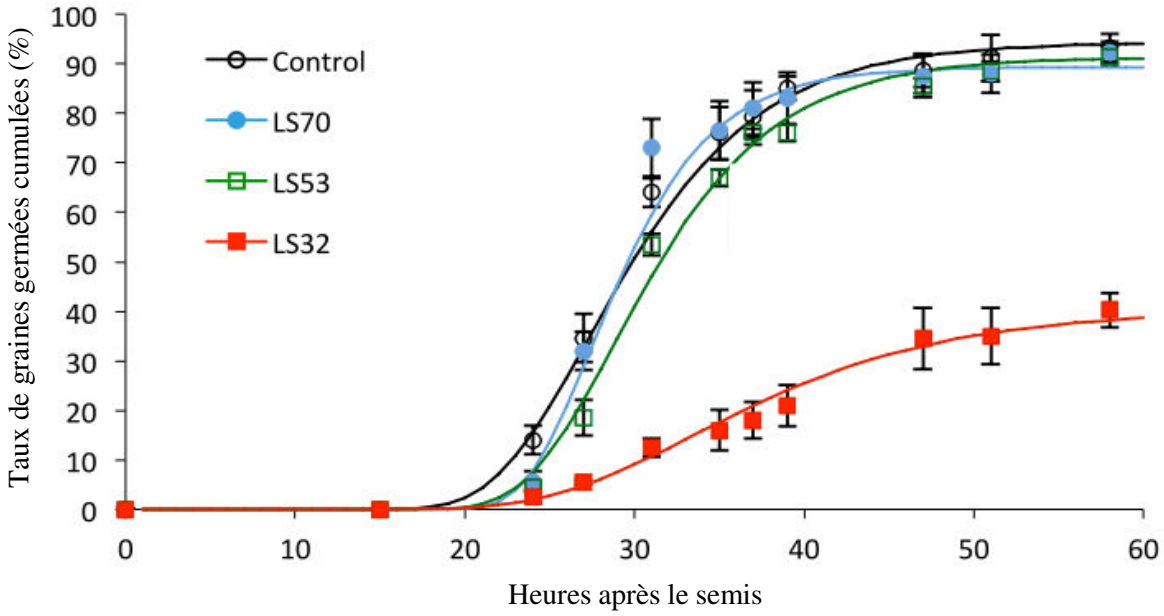
et métaboliques interviennent et sont finement régulés notamment *via* la modulation de l'expression et de l'activité de nombreuses protéines.

Le développement de la graine peut être divisé en trois phases (**Figure II.20**) :

- **L'embryogenèse**, qui correspond aux premiers stades de développement de l'embryon, allant de la fécondation jusqu'à sa formation. Il s'agit de la phase de division et de différenciation active des cellules (2n) issues de la fécondation entre l'oosphère et le gamète mâle. Durant cette phase, il a été observé chez *A. thaliana* et *B. napus* une accumulation transitoire d'amidon principalement au sein du tégument et de l'embryon (Baud *et al*., 2002 ; Da Silva *et al*., 1997).
- **Le remplissage**, qui correspond à la phase d'accumulation des réserves lipidiques et protéiques dans la graine. Il s'agit aussi de la phase d'élongation des cellules embryonnaires. Ces deux événements permettent une augmentation forte et rapide de la matière sèche des graines. L'amidon préalablement accumulé va être hydrolysé, alors que du saccharose, du stachyose et du raffinose vont s'accumuler à la fin de la phase de remplissage (Baud *et al.*, 2002 ; Eastmond et Rawsthorne, 2000). **Les lipides**, majoritairement présents sous forme de triacylglycérides (TAGs), représentent environ 43 % de la composition des graines, fournissant ainsi une source de C et d'énergie nécessaire à la germination et au début de la croissance de la plantule avant que celle-ci ne devienne autotrophe. Les acides gras dans la graine sont produits dans le cytosol ou les plastes, à partir d'acétyl-CoA, molécule soufrée formée suite à la conversion du pyruvate, provenant lui-même du saccharose après de multiples réactions enzymatiques. Une fois formés, les TAGs sont transférés et accumulés dans des corps lipidiques : les oléasomes (**Figure II.21**). Ils sont constitués d'une monocouche de phospholipides dans laquelle sont inclues des protéines comme des oléosines, des caléosines ou des stéréoléosines (Shimada et Hara-Nishimura, 2010), impliquées dans leur stabilisation et dans la dégradation des réserves lipidiques survenant suite à la germination (Baud *et al*., 2002 ; Baud et Lepiniec, 2010 ; Purkrtova *et al*., 2008). Les graines contiennent environ 19 % de **protéines de réserve**s (SSPs pour « Seed Storage Proteins ») qui sont elles-mêmes principalement composées de cruciférines (globulines 12S : 50 à 60 %), de napines (albumine 2S : 10 à 20 %) et d'autres protéines mineures comme l'oléosine et des protéines de transfert lipidique. Elles sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique granuleux (REG), modifiées au niveau de l'appareil de Golgi puis transportées et accumulées dans des vacuoles de stockage. Les SSPs seront utilisées lors de la germination et de la croissance de la plantule comme source de C, N et S (Bewley et



<u>Figure II.22</u> : Évolution temporelle des évènements physiologiques et métaboliques majeurs survenant au cours de la germination et de la post-germination. Le temps nécessaire à la mise en place de ces processus varie en fonction des espèces et est influencé par les conditions de germination. L'évolution du contenu en eau est représentée en rouge. D'après D'Hooghe (2013), traduit de Nonogaki *et al*. (2010).



<u>Figure II.23</u> : Cinétique de germination (en % de graines germées cumulées) de graines issues de colza cultivé sous alimentation suffisante en S (Control) ou sous différentes limitations en S appliquées au stade GS70 (LS70 : début de formation des siliques), GS53 (LS53 : début de floraison) et GS32 (LS32 : début de montaison). Les valeurs indiquées par des symboles correspondent aux moyennes ± ES (n = 4). Les courbes sont obtenues avec un ajustement de type sigmoïde (fonction de Gompertz). D'après D'Hooghe *et al*. (2014).

Black, 1994). L'analyse de l'accumulation spatiale des SSPs montre que leur stockage se limite principalement à la radicule de l'embryon (Borisjuk *et al*., 2013). Étant donné la concomitance de l'accumulation des lipides et des protéines (**Figure II.20**), cela pourrait indiquer une concurrence pour les substrats, l'énergie et l'espace. Ainsi, des graines avec une haute teneur en huile sont souvent associées à une faible teneur en protéines et inversement.

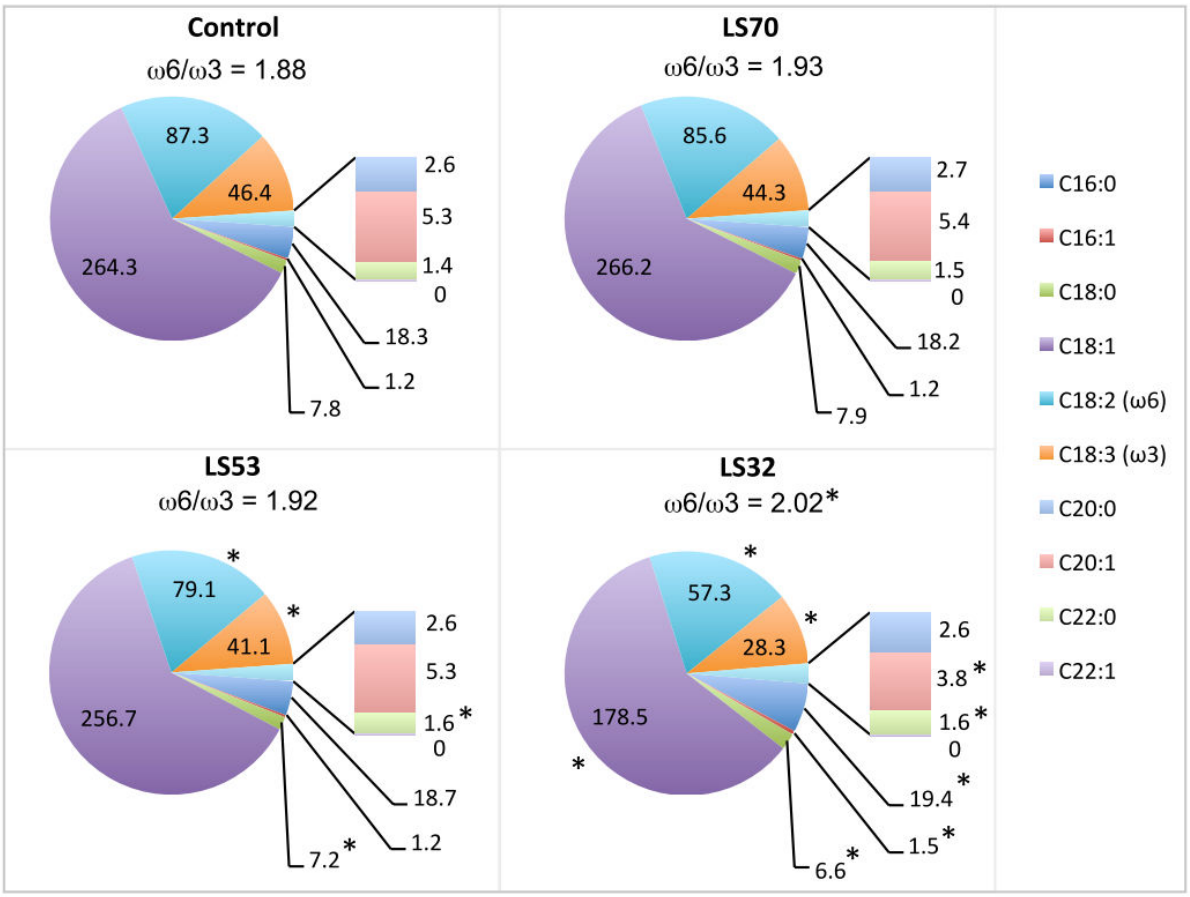
- **La maturation et la dessiccation**, qui correspond au moment où l'embryon entre en quiescence métabolique (ralentissement ou arrêt), et où la graine se déshydrate très fortement. La synthèse de protéines et de lipides de réserves qui a atteint son maximum en fin de phase de remplissage prend fin. Il a même été observé à la fin de cette phase une diminution de la teneur en lipides de réserves de 10 % chez *B. napus* (Eastmond et Rawsthorne, 2000).

La germination (**Figure II.22**) débute par une première phase d'absorption d'eau (l'imbibition) par la graine, rendue possible par la différence de potentiel hydrique entre le milieu extérieur et la graine. L'embryon, qui était entré en quiescence métabolique, peut alors reprendre son activité métabolique notamment la respiration et la glycolyse (Nonogaki *et al*., 2010). Lors de la deuxième phase, l'absorption d'eau s'arrête temporairement et de profonds changements métaboliques interviennent. Ainsi, l'induction de la synthèse de protéines s'accompagne d'une mobilisation des réserves oligosaccharidiques de la graine (**Figure II.22**). La percée du tégument par la radicule signe la fin de la germination *sensu stricto*. Suite à l'émergence de la radicule, l'absorption d'eau peut reprendre ainsi que de nombreux évènements post-germinatifs comme la dégradation des réserves protéiques et lipidiques accumulées au cours du développement de la graine, permettant la croissance de la plantule et la mise en place de son appareil photosynthétique.

Une limitation en S, selon son niveau de sévérité et le stade de développement auquel elle se manifeste, va avoir différents impacts sur le développement, le remplissage (élaboration de la qualité nutritionnelle), la viabilité et la capacité germinative de la graine (qualité physiologique).

III.3.b Impacts physiologiques d'une limitation en S

Une très faible disponibilité en S affecte négativement la vigueur et la capacité germinative des graines produites *via* notamment une chute de la vitesse et du taux de germination *sensu stricto* (**Figure II.23**, D'Hooghe *et al*., 2013a). Cette diminution du taux de germination peut être imputée à une réduction de la viabilité des graines dans cette situation de forte limitation en S. Par ailleurs, le métabolisme soufré est rapidement activé au cours de la germination de la graine de colza et des



<u>Figure II.24</u> : Composition en acides gras de graines matures de colza provenant de plantes non limitées en S (Control) et limitées en S dès le stade GS70 (LS70 : début de formation des siliques), GS53 (LS53 : début de floraison) et GS32 (LS32 : début de montaison). Les données correspondent à la moyenne en mg g^{-1}MS (n = 6 pour le control, n = 4 pour LS70, LS53 et LS32). Le ratio ω6/ω3 est indiqué sous les noms des traitements. *: Différences significatives avec la valeur du control ($p < 0,05$). (D'Hooghe et al., 2014).

composés soufrés organiques ainsi que du sulfate s'accumulent, probablement dû à la mobilisation de réserves en S protéiques (D'Hooghe, 2013).

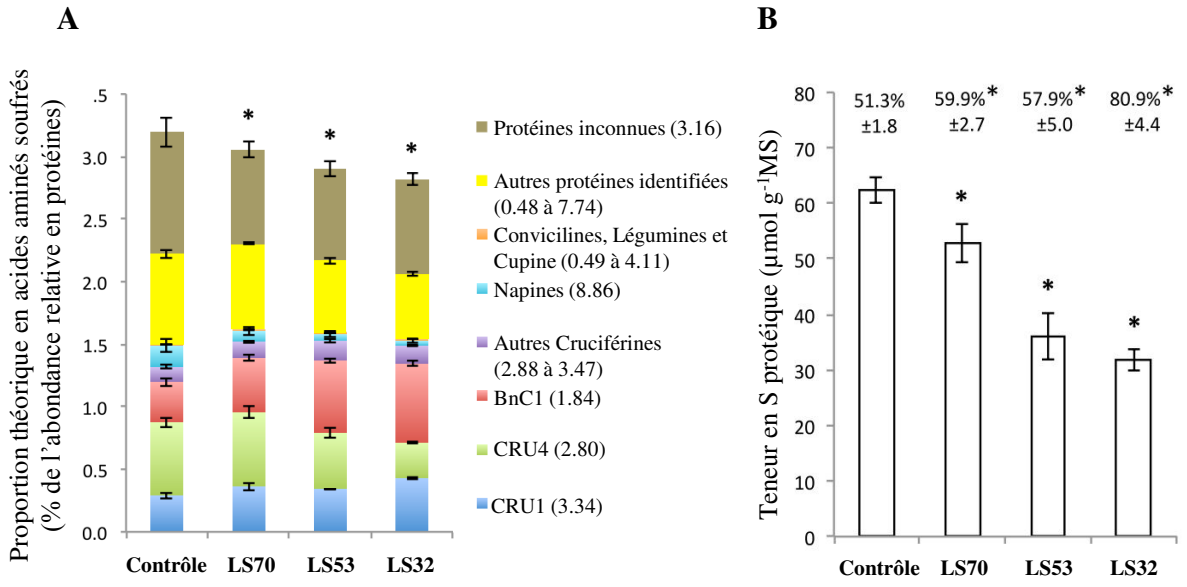
Plusieurs hypothèses peuvent être émises concernant l'altération de la germination et du développement des semis provenant de graines limitées en S. Ainsi des analyses protéomiques révèlent une faible abondance en malate synthase au niveau du glyoxysome (type de peroxysome où se produit le cycle du glyoxylate). La faible disponibilité en cette enzyme qui est essentielle pour l'utilisation des lipides stockés dans la graine afin d'alimenter l'embryon lors de la germination, pourrait entraîner un défaut dans ces étapes critiques du développement de la plantule (Eastmond et Graham, 2001). D'autres phénomènes peuvent également nuire à la germination, à l'établissement et à la croissance des plantules comme la modulation de l'actine, de la β-tubuline et de la β-glucosidase, qui sont susceptibles d'affecter le développement cellulaire, ainsi que la réduction de l'accumulation de myrosinase et des glucosinolates diminuant les défenses contre les ravageurs (D'Hooghe, 2013).

III.3.c Impacts d'une limitation en S sur la qualité nutritionnelle des graines

Impacts sur la qualité de l'huile

Une limitation en S précoce (GS53 : début de floraison et GS32 : montaison) entraîne une plus faible accumulation d'acides gras dans les graines, principalement due à une diminution des dérivés en C18, en particulier des deux acides gras essentiels : les acides linoléique (ω6) et linolénique (ω3) (**Figure II.24**). Il est aussi observé une diminution significative des protéines associées aux lipides, telles que les caléosines (**Figure II.21**) et les protéines plastidiales associées aux lipides (PAP pour "Plastid-lipid Associated Protein") (D'Hooghe *et al.*, 2014). En revanche, si la limitation en S est plus tardive (formation des siliques : GS70), la teneur et la qualité en lipides reste élevée dans les graines en partie grâce au maintien relatif des caléosines et à l'induction de stéréoléosines dans les graines.

L'analyse protéomique réalisée par D'Hooghe *et al.* (2014) sur des graines issues de colza carencés en sulfate a également révélé la répression de la succinate déshydrogénase, directement impliquée dans la chaîne de transport des électrons de la membrane mitochondriale interne, et la répression de la sous-unité β de l'ATP synthase. Ces résultats suggèrent une forte diminution de la production d'énergie dans les semences limitées en S. Bien que la production d'ATP mitochondriale ne contribue qu'à une petite partie de l'énergie requise pour le développement des graines (Schwender *et al.*, 2006), cette répression pourrait également expliquer la réduction de l'accumulation de composés de stockage tels que les lipides.



<u>Figure II.25</u> : Effets de différents traitements limitant en S sur la teneur relative en acides aminés soufrés mesurée théoriquement (A) et la teneur en S-protéique mesurée expérimentalement (B) dans les protéines de graines matures. La proportion théorique d'acides aminés S est calculée comme la somme des abondances relatives multipliée par la proportion d'acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) de la protéine correspondante et est indiquée à côté du nom de la protéine entre parenthèses (**A**). S-protéique des graines matures cultivées dans les conditions contrôle, ou limitation en S appliquée aux stades GS70 (LS70 : début de formation des siliques), GS53 (LS53 : début de floraison) et GS32 (LS32 : début de montaison). Pour chaque traitement, le rapport S-protéique/S est indiqué directement au-dessus de la barre correspondante (**B**). Les valeurs correspondent à la moyenne ± ES (n = 6 pour le contrôle, n = 4 pour LS70, LS53 et LS32).
* Différence significative par rapport à la valeur contrôle ($p < 0.05$). D'après D'Hooghe et al. (2014).

La fertilisation soufrée permet d'augmenter significativement la teneur en huile des graines (Imran and Khan, 2017 ; Malhi et Gill, 2007). Quelle que soit la dose de fertilisants S apportée, l'ajout d'engrais N réduit la teneur en huile et augmente celle en protéines dans les graines du colza (Fismes *et al*., 2000). Cependant, une fertilisation N sans apports de S réduit la teneur en huile des graines (Joshi *et al*., 1998). Le S doit alors être apporté conjointement avec les fertilisants N afin de maintenir un rendement optimal en graines et d'augmenter les teneurs en acides gras linoléique et linolénique (Joshi *et al*., 1998).

Impacts sur la qualité des protéines

Tout comme la qualité et la teneur en huile, la qualité protéique du tourteau est réduite lorsqu'il est issu de graines provenant de plantes limitées en S (**Figure II.25**). Lors d'une limitation en S appliquée au stade GS70 (début de formation des siliques) et GS53 (début de floraison), la teneur en protéines des graines chez le colza peut être maintenue mais au détriment de leur qualité. En effet, dans ce cas de figure, une diminution du rapport [protéines riches en S/protéines pauvres en S], a été observé chez le colza (D'Hooghe *et al*., 2014), *A. thaliana* (Higgins *et al*., 1986) et le pois (Hirai *et al*., 1995).

La balance entre les SSPs riches et pauvres en S dépend de la disponibilité en acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) dans les graines en développement. Par exemple, il est observé lors d'une limitation en S une diminution de la concentration en cruciférine Cru4 (SSP riche en S) et une augmentation de la concentration en cruciférine BnC1 (SSP pauvre en S) (D'Hooghe *et al*., 2014). Cette stratégie d'adaptation n'est malgré tout pas suffisante face à des limitations très sévères apparaissant plus tôt (GS32), où la qualité protéique mais également la teneur en protéines de la graine sont affectées, comme observée chez *B. napus* et *A. thaliana* (D'Hooghe *et al*., 2014 ; Higashi *et al*., 2006), probablement en raison d'une réduction de l'assimilation de l'azote dans les graines.

Des gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme du S sont exprimés dans les graines en développement de *B. napus* (Yu *et al*., 2010), le S pouvant être assimilé directement par les graines et les siliques (D'Hooghe *et al*., 2013a). L'assimilation du sulfate au cours du développement des graines augmente lors d'une limitation en S avec un ratio S-sulfate/S total fortement diminué dans les graines soumises à une limitation en S et un ratio S-protéique/S total significativement plus élevé. Par conséquent, l'assimilation de sulfate est probablement activée pendant le développement de la graine pour fournir des composés S, tels que cystéine, méthionine et GSH (D'Hooghe *et al*., 2013a). Néanmoins, ces observations pourraient également être le résultat d'un blocage métabolique du S lié à la synthèse des protéines. De plus, la répression de la méthionine

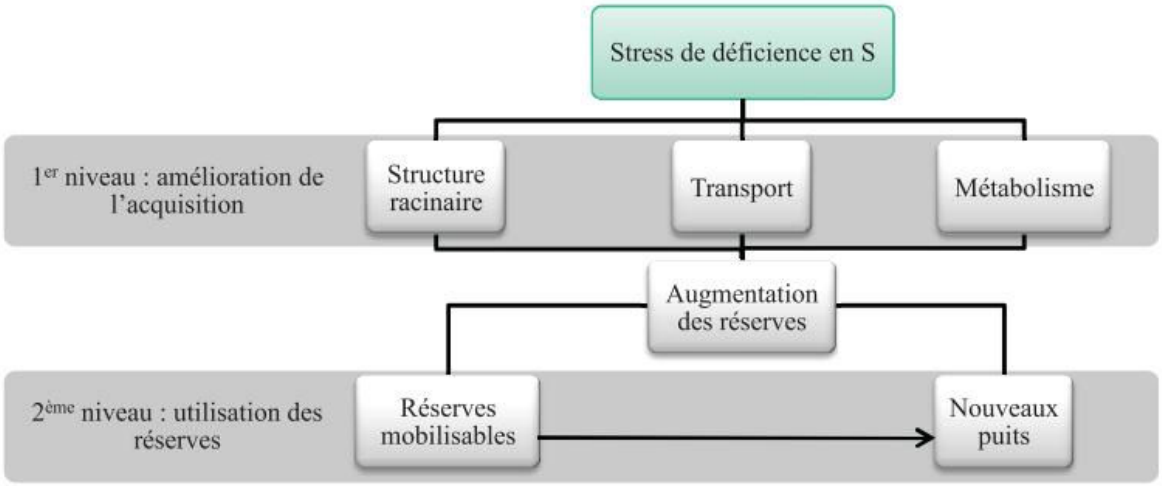


Figure II.26 : Les deux niveaux d'amélioration de l'utilisation du S proposées par Hawkesford (2000).

Figure II.27 : Réponses du système racinaire d'*Arabidopsis thaliana* à une forte disponibilité ou à une limitation en S. Les plantules ont été cultivés dans des milieux riches ou pauvres en S. Une forte limitation en S peut modifier fortement la croissance des racines primaires et latérales, modifiant ainsi l'architecture globale des racines. D'après López-Bucio *et al*. (2003).

synthase pourrait, en réduisant la synthèse de méthionine, entraîner une limitation de l'accumulation de protéines riches en S.

Actuellement, la filière oléoprotéagineuse se préoccupe davantage de la teneur protéique des graines de colza que de la qualité de ces protéines. Cependant, aux vues des besoins grandissants en protéines végétales, le tourteau de colza de par ses teneurs très intéressantes en acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) prend une place de plus en plus importante sur le marché et la problématique d'obtention d'une forte teneur en protéines de bonne qualité devient majeure. L'application combinée et équilibrée de fertilisants S et de N favorise leur absorption et assimilation, conduisant à une augmentation significative de la teneur en protéines et en huile de la graine chez *B. juncea* et *B. campestris* (Abdin *et al*., 2003 ; Ahmad et Abdin, 2000a, 2000b ; McGrath et Zhao, 1996).

IV. Quelles pistes pour améliorer la conduite et la gestion de la fertilisation S ?

IV.1 Amélioration de l'EUS en interaction avec l'azote

L'efficience d'usage du soufre (EUS) correspond au rapport entre la quantité de matière sèche produite (rendement grainier pour le colza) et la quantité de S apportée par les fertilisants. Elle peut être divisée en 2 composantes : l'Efficience d'Absorption du S (EAbS) et l'Efficience d'Utilisation du S (EUtS). L'EUtS est elle-même la résultante de deux composantes : l'Efficience d'Assimilation du S (EAS) et l'Efficience de Remobilisation du S (ERS).

Comme proposée par Hawkesford (2000), plusieurs stratégies peuvent être envisagées afin d'améliorer l'EUS, (**Figure II.26**). La première stratégie vise à améliorer l'absorption du sulfate (EAbS) et la deuxième à optimiser l'utilisation des réserves en S soit la remobilisation du S (ERS).

IV.1.a Amélioration du prélèvement en S

Chez *A. thaliana*, une limitation en sulfate provoque une augmentation de la densité des racines latérales au niveau de l'extrémité racinaire (López-Bucio *et al.*, 2003 ; **Figure II.27**). Ce changement pourrait être lié à l'activation transcriptionnelle du gène *NITRILASE3* (*NIT3*), un membre de la famille des gènes codant une enzyme capable de convertir l'indole-3-acétonitrile en acide indole-3-acétique et intervenant donc dans la synthèse d'auxine.

Lors d'une déficience en S chez le colza, l'expression des gènes codant les transporteurs de sulfate racinaire est très fortement induite afin de puiser au mieux le sulfate disponible dans le sol. La recherche de génotypes capables d'augmenter leur système racinaire pourrait être une piste

d'amélioration. Il est aussi important d'ajuster les apports en fertilisants N car une limitation en N peut à son tour réduire l'absorption en S (Fismes *et al*., 2000 ; Kopriva et Rennenberg, 2004) . De même, une limitation en S va directement impacter l'absorption en nitrate. Prosser *et al*. (2001) ont suggéré que l'OAS (O-acétylsérine) s'accumulait lors d'une privation en S, pouvant avoir un effet inhibiteur sur l'absorption et l'assimilation du N. En raison des interactions existant au niveau de la régulation des voies d'assimilation du S et du N, une limitation en S va aboutir à la diminution de la formation de sulfide (S^{2-}) qui lui-même va diminuer la production de cystéine (et donc de méthionine) et augmenter l'accumulation d'OAS (Kaur *et al*., 2011).

IV.1.b Amélioration de l'assimilation et de la remobilisation des réserves soufrées

Le colza a une grande capacité d'absorption en sulfate. Une fois absorbé ou/et stocké, son assimilation et sa remobilisation doivent être efficaces afin de répondre à la croissance et à l'élaboration du rendement et de la qualité des graines. En cas de limitation en S même modérée, l'induction de l'expression des gènes codant les transporteurs SULTR4;1 et SULTR4;2 (Dubousset *et al*., 2009 ; Girondé *et al*., 2014) conduit à une remobilisation massive du sulfate stocké au niveau vacuolaire. Cependant, dans des conditions non limitantes nutritionnellement, l'ERS chez le colza reste faible. En effet, les feuilles, représentant la principale source de S pour les organes en croissance (stockage de sulfate dans les vacuoles), peuvent chuter avec de forts taux de S résiduel, pouvant atteindre 1à 2 % de S dans la matière sèche (Dubousset *et al.*, 2010). Améliorer l'ERS permettrait de diminuer les pertes de S au niveau des feuilles chutées grâce à un meilleur vidage des réserves en S vacuolaires lors de la sénescence foliaire. Girondé *et al*. (2014) ont souligné qu'en réponse à une restriction en S apparaissant au stade GS53 (début de floraison), la tige peut servir d'organe de stockage transitoire de S pouvant jouer un rôle central en cas d'asynchronisme entre la remobilisation du S par les feuilles sources et son utilisation par les organes en croissances, dont les graines.

L'une des voies alternatives d'amélioration de l'ERS serait d'augmenter la demande en S des puits (augmenter la force puits), par exemple des feuilles en expansion et des organes reproducteurs (siliques, graines). Lors de certains stress, comme le stress hydrique, le sulfate nouvellement absorbé par le colza n'est pas stocké dans les vacuoles mais directement incorporé dans les protéines, ce qui permet une meilleure assimilation du sulfate et ainsi une meilleure EUtS (Lee *et al*., 2016).

Par conséquent, toutes ces caractéristiques physiologiques (prolifération des racines, remobilisation efficace du sulfate, et/ou stockage transitoire de S dans la tige) pourraient être utilisées dans les programmes de criblage afin de sélectionner des génotypes de colza à haute

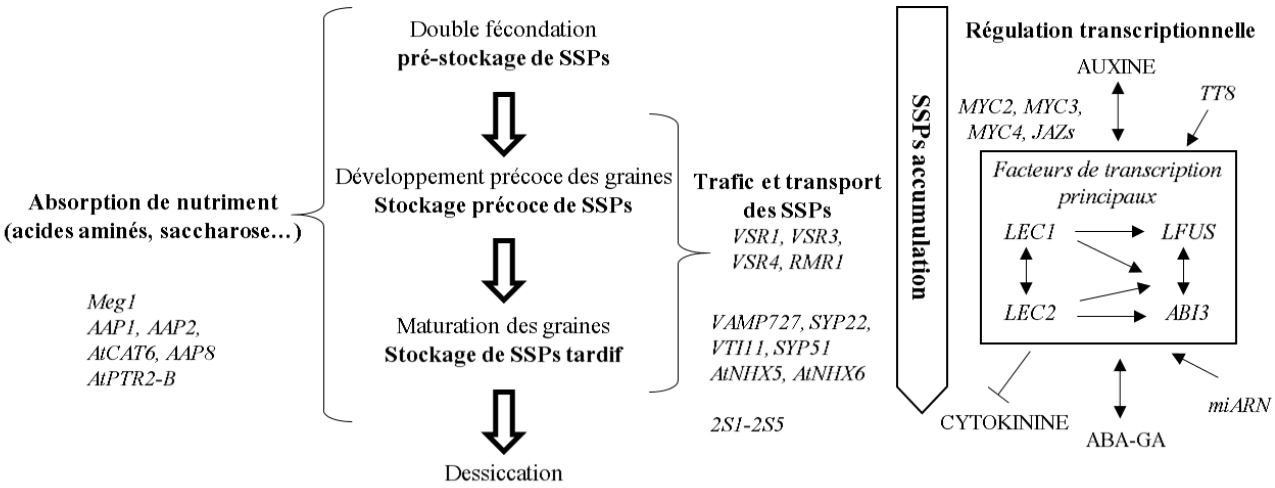
efficacité d'utilisation du S ou capables de limiter l'impact d'une limitation en sels minéraux sur le rendement et la qualité des graines.

IV.2 Variabilité génotypique / sélection variétale / concept d'idéotype

Corriger une déficience en S uniquement en modifiant des schémas de fertilisation S n'est pas toujours suffisant ni durable d'un point de vue économique et environnemental. Une voie alternative d'amélioration des performances agronomiques et *a fortiori* de la gestion du S par la plante s'appuie sur le développement de la sélection variétale permise par la variabilité génotypique disponible de l'espèce. En effet, une variété de colza possède des caractéristiques propres, qui seront adaptées à un certain type de conduite ou d'environnement, et inversement (Debaeke *et al*., 2015). Cette démarche consiste à optimiser les interactions génotype x environnement x conduite. Par exemple, dans un contexte de réduction des apports en intrants S et N, et compte tenu d'une variabilité génotypique observée des EUS et EUA chez le colza, sélectionner des génotypes avec de meilleures EUS et EUA est une des options à retenir (Balint et Rengel, 2009, 2011b ; Girondé *et al*., 2015a, 2015b).

Afin de sélectionner des variétés plus efficientes, certains gènes peuvent être spécifiquement ciblés, par exemple des gènes participant à la régulation des transporteurs racinaires en S (Yoshimoto *et al*., 2007). Les génotypes présentant une meilleure biosynthèse et/ou un meilleur transport de composés soufrés comme la cystéine et le glutathion *via* le xylème et le phloème pourraient être sélectionnés (Balint et Rengel, 2009). Cependant, des génotypes efficients lors de la phase végétative ne le seront pas systématiquement lors de la phase reproductrice et inversement (Balint et Rengel, 2009). *Balint et al. (2011b)* ont montré par exemple que le génotype Surpass 402 CL était plus efficient pour l'absorption du S lors des périodes végétative et reproductrice, mais moins efficiente que la variété Karoo pour la remobilisation endogène du S des feuilles vers les siliques et les graines matures.

La variabilité génotypique peut aussi s'observer au niveau de la composition des graines. Les programmes de sélection dédiés à l'amélioration de la fraction huileuse du colza au cours de ces vingt dernières années ont conduit non seulement à une diminution de la teneur en protéines de la graine, mais également à un enrichissement de la teneur en cruciférines (Malabat *et al*., 2003). Des analyses génétiques et protéiques suggèrent en outre que les facteurs génétiques régissent principalement la composition protéique. Malabat *et al*. (2003) soulignent également que les efforts de sélection pourraient être consacrés à l'amélioration de la qualité des protéines dans les graines afin d'améliorer et d'adapter le tourteau de colza à des utilisations spécifiques à plus forte valeur



<u>Figure II.28</u> : Résumé des régulations géniques et transcriptionnelles de l'accumulation des protéines de réserves de la graines (SSPs). L'accumulation des SSPs se produit du développement précoce à la fin de maturation des graines. Les gènes (en italique) régulant l'accumulation des SSPs dans les graines interviennent lors de l'absorption des nutriments (transport des acides aminés, du saccharose), du trafic et du transport vésiculaire associé à l'accumulation des SSPs. L'accumulation des SSPs est également orchestrée par la régulation de facteurs de transcription principaux (*LEC1*, *LEC2*, *LFUS, ABI3*) et secondaires (*TT8*, *MYC2*, etc), d'hormones, de micro-ARN (*mi*ARN) et d'autres gènes pendant le développement des graines. Les interactions sont illustrées par des flèches. ABA-GA : acide abscissique et acide gibbérellique, TT8 : TRANSPARENT TESTA 8, MYC2, 3, 4, JAZs : facteurs de transcription impliqués dans la réponse à l'acide jasmonique. Traduit de Gacek *et al*., (2018).

ajoutée. Cela signifierait élever les teneurs en protéines et le rapport napines:cruciférines dans les graines de colza (Gacek *et al*., 2018). Certains gènes régulant la synthèse des SSPs lors de la formation des graines peuvent alors être ciblés afin d'augmenter la qualité des protéines (**Figure II.28**). Les napines sont codées par des famille multigéniques (Baszczynski et Fallis, 1990) et des études manipulant la composition en SSPs ont déjà été entreprises (Altenbach *et al*., 1992 ; Hannoufa *et al*., 2014). L'introduction d'une copie antisens d'un gène codant une cruciférine (*CruA* ; codant une cruciférine CRU2/3 pauvre en acides aminés soufrés) a entraîné une augmentation des niveaux d'acides aminés essentiels de la cystéine, de la lysine et de la méthionine dans les SSPs des graines de colza (Kohno-Murase *et al*., 1995). Inversement, l'introduction d'une copie antisens d'un gène codant une napine à conduit par « silencing » de l'expression de ce gène à une diminution des teneurs en napines, cystéine et lysine dans les graines de colza et à une augmentation de la teneur en cruciférines (Guerche *et al*., 1990 ; Kohno-Murase *et al*., 1994).

Ces différents caractères sous contrôle génétique peuvent constituer des cibles de sélection dans la perspective de créer des idéotypes. Le concept d'idéotype est apparu dans les années 1970 pour assister de nouvelles approches de sélection multicritères qui n'étaient plus uniquement basées sur l'amélioration du rendement ou la disparition d'un caractère indésirable. L'idéotype est alors défini comme « un modèle biologique dont on attend qu'il se comporte d'une manière prédictible dans un environnement défini » (Donald, 1968). Dans une démarche d'amélioration et/ou d'adaptation des cultures à leur environnement au sens large (conditions pédoclimatiques et contraintes du système agricole), l'idéotype correspond à un type de plante dont les performances répondent à des objectifs agro-environnementaux au moyen d'un levier génotypique et/ou d'un levier technique fondé sur des modifications de conduites culturales. On parlera **d'idéotype variétal** lorsque les objectifs de performances peuvent être atteints par le levier génotypique et **d'idéotype cultural**, s'ils le sont par les conduites culturales (Beillouin, 2017 ; Martre *et al*., 2014).

IV.3 Outils d'aide à la fertilisation S, indicateur de la nutrition S et de qualité des graines

Optimiser la fertilisation S dans le cadre d'une agriculture raisonnée est essentiel afin (i) d'éviter les excès de fertilisation et les risques de pertes en fertilisants S, et (ii) de garantir une bonne qualité des produits récoltés tout en maintenant de bons rendements. Un grand nombre de paramètres entre en jeu lorsque l'on se place en condition de plein champ. Il faut prendre en compte (i) l'environnement, incluant des variables climatiques telles que la température, le rayonnement ou la pluviométrie, (ii) des variables relatives au sol, à savoir le type de sol (argileux, calcaire, etc), ses propriétés physico-chimiques, sa minéralisation et sa composition organique et (iii) les précédents culturaux pouvant faire fluctuer le niveau de disponibilité de certains éléments nutritifs.

Les agriculteurs ont donc besoin d'outils d'aide à la fertilisation S, qui permettent de rendre compte de l'état de la culture et de proposer si besoin un ajustement de la fertilisation S en modulant la dose apportée et le moment d'apport, et en intégrant les interactions pouvant avoir lieu avec les autres fertilisants (N ou P par exemple). Dans l'idéal, un indicateur doit être (i) fidèle (répétable et reproductible), (ii) robuste (utilisé dans une large gamme de conditions environnementales), (iii) spécifique (répondre au critère ciblé), (iv) sensible (détection de faibles variations) et enfin (v) ergonomique (facile à mettre en œuvre).

IV.3.a Aide à la fertilisation et indicateur de la nutrition S

En dehors des méthodes d'analyses de sol pour évaluer le S disponible et absorbable par la plante, il existe quelques méthodes permettant d'évaluer le statut nutritionnel en S des plantes comme le diagnostic visuel (détection des symptômes de carence en S), des grilles de décision et d'évaluation et des outils d'aide à la décision reposant sur des indicateurs biochimiques et moléculaires.

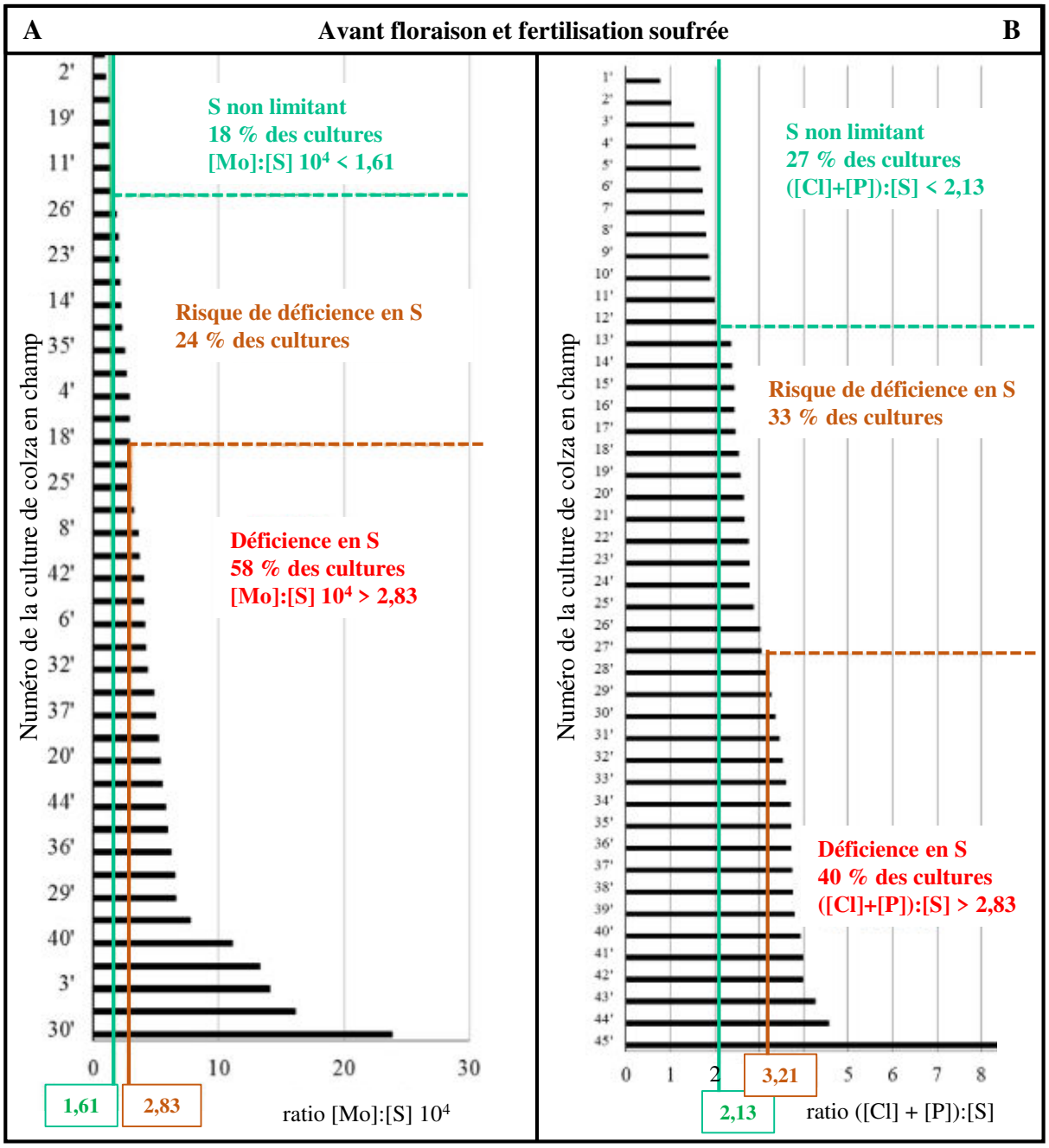
Les analyses de tissus des végétaux représentent un moyen d'identifier les limitations en S et d'optimiser la gestion des cultures. Cependant, les teneurs en S varient en fonction de l'offre, de l'organe et de l'âge de la plante. La prise en compte du type d'organe ainsi que de son stade de développement permet d'éviter certaines erreurs d'interprétation (Janzen et Bettany, 1984 ; Scaife et Burns, 1986 ; Spencer et Freney, 1980). Chez les dicotylédones, l'échantillonnage des jeunes feuilles développées qui présentent une forte activité photosynthétique (phase végétative principalement) semble être un bon choix car (i) elles présentent des teneurs élevées en S en comparaison aux autres organes, (ii) elles sont un des puits les plus importants en S, (iii) leur teneur en S est sensible aux modifications de l'état de nutrition de la plante (Orlovius K., 2003) et enfin (iv) elles sont disponibles tout au long de la croissance végétative (Schnug et Haneklaus, 1998). Chez le colza, l'analyse des teneurs en S dans les feuilles matures est aussi privilégiée car une remobilisation rapide du S peut y être observée en réponse à une carence en sulfate (Dubousset *et al*., 2009 ; McGrath et Zhao, 1996 ; Parmar *et al*., 2007). Diagnostiquer le statut S des graines n'est évidemment pas pertinent pour corriger la fertilisation de la culture en cours mais cela permet d'acquérir des informations qui pourront être utilisées pour mieux gérer la fertilisation de la culture suivante (Blake-Kalff *et al*., 2004 ; Carver, 2005). Le moment idéal de prélèvement semble être celui où les plantes commencent à croître rapidement, lors de la montaison et jusqu'à la floraison afin de pouvoir ajuster l'apport en fonction du résultat du test.

- **<u>Les indicateurs biochimiques et moléculaires potentiels</u>**

Les teneurs en SO_4^{2-} ou en S total ont été proposées comme indices pertinents d'évaluation du statut S chez le colza (Pinkerton, 1998 ; Scaife et Burns, 1986). Elles sont très contrastées entre des

plantes carencées ou bien alimentées en S et présentent aussi l'avantage de ne nécessiter qu'une seule mesure analytique. Pinkerton (1998) a proposé des valeurs critiques en S total et SO_4^{2-} pour le colza comprise respectivement entre 0,20 et 0,25 % et entre 0,02 à 0,04 % de la matière sèche pour diagnostiquer une déficience en S avant la floraison et dans le cadre d'un approvisionnement en S du sol stable. Cependant, certains arguments nuancent l'utilisation de ces teneurs comme indicateur du statut S de la plante car celles-ci varient au cours du développement sans cohérence chronologique apparente (Blake-Kalff *et al.*, 1998, 2000) et sont influencées par beaucoup d'autres facteurs. L'analyse de composés provenant directement du métabolisme S (*i.e.* glutathion) ou affectés par celui-ci (*i.e.* amides) ont aussi été testés (Blake-Kalff *et al.*, 1998, 2000 ; Honsel *et al.*, 2012 ; McGrath et Zhao, 1996). Une réponse précoce à la privation en S a été montrée pour ces molécules notamment pour le glutathion. Cependant, le glutathion n'est pas un indicateur adapté aux conditions de plein champ car il présente des teneurs peu variables (1,5 à 2 fois) entre les plantes déficientes ou non en S. De plus, de nombreux autres facteurs (tels que la disponibilité en eau et la température) vont impacter les teneurs de ces composés, les rendant peu spécifiques (Tausz, 2001).

D'autres travaux ont étudié les ratios de composés minéraux ou organiques pouvant prédire de façon plus fiable le statut soufré de la plante (Blake-Kalff *et al.*, 2000, 2001 ; Maynard *et al.*, 1983). **Le ratio N:S** est fréquemment utilisé et est basé sur les interactions entre les métabolismes N et S. L'utilisation du ratio N:S comme indicateur de la nutrition soufrée nécessite un échantillonnage à un stade de développement précis (début de floraison, McGrath et Zhao, 1996) mais également sur un type d'organe précis (les feuilles le plus souvent). Diverses études ont proposé une valeur critique du ratio N:S au stade végétatif et à la montaison pour diagnostiquer les carences en S des cultures de colza au champ : ratio N:S de 6 au stade rosette (Maynard *et al.*, 1983), de 10 à la montaison (Zhao *et al.*, 1997) ou de 10 au début de l'élongation de la tige à 7,2 juste avant l'émergence de l'inflorescence (Blake-Kalff *et al.*, 2000, 2001). Ce ratio doit cependant être interprété avec prudence car un fort ratio N:S, traduisant une déficience en S, peut-être dû à un excès de N sans modifications des teneurs en S et inversement. Un faible ratio N:S, suggérant une bonne alimentation S, peut aussi être le signe d'un déficit en S et N. Afin d'améliorer la sensibilité de cet indicateur de la carence en S, il a été suggéré d'utiliser le ratio N:S conjointement à une valeur seuil pour le S total (Blake-Kalff *et al.*, 2000). Le ratio N:S des graines est beaucoup utilisé par les agronomes, les techniciens et conseillers agricoles qui le considèrent actuellement comme l'outil le plus précis de diagnostic de déficience en S. Il ne s'agit pas d'un outil de diagnostic prédictif mais il permet d'obtenir des indications en fin de culture dans le but de mieux gérer la fertilisation de la culture suivante (Carver, 2005 ; Randall *et al.*, 1981, 2003).



<u>Figure II.29</u> : Cultures de colza oléagineux classées selon des valeurs décroissantes du rapport [Mo]:[S] (A) et ([Cl] + [P]):[S] (B) dans les feuilles matures quantifiées avant la floraison et la fertilisation soufrée (45 cultures commerciales réparties en France). Les valeurs seuils des deux ratios ont permis de classer ces cultures de colza oléagineux en trois groupes de différents statuts soufrés : déficient en S ([Mo]:[S] < 1,61 ; ([Cl] + [P]):[S] < 2,13), risque de déficit en S (1,61 < [Mo]:[S] < 2,83 ; 2,13 < ([Cl] + [P]):[S] < 3,21) et non limitant en S ([Mo]:[S] > 2,83 ; ([Cl] + [P]):[S] > 3,21). D'après Etienne *et al*. (2018) et Maillard *et al*. (2016).

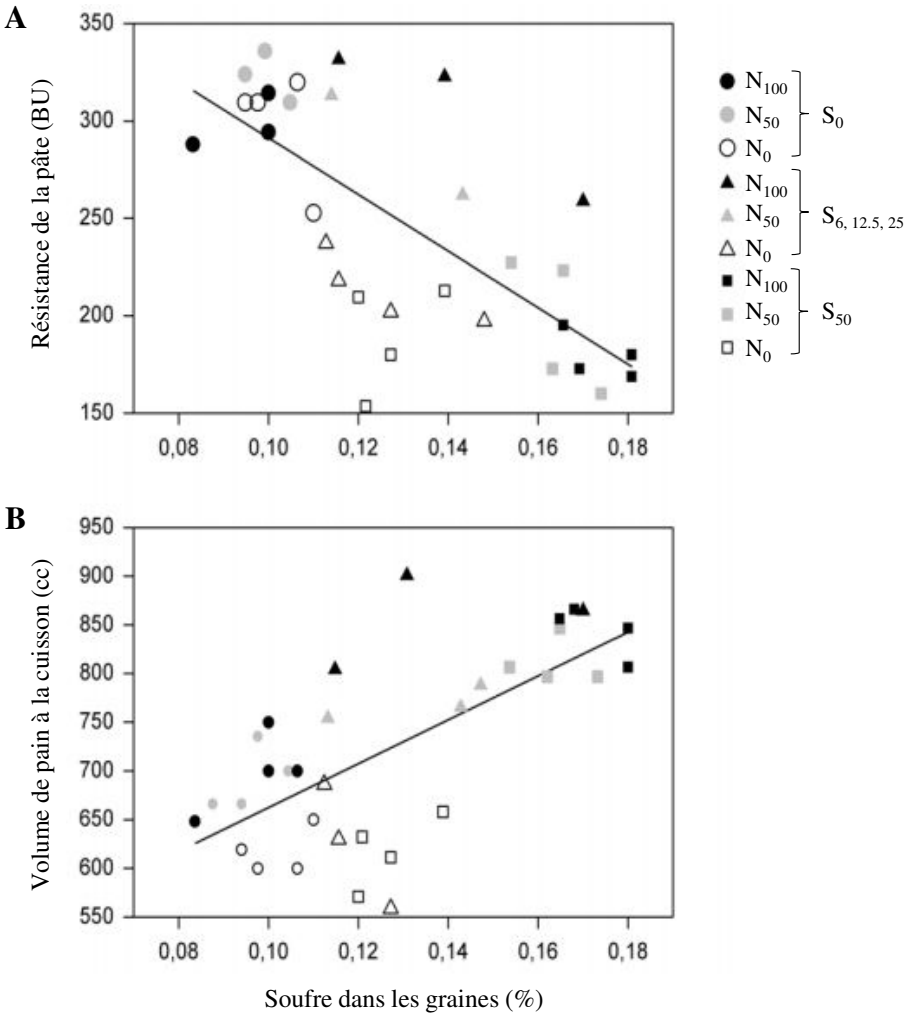
Un **ratio SO_4^{2-}:S_{total}** a également été proposé (Scaife et Burns, 1986), semblant fortement lié au rendement grainier. L'âge de la plante n'a que peu d'effet sur les valeurs critiques de cet indice en condition de plein champ. De plus, cet indice est présumé stable étant donné que les teneurs en S total et en SO_4^{2-} sont affectées de façon similaire par l'âge de la plante et par la disponibilité en N. Cependant, le ratio SO_4^{2-}:S_{total} peut être critiqué car la teneur en SO_4^{2-} est une composante du S total, ce qui implique que le numérateur et le dénominateur du ratio ne sont pas indépendants, pouvant biaiser le résultat et réduire la sensibilité de cet indicateur (Scaife et Burns, 1986). De plus, d'un point de vue technique, la détermination de ce ratio nécessite l'utilisation de deux méthodes analytiques différentes compliquant son acquisition (Schnug et Haneklaus, 1998).

Le test malate:sulfate foliaire est le test le plus précis concernant le diagnostic du statut S chez les plantes. Il est développé par l'Institute of Arable Crop Research (IACR) de Rothamsted (Royaume-Uni), est proposé en routine depuis 2002 pour le colza et les céréales. Le malate a comme fonction physiologique de contrebalancer l'absorption d'anions et de cations dans les cellules végétales afin de maintenir l'équilibre de charge et le pH cytoplasmique. Il existe donc une relation inverse entre les teneurs en malate et en sulfate dans les feuilles. En effet, la diminution de la teneur en sulfate des feuilles lors d'une limitation en S va être compensée par une augmentation de la teneur en malate, et inversement (Blake-Kalff *et al*., 2000). Ce ratio nécessite un seul type d'analyse par chromatographie ionique évitant les problèmes de calibration. De plus, il permet un diagnostic quel que soit le type de sol ou l'espèce, stable tout au long du développement de la plante (valeur critique de 1,5), tout en étant assez précoce afin de corriger la fertilisation si nécessaire. Même si le ratio malate:sulfate est considéré comme relativement indépendant de la fertilisation N, les auteurs (*Blake-Kalff et al., 2004*) admettent néanmoins qu'une fertilisation N importante accroît les effets d'une limitation en S. Un ratio malate:sulfate > 1,5 indique une déficience en S alors qu'un ratio ≤ 1,5 indique que la disponibilité en S est suffisante au moment de l'échantillonnage. Ce ratio permet de distinguer les limitations transitoires des limitations prolongées si deux tests sont effectués à des stades de développement différents (Blake-Kalff *et al*., 2004). Cependant, des études sur colza et blé ont montré que le ratio malate:sulfate surestime le diagnostic de déficience en S, suggérant un besoin de réévaluation des valeurs seuils (Carver, 2005 ; Reussi *et al*., 2011).

Le ratio ([Cl]+[P]):[S] et le ratio [Mo]:[S] ont été mis en évidence récemment comme étant deux indicateurs de la nutrition soufrée complémentaires l'un de l'autre (Etienne *et al*., 2018 ; Maillard *et al*., 2016 ; Sorin *et al*., 2015 ; **Figure II.29**). **Le ratio ([Cl]+[P]):[S]** ou indicateur de remobilisation, traduit la compensation osmotique requise (chlore et phosphate) par la remobilisation du sulfate vacuolaire lors de la phase précoce de privation en S. **Le ratio [Mo]:[S]**

<u>Tableau II.4</u> : Principales caractéristiques des indicateurs de remobilisation et d'absorption proposés comme indicateur de la nutrition soufrée. D'après Sorin (2016).

Caractéristiques de la réponse	Indicateur de remobilisation ([Cl]+[P]):[S]	Indicateur d'absorption [Mo]:[S]
Précocité	+	++
Ampleur	+	+
Sensibilité	+	+
Durabilité	+	+
Stabilité	-	-
Spécificité	?	?
Facilité de mesure	++ (XRF)	+ (S) et – (Mo)



<u>Figure II.30</u> : Relation entre la teneur en S des grains de blé et la résistance de la pâte à pain (à 5 cm) (A) et le volume de pain à la cuisson (B). Le blé est cultivé avec 3 niveaux de fertilisation en N (0, 50 et 100 U) et 5 niveaux de fertilisation en S (0, 6, 12.5, 25 et 50 U). Les niveaux 6, 12,5 et 25 sont regroupés ensemble. D'après Mossa *et al*. (1981).

ou indicateur d'absorption, varie très précocement et révèle l'induction massive de l'expression des gènes codant les transporteurs racinaires BnSULTR1;1 et BnSULTR1;2 aboutissant à une augmentation rapide de l'absorption du molybdate (Mo) lors d'une privation en S.

Ces deux indicateurs ont été validés en conditions de plein champ sur une culture de colza (échantillonnage de 20 feuilles âgées pour une parcelle) soumise à différents apports en soufre et permettent de différencier des parcelles déficientes en S, à risque de déficience en S et non limitante en S (**Figure II.29**). Même si ces indicateurs ont été validés sur plusieurs espèces en situation contrôlées, les valeurs seuils qui ont été déterminées pour la culture du colza en condition de plein champ nécessitent d'être adaptées chez d'autres espèces (Etienne *et al*., 2018 ; Maillard *et al*., 2016). Ces indicateurs de remobilisation et d'absorption présentent une plus forte sensibilité que les analyses de S, de SO_4^{2-} ou des paramètres composites qui pourraient en être dérivés, en particulier dans des conditions de limitation en S. Outre la sensibilité, ces indicateurs possèdent d'autres caractéristiques essentielles comme la précocité, l'ampleur de variation, la durabilité de la réponse et potentiellement une certaine facilité de mesure (par fluorescence à rayons-X, excepté pour le Mo qui nécessiterait une quantification en laboratoire ; Sorin, 2016 ; **Tableau II.4**). L'utilisation conjointe de ces deux indicateurs pourrait permettre un diagnostic précoce, fiable et spécifique du statut soufré de la plante et ainsi permettre de gérer au mieux la fertilisation soufrée selon les besoins réels des cultures. Cependant, ces indicateurs du statut S déterminés au niveau foliaire au cours de la phase végétative et du début de phase reproductrice, n'ont pas été mis clairement en relation avec le rendement final et les critères de qualité de la graine de colza.

IV.3.b Diagnostic de la qualité des graines

Le diagnostic de la qualité nutritionnelle des protéines de graines est très peu répandu, voire inexistant chez le colza (et les oléoprotéagineux en général), à l'inverse du blé où des normes en termes de teneur et de qualité protéique peuvent être demandé pour certains usages (critère de qualité garantissant une bonne panification en lien avec le % de S dans les graines, **Figure II.30**). En effet, le premier critère ciblé est le rendement, qui peut être amélioré *via* l'utilisation d'outils et d'indices permettant une optimisation de la fertilisation S et N, comme vue précédemment. Actuellement, les autres critères de qualités retenus se focalisent sur les teneurs en huile et protéines des graines de colza. Les normes de commercialisation actuelle sont de 9 % d'humidité, 2 % d'impuretés et 44 % d'huile. La composition en acides gras de l'huile, la teneur en huile, la teneur en protéines ainsi que les teneurs en glucosinolates peuvent être estimées facilement et rapidement par analyses de spectrométrie proche infrarouge (NIRS). Mais ces mesures ne sont pas aussi fiables qu'une mesure par chromatographie (plus complexe) et doivent être calibrées. De plus, des graines issues de plantes

ayant été carencées en S ou en N peuvent entraîner une baisse de la précision et de la fiabilité de la mesure. Il n'a pas été fait de lien entre le rendement et la qualité des graines, notamment au niveau protéique. Les protéines des graines de colza étant d'excellente qualité, elles peuvent fournir des acides aminés soufrés, notamment la méthionine (acide aminé essentiel) offrant un large panel d'utilisation future dans l'industrie alimentaire humaine (Von Der Haar *et al*., 2014).

IV.4 La modélisation agro-écophysiologique : principes et intérêts

IV.4.a Principes fondamentaux

Afin d'évaluer et/ou de concevoir de nouveaux systèmes de culture prenant en compte des schémas de fertilisation dans différents contextes pédo-climatiques, deux démarches expérimentales souvent complémentaires sont possibles : l'expérimentation « réelle » (en conditions contrôlées dans des serres ou au champ) et l'expérimentation numérique reposant sur l'utilisation de modèles prédictifs (Bergez *et al.*, 2010). Les expérimentations « réelles » permettent de tester *in planta* les effets par exemple de différentes pratiques culturales et/ou de facteurs de stress biotiques (attaques de pathogènes, etc) ou abiotiques (thermique, hydrique, nutritionnel, etc) sur les performances des cultures (croissance, rendement, défense, etc) et parfois sur leur physiologie ou métabolisme (réponses aux échelles moléculaires ou cellulaires). Ces expérimentations sont souvent coûteuses et difficiles à mettre en place car contraignantes d'un point de vue technique, malgré l'émergence des plateformes de phénotypage haut débit (Araus et Cairns, 2014 ; Cobb *et al*., 2013 ; Fahlgren *et al*., 2015 ; Furbank et Tester, 2011 ; Salas Fernandez *et al*., 2017), ce qui restreint considérablement la gamme de conditions à explorer. Les expérimentations numériques (« *in silico* »), sont fondées sur une approche de modélisation prédictive souvent complémentaire à celle des expérimentations « réelles » (Rossing *et al.*, 1997). Elles permettent (i) de quantifier les effets simultanés de plusieurs facteurs considérés sur le système étudié, (ii) d'explorer une large gamme de situations ou de conditions ceci sans la contrainte temporelle inhérente au cycle de croissance de la culture (Semenov *et al*., 2009) et (iii) de prendre en compte les interactions entre différents facteurs (interactions génotype, environnement, climat, fertilisation, type de sol, irrigation, etc) de façon plus ou moins complexe (Casadebaig *et al*., 2016). Ainsi, un nombre beaucoup plus important d'expérimentations peut être conduit, sur un laps de temps plus court permettant d'identifier des pistes d'amélioration ciblant des leviers nutritionnels (fertilisants, irrigation), génétiques (choix des variétés) et de pratiques culturales (par exemple, rotation, non labour, etc). Ces approches *in silico* sont utiles pour concevoir des systèmes de culture innovants et adaptés à différents contextes pédo-climatiques.

<u>Tableau II.5-partie I</u> : Caractéristiques des principaux modèles de culture adaptés au colza (partie I).

Model name	Authors	Factors	Outputs	Main features
Canola module in APSIM *Agricultural Production Systems Simulator*	Robertson and Lilley (2016) adapted from McCown *et al*. (1996)	Temperature, Photoperiod, soil water and N supply	Crop development, growth, yield, N accumulation From sowing to seed maturity	Calibration and validation for mainly spring cultivars
MONICA *MOdel for NItrogen and Carbon dynamics in Agro-ecosystems*	Nendel *et al. (*2011) Adapted from HERMES (Kersebaum 1995, 2007 ; Kersebaum and Richer 1991)	Temperature, radiation, CO_2, management on long-term organic matter in soil	Crop growth, soil moisture, N dynamics	Newly introduced C algorithms
AquaCrop	Zeleke *et al*. (2011) Adapted from Steduto *et al*. (2009) and Raes *et al*. (2009)	Water limitation Daily weather data (temperature, radiation, rainfall, relative humidity, wind speed) Soil hydraulic characteristics	Growth, biomass accumulation and grain yield, soil water content	Biomass growth rate is linearly proportional to transpiration via a water productivity parameter
CropGROW-canola	Within the DSSAT 4.0 cropping systems model Saseendran *et al*. (2010)	Water limitation (*based on the Root Zone Water Quality Model*, RZWQM2)	Grain yield, biomass development	In semi-arid climate Spring cultivars Photosynthetic biochemical process equations of Farquhar applied in an hourly leaf-level to canopy scaling
Cat-Canola *Catchment Analysis Tool-Canola*	Christy *et al*. (2013)	Temperature, photoperiod and vernalization for plant phenology prediction Water, temperature and nutrient for growth and yield	Plant phenology, crop growth and yield Dynamics of water and N in crop and soil	Parameterization with spring short, spring long and winter type cultivars Used for simulations in high rainfall zone in Australia
WOFOST-GTC	Gilardelli *et al*. (2016) Derived from the original WOFOST model (Van Diepen *et al*. 1989) WOFOST-GT/GT2, Stella *et al.* (2014)	Temperature and radiation for crop growth Temperature and precipitation during ripening for oil content and fatty acid composition	Biomass dynamics, yield, photosynthetic area index, fractions of oleic, linoleic and α-linolenic unsaturated fatty acid	Contribution of the different plant organs to photosynthesis during the crop cycle (compared to the original WOFOST model)
DAISY	Petersen *et al*. (1995) derived from the original DAISY model (Hansen *et al*. 1990)	Water, soil temperature and soil N Radiation and air temperature	Biomass production and nitrogen uptake Green crop area index	Winter cultivars
EPIC *Erosion-Productivity Impact Calculator*	Kiniry *et al*. (1995) Adapted from the original EPIC model (Williams *et al*. 1989)	climate, hydrology, erosion, nutrient cycling, soil temperature, management decisions (rotation, tillage, pesticide fate, and economics)	Grain yield, biomass	Spring cultivars

La modélisation est une démarche qui requiert une représentation conceptuelle d'un système plus ou moins complexe. Elle repose ainsi sur la construction préalable d'un cadre d'analyse intégrant un ensemble d'équations mathématiques ou formalismes décrivant le fonctionnement d'un système et prenant en compte des variables d'états caractérisant l'état du système, des paramètres définissant les relations entre les variables d'états et des facteurs influençant ces variables (Wallach *et al.*, 2013). Un modèle peut être décrit comme partiellement **mécaniste** *i.e.* se basant sur des hypothèses fonctionnelles et l'intégration de processus biologiques pilotes et régulateurs ou **empirique** *i.e.* dans lequel les relations sont établies entre les variables observées (Brisson et Delécolle, 1992). Dans le domaine des sciences agronomiques, les modèles mécanistes cherche à représenter le fonctionnement dynamique d'une plante ou d'un peuplement en intégrant des processus physiologiques (la photosynthèse, l'absorption racinaire, l'évapotranspiration, la sénescence, etc) contraints par des facteurs environnementaux. Ils permettent ainsi d'approfondir la description d'une phénologie variable selon les conditions du milieu et de prédire l'évolution dynamique des variables d'intérêts définies pour rendre compte des performances de la plante (Penning de Vries et Rabbinge, 1995). Outre leur intérêt cognitif, les modèles de culture prédictifs peuvent être utilisés comme outil d'aide à la décision puisqu'ils permettent de multiplier les conditions environnementales et par conséquent de cibler des variétés adaptées à des conditions particulières. De plus, ils offrent la possibilité de tester des combinaisons de valeurs de paramètres représentant des caractéristiques du génotype pour définir des idéotypes ou génotypes virtuels. Les approches de modélisation prédictive peuvent ainsi aider à concevoir et évaluer des idéotypes variétaux et culturaux aux moyens d'expérimentations numériques pour lesquelles différentes combinaisons de valeurs de paramètres décrivant les caractéristiques de la plante seront testées dans différentes conditions agro-environnementales.

IV.4.b Les modèles agro-écophysiologique dédiés à la culture du colza

A l'origine, la modélisation du fonctionnement des cultures est apparue au début de la révolution verte dans les années 1960, avec des modèles de culture (ou « crop models ») d'abord bio-climatiques ayant comme principaux facteurs limitant le rendement potentiel le rayonnement et la lumière (de Wit *et al.*, 1970 ; Arkin *et al.*, 1976). De nouveaux facteurs comme les ressources en eau (stress hydrique) et/ou la fertilisation (principalement azotée) ont ensuite été pris en compte dans des modèles visant des objectifs agronomiques davantage en adéquation avec des problématiques agro-environnementales émergentes (Jones *et al.*, 1986 ; Swaney *et al.*, 1983 ; Wolf *et al.*, 1989). Ces modèles sont très souvent génériques c'est-à-dire utilisable pour plusieurs cultures *via* des paramétrages spécifiques comme les modèles SUCROS (Spitters *et al.*, 1989), DAISY

<u>Tableau II.5-partie II</u> : Caractéristiques des principaux modèles de culture adaptés au colza (partie II).

Model name	Authors	Factors	Outputs	Main features
DAR 95	Petersen *et al*. (1995) Adapted from DAISY Hansen *et al*. (1991)	Temperature, precipitations, N, radiation	Dry matter and N in shoot and root	
BRASNAP-PH	Habekotté (1997a)	Temperature, photoperiod	Crop phenology (emergence, onset and end of flowering and maturity)	
LINTUL-BRASNAP *Light INTerception and Utilization*	Habekotté (1997b) Adapted from LINTUL Spitters (1990) and BRASNAP-PH, Habekotté (1997b)	Temperature, Radiation	Crop phenology from sowing until maturity and PAR absorption Crop growth and seed biomass from early spring until maturity Harvest index	Winter cultivars Optimum conditions
CECOL	Husson *et al*. (1998) From CERES subroutine (Jones and Kiniry, 1986)	Climate, N and water supply	growth and development of winter rape flowering dates	Winter cultivars
CERES Rape Addition of a leaf area submodel	Gabrielle *et al* (1998a, b) Adapted from CERES N-Maize Jones and Kiniry (1986)	Climate, N and water supply	growth and development of winter rape	From sowing to final yield The leaf area submodel includes senescence from shading due to competition for light and from leaf N deficiencies
No name	Malagoli *et al*. (2004)	Photoperiod, root temperature, nitrate availability, radiation, ontogenic stages	Nitrate uptake, activities of high and low affinity nitrate transport systems (HATS and LATS)	Modeling of the effects of the studied factors on HATS and LATS
AZODYN-Colza	Jeuffroy *et al.* (2006) Adapted from AZODYN Jeuffroy and Recous (1999)	Climate (temperature, radiation, rainfall, evapotranspiration) Management practices Soil characteristics	Soil N fluxes (leaching, mineralization, residue) Soil water content Yield components, above ground biomass and N content	Winter cultivars
GreenLab	Jullien *et al*. (2007, 2011) Adapted from Yan *et al.* (2004), Dong *et al*. (2008), Mathieu *et al*. (2009)	Light, temperature, N	Plant architecture at three different stages of growth: rosette stage, bolting, pod appearance Dry weight of seeds, internodes and photosynthetic organs according to phytomer number	Functional-structural model Organogenetic rules From seedling emergence until seed maturity
SuMoToRI	Brunel-Muguet *et al*. (2015b)	Temperature, Radiation, S availability	Biomass, S and S-mineral fraction in leaves at the onset of pod formation	From the end of winter until the onset of pod formation

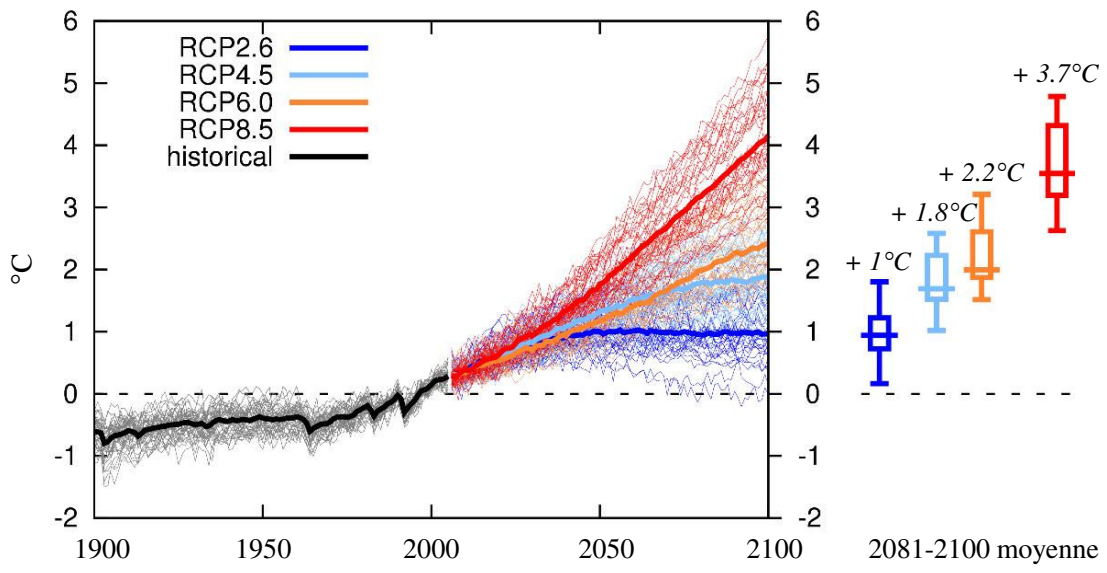
(Hansen *et al*., 1990), EPIC (Williams *et al*., 1989), WOFOST (van Diepen *et al.*, 1989) CERES (Jones *et al*., 1986), STICS (Brisson *et al.*, 1998) ou encore AZODYN (Jeuffroy et Recous, 1999).

Il existe quelques modèles pour la culture du colza, dérivant le plus souvent d'adaptations de modèles génériques tels que CERES-Rape (Gabrielle *et al*., 1998a, 1998b), AZODYN-Colza (Jeuffroy *et al*., 2006), AquaCrop (Zeleke *et al*., 2011, 2014), APSIM-Rape (Robertson et Lilley, 2016) ou encore GreenLab (Jullien *et al*., 2007) (**Tableau II.5**). Généralement, ces modèles simulent la croissance et le rendement du colza sous différentes contraintes environnementales, principalement la température, le rayonnement et la fertilisation azotée (**Tableau II.5**). Jusqu'alors, peu d'attention a été accordée à la fertilisation soufrée, à sa gestion et à son impact environnemental alors que les besoins en S des Brassicacées sont plus élevés que chez d'autres grandes cultures et qu'un contexte d'oligotrophisation des sols en S s'est installé depuis une quarantaine d'années (cf. **Chapitre I - Introduction Générale**). Si une limitation en S peut avoir des effets délétères sur le rendement et la qualité grainière, une sur-fertilisation ou des retours au sol excessifs du fait de la chute de feuilles sénescentes riches en sulfate peuvent contribuer à des phénomènes d'eutrophisation (en impactant le cycle du phosphore) et d'acidification des sols (Bouwman *et al.*, 2002). Face à ce constat, la nécessité de construire un modèle écophysiologique intégrant la nutrition soufrée chez le colza s'est imposée pour répondre aux problématiques de gestion du S dans un contexte de diminution des intrants et de perturbations climatiques.

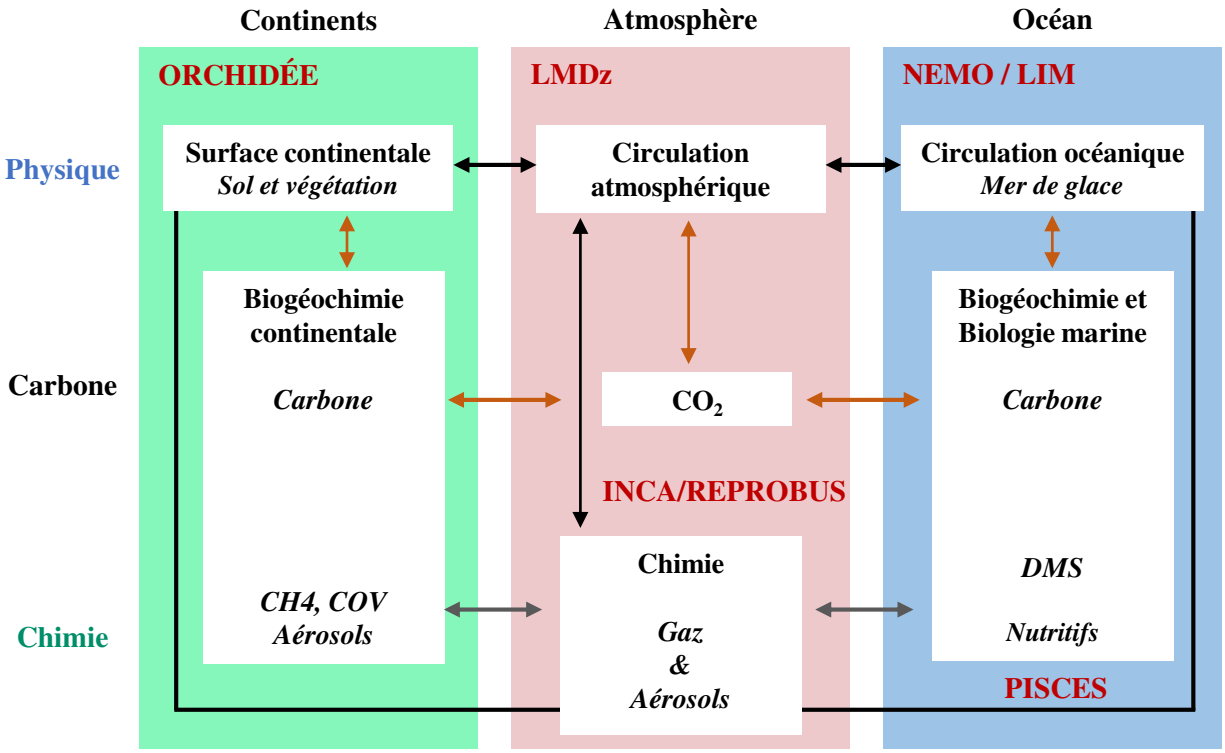
IV.4.c L'utilisation des modèles agro-écophysiologiques dans un contexte de dérèglement climatique

Le climat a une incidence majeure sur les performances culturales. De ce fait, les changements climatiques, notamment la hausse des températures prédite au cours des prochaines décennies, doivent être pris en compte afin d'adapter au mieux les pratiques culturales (DaMatta *et al*., 2010 ; Hampton *et al*., 2013 ; Madan *et al*., 2012 ; Namazkar *et al*., 2016 ; Regitano Neto *et al*., 2016).

Au cours des dernières décennies, les changements climatiques ont eu des effets sur les écosystèmes naturels continentaux et océaniques, indiquant la sensibilité de ces écosystèmes aux changements climatiques. Il a été notamment observé une augmentation des phénomènes météorologiques et climatiques extrêmes à partir de la seconde moitié du XXe siècle (IPCC, 2014). Les émissions anthropiques de gaz à effet de serre (GES), sont très probablement la cause dominante de ces phénomènes observés depuis le milieu du XXe siècle (IPCC, 2014) et sont principalement conditionnées par la démographie mondiale, l'activité économique, la consommation d'énergie individuelle et industrielle, les modes d'utilisation des terres, et les politiques climatiques regroupant les mesures prises par les pouvoirs publics. Grâce aux groupes d'experts intergouvernementaux sur



<u>Figure II.31</u> : Hausse de la température mondiale observée de 1986 à 2005 (janvier à décembre) et prédite jusqu'en 2100 pour les 4 scénarios climatiques RCP (AR5 CMIP5). La valeur moyenne de la hausse des températures par scénarios est indiquée en italique au-dessus de chaque box-plot. RCP2.6 : + 0,3 à 1,7 °C, RCP4.5 : + 1,1 à 2,6 °C, RCP6.0 : + 1,4 à 3,1 °C, RCP8.5 : + 2,6 à 4,8 °C. (IPCC, 2014).



<u>Figure II.32</u> : Schéma du modèle climatique (Climate Modeling, CM) « Earth System Model » de l'institut Pierre et Simon Laplace (IPSL-CM), un des modèles utilisés par le GIEC. Schéma résumant les processus physiques et leurs interactions, qui sont incorporés dans le modèle sous forme d'équations mathématiques. ORCHIDÉE : modèle des surfaces continentales, LMDz : modèle des interactions atmosphériques, INCA et REPROBUS : modèles de la composition atmosphérique, NEMO : modèle océan, LIM : modèle mer de glace, PISCES : modèle biosphère marine. Le modèle climatique IPSL-CM résulte du couplage de ces trois modèles. © IPSL. (D'après www.futura-sciences.com, https://cmc.ipsl.fr/)

l'évolution du climat (GIEC[1]) (en anglais IPCC pour « Intergovernmental Panel on Climate Change »), quatre différents scénarios RCP de forçage radiatif (« Representative Concentration Pathway », **Figure II.31**) ont été proposés (van Vuuren *et al.*, 2011) et sont désormais utilisés pour établir des projections de l'évolution (i) des émissions et des concentrations atmosphériques en GES, (ii) des émissions de polluants atmosphériques et (iii) de l'utilisation des terres. Les quatre RCP regroupent un scénario d'atténuation (RCP2.6 correspondant à un forçage radiatif de + 2,6 $W.m^{-2}$), deux scénarios intermédiaires (RCP4.5 et RCP6.0 correspondant respectivement à un forçage radiatif de + 4,5 et + 6 $W.m^{-2}$) et un scénario avec des émissions de GES très élevées (RCP8.5 : + 8,5 $W.m^{-2}$). Les 4 RCP sont utilisés par les climatologues pour produire des projections climatiques en les utilisant comme entrées à partir de modèles couplés océan-atmosphère de circulation générale (ou coupled GMCs, « Global coupled ocean-atmosphere general circulation models », *e.g.* modèle de l'institut Pierre Simon Laplace, **Figure II.32**) dans le cadre du projet d'intercomparaison des modèles couplés CMIP[2] (Dufresne *et al.*, 2013 ; Taylor *et al.*, 2012).

De nombreuses études ont souligné les effets négatifs ou positifs du changement climatique sur le développement phénologique des cultures (Racca *et al.*, 2015), leur rendement (Baux *et al.*, 2015), le développement des pathogènes (Evans *et al.*, 2010) et la qualité des graines (Hampton *et al.*, 2013 ; Namazkar *et al.*, 2016 ; Regitano Neto *et al.*, 2016). Le calendrier des cultures risque d'être perturbé, modifiant les schémas conventionnels actuels (par exemple les dates de semis, de récolte ainsi que les rotations), et pouvant de plus favoriser (ou défavoriser) l'apparition d'un certain nombre de pathogènes et de maladies (conditions devenues plus ou moins favorables à leur développement). De plus, il a déjà été montré qu'une température plus élevée permettait de réduire certains impacts négatifs d'une limitation en S (*e.g.* maintien des teneurs et augmentation de la qualité des acides gras, limitation de la baisse de la qualité protéique ; Brunel-Muguet *et al.*, 2015a). De ce fait, pour développer des systèmes à faibles intrants, il est nécessaire de prendre en compte conjointement les effets de la température et de la nutrition S, spécialement chez le colza qui est une culture exigeante en S. Comme les modèles de cultures simulent la croissance et le rendement sous différentes contraintes environnementales, principalement la température et le rayonnement, les

[1] Le GIEC a été créé en 1988 par l'Organisation Météorologique Mondiale (OMM) et le Programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE) pour évaluer les informations scientifiques, techniques et socioéconomiques concernant le changement climatique, ses effets potentiels et les options d'adaptation et d'atténuation.

[2] Le projet d'intercomparaison des modèles couplés CMIP (Coupled Model Intercomparison Project) est un projet du programme mondial de recherche sur le climat (WCRP). Ce projet cherche à réaliser des simulations climatiques de façon coordonnée entre les différents groupes de recherche pour permettre une meilleure estimation et compréhension des différences entre les modèles climatiques. Le projet est actuellement en phase 5 (CMIP5) (IPCC, 2014).

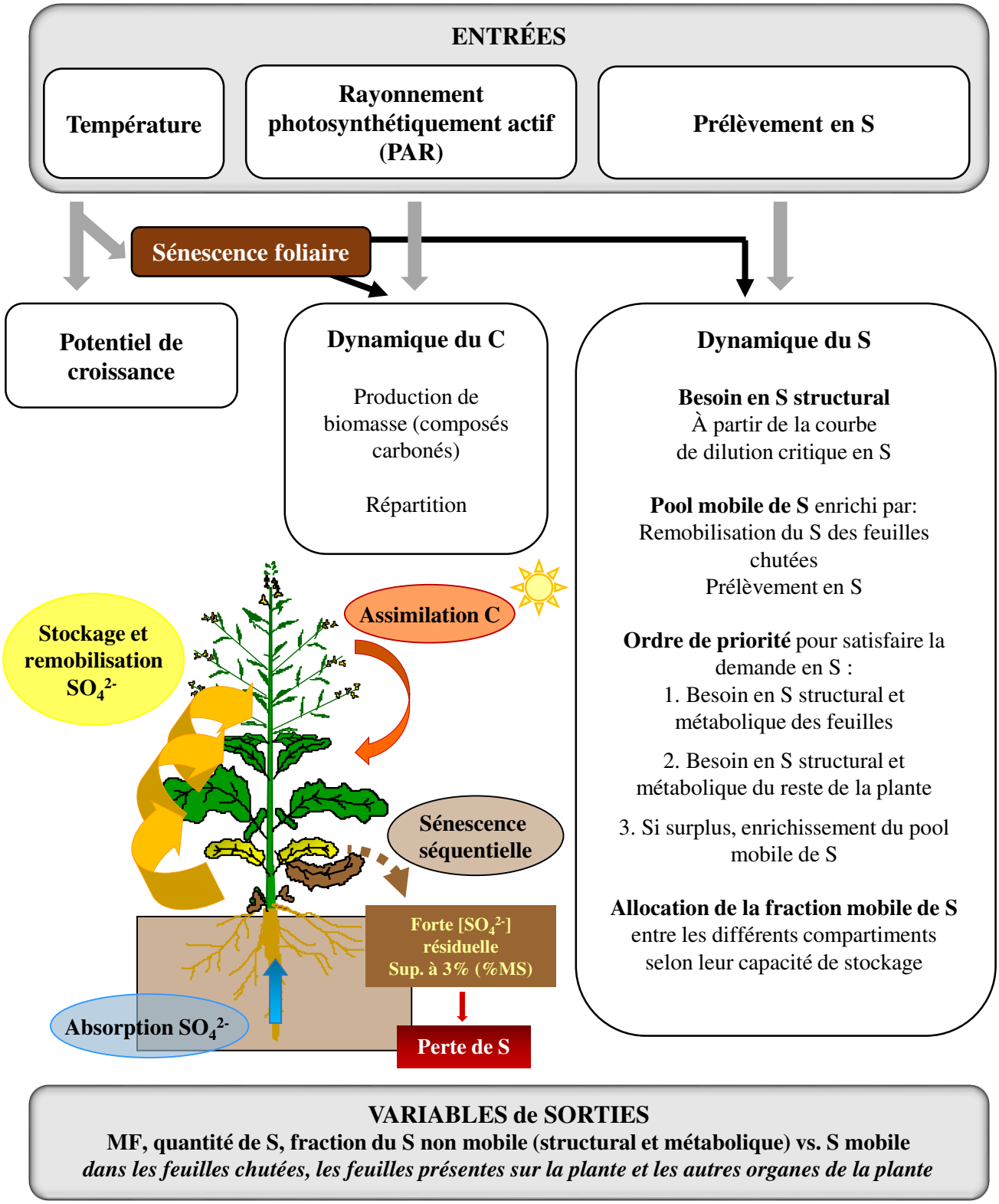


Figure II.33 : Représentation schématique du modèle SuMoToRI. Le modèle prend en compte les facteurs environnementaux suivants : température, rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) et alimentation en S. Ces facteurs pilotent (i) le potentiel de croissance, (ii) la dynamique du C et (iii) la dynamique du S dans chacun des compartiments de la plante. Les principaux processus et les règles sous-jacentes intégrées dans le modèle sont indiquées dans les différents encadrés : production et répartition des composés carbonés pour la dynamique du C, besoins structurels en S (remplissage prioritaire des feuilles), constitution du Pool Mobile de S (lequel est réparti entre les feuilles et le reste de la plante selon les règles d'allocation en fonction de leur capacité de stockage en SO_4^{2-}) pour la dynamique du S. D'après Brunel-Muguet *et al.* (2015b).

utiliser en tant qu'outils prédictifs peut être précieux afin d'anticiper les impacts possibles du changement climatique sur les pratiques culturales et de proposer des leviers d'amélioration et d'adaptation (Challinor *et al*., 2017).

V. Le modèle SuMoToRI

Le modèle SuMoToRI « Sulphur Model Towards Rapeseed Improvement » (Brunel-Muguet *et al.*, 2015b) est un modèle écophysiologique fondé sur des processus (« process-based model ») qui permet de prévoir en dynamique la croissance et les teneurs en S total et en S minéral du colza depuis la fin du repos végétatif jusqu'à l'apparition des premières siliques (*i.e.* pendant la période au cours de laquelle la plante constitue ses réserves en S). Trois compartiments sont explicités : les feuilles chutées, les feuilles photosynthétiques regroupées en une seule structure dite « big leaf », et les autres organes de la plante (racines, tiges/ramifications, inflorescences et siliques en formation). Plus précisément, ce modèle simule pour les trois compartiments (i) la croissance (surface foliaire et biomasse), (ii) l'allocation du S entre les différents compartiments et (iii) la répartition entre les fractions S minérale et organique pour chacun des compartiments, en fonction de trois facteurs environnementaux : la température, le rayonnement et le niveau d'alimentation en sulfate. Il fonctionne à pas de temps journalier et à l'échelle de la plante (**Figure II.33**).

Ce modèle mécaniste intègre les processus (i) d'assimilation du rayonnement photosynthétiquement actif ou PAR pour la synthèse des composés carbonés qui seront alloués aux différents organes en croissance, et (ii) d'assimilation, de remobilisation et d'allocation du S prélevé par la plante (**Figure II.33**). Ses particularités par rapport à d'autres modèles paramétrés chez le colza reposent sur (i) la formalisation des besoins critiques en S (incluant les besoins pour satisfaire les fonctions structurales et métaboliques) et (ii) l'estimation d'une fraction minérale mobile (principalement constitué de sulfate) représentant le potentiel de S remobilisable à partir d'organes sources vers les puits en croissance (les siliques contenant les graines).

En effet, la plupart des modèles de culture prédisent les réponses des cultures à la limitation des minéraux en fonction de leur demande critique de production de matière sèche. Les courbes de dilution critiques sont donc des équations centrales qui pilotent les processus tels que la remobilisation vers les puits en croissance. L'estimation des besoins structuraux et métaboliques en S est fondée sur l'établissement d'une courbe de dilution critique du S tel qu'établie pour le N par Colnenne (1998) en faisant l'hypothèse forte que les **besoins critiques** sont calculés en tenant compte **uniquement du S assimilé** (composés intervenant dans les structures et les fonctions métaboliques e.g. acides-aminés, protéines, sulfolipides, etc) et pas de la fraction du S minéral

<u>Tableau II.6</u> : Symbole, définition et unité des variables utilisées dans les équations du modèle présentées dans la Figure II.34. D'après Brunel-Muguet *et al.* (2015b).

Symbol	Definition	Unit	Equations
dTTi	Increase in Thermal Time between day i-1 and day i	°Cd	Eq. 1, 5, 12
t	Time in days	d	
TTcum	Accumulated Thermal Time	°Cd	
PAR interception			
PARabs	Absorbed Photosynthetic Active Radiation above the canopy at day i	MJ m^{-2}	Eq. 2
PAR_i	Incoming Photosynthetically active radiation above the canopy at day i	MJ m^{-2}	
Leaf Area expansion			
dLA_{TT}	Potential increase in Leaf Area	m^2 $plant^{-1}$	Eq. 1
dLA_{Carb}	Increase in Leaf Area Index according to carbohydrate production	m^2 $plant^{-1}$	Eq. 4
dLA_S	Increase in Leaf Area Index according to S offer	m^2 $plant^{-1}$	Eq. 15
LA_{BL}	Leaf Area of the big leaf (BL)	m^2 $plant^{-1}$	
LAI_{BL}	Leaf Area Index of the big leaf (BL)	m^2 m^{-2}	
LA_{FL}	Leaf Area of fallen leaves (FL)	m^2 $plant^{-1}$	
$dLA_{TOT\ effective}$	Effective increase in leaf area of all the produced leaves (BL and FL)	m^2 $plant^{-1}$	Eq. 18
Biomass production			
$dLDW_{TOT\ pot}$	Potential increase in Leaf Dry Weight of BL and FL		Eq. 3
$LDW_{TOT\ effective}$	Effective Leaf Dry Weight of all the produced leaves	g DW $plant^{-1}$	Eq. 18
$LDW_{effective\ BL}$	Effective Leaf Dry Weight of the big leaf	g DW $plant^{-1}$	
LDW_{FL}	Leaf Dry Weight of fallen leaves	g DW $plant^{-1}$	
DW_{rest}	Dry Weight of the rest of the plant (stem, roots, taproot, pods)	g DW $plant^{-1}$	
TDW	Total Dry Weight (including FL)	g DW $plant^{-1}$	
S amounts and contents			
dQS_{offer}	Increase in S offer	mg S $plant^{-1}$	Eq. 10
dQS_{uptake}	Increase S uptake	mg S $plant^{-1}$	Eq. 5
$dQS_{mobile\ pool}$	Increase in S-mobile pool	mg S $plant^{-1}$	Eq. 13
$QS_{mobile\ pool}$	Amount in the S- mobile pool (without S in FL)	mg S $plant^{-1}$	
$QS_{FL\ pot\ remob}$	Potential amount of remobilized S from FL	mg S $plant^{-1}$	Eq. 11
$dQS_{FL\ mobile}$	Increase in S- mobile pool in FL	mg S $plant^{-1}$	Eq. 14
$dQS_{org\ BL}$	Increase in organic S in the big leaf (BL)	mg S $plant^{-1}$	Eq. 6
$dQS_{org\ rest}$	Increase in organic S in the rest of the plant	mg S $plant^{-1}$	Eq. 8
$dQS_{mobile\ BL}$	Increase in mobile S in the big leaf (BL)	mg S $plant^{-1}$	Eq. 17
$dQS_{mobile\ rest}$	Increase in mobile S in the rest of the plant	mg S $plant^{-1}$	
QS_{BL}	Amount of S in BL (including structural and mobile S)	mg S $plant^{-1}$	
QS_{rest}	Amount of S in the rest of the plant (including organic and mobile S)	mg S $plant^{-1}$	
QS_{TOT}	Total amount of S in the plant (excluding FL)	mg S $plant^{-1}$	
QS_{FL}	Amount of S in FL	mg S $plant^{-1}$	
$[S_{BL}]_{crit}$	Critical S content in BL	mg S g^{-1} DW	Eq. 6,7
$[S_{rest}]_{crit}$	Critical S content in the rest of the plant	mg S g^{-1} DW	Eq. 8, 9
$[S_{BL}]_{org}$	Content of organic S in BL	mg S g^{-1} DW	
$[S_{BL}]_{mobile}$	Content of mobile S in BL	mg S g^{-1} DW	

considérée comme la fraction mobile de stockage. Cette adaptation de formalisme repose sur la spécificité de la nutrition en S chez le colza dont l'accumulation dans les vacuoles principalement sous forme de sulfate et d'autres formes minérales (Blake-Kalff *et al*., 1998) est pléthorique. Des quantités importantes de formes minérales peuvent être stockées dans les feuilles sans être assimilées sous formes organiques. Par conséquent, les courbes de dilution du S nécessitent de considérer uniquement les quantités de S assimilées qui sont calculées comme la différence entre les quantités de S total et les quantités de S dans les formes minérales stockées. Cette étape n'est pas nécessaire pour établir les courbes de dilution du N calibrées pour les cultures en C3 et C4 (Colnenne, 1998 ; Greenwood *et al*., 1990 ; Lemaire et Gastal, 1997) étant donné l'assimilation plus directe conduisant à un stockage du N minéral relativement faible. *In fine*, bien que des équations de puissance allométrique similaires à celles servant aux courbes de dilution critique du N soient utilisées, les courbes de dilution critique du S ne peuvent pas être obtenues avec la teneur en S total mais avec la teneur en S total diminuée de la teneur en S provenant du sulfate ($S\text{-}SO_4^{2-}$).

Dans le modèle SuMoToRI, la croissance effective de chaque organe est calculée à chaque pas de temps (soit 1 jour, qui correspond au temps thermique cumulé pendant le jour i, dTTi) à partir (i) de la croissance potentielle des organes qui est une fonction du temps thermique, (ii) de la disponibilité en composés carbonés (offre en C) et (iii) de la disponibilité en S (offre en S) qui est calculée dans la version actuelle du modèle comme la somme des quantités de S prélevé quotidiennement et de la fraction mobile de S remobilisable. La variable centrale du modèle est la surface foliaire (LA : Leaf Area). À chaque pas de temps (dTTi), l'augmentation de LA (dLA) est calculée en fonction de chacun des trois facteurs mesurés de façon journalière (i) la température permettant l'augmentation de croissance potentielle (dLApot), (ii) le PAR incident absorbé permettant l'augmentation de surface foliaire par la production d'assimilats carbonés (dLAcarb), et (iii) l'offre en S permettant de satisfaire les besoins en S pour la croissance foliaire (dLAS). L'augmentation journalière effective de LA (dLAeff) correspond au minimum des trois augmentations journalières (dLApot, dLAcarb ou dLAS), en s'appuyant sur le postulat fondé sur la loi du minimum de Liebig (Justus Von Liebig, 1840, dans Salisbury, 1992) que l'un des trois facteurs est limitant pour la croissance foliaire. Des règles d'allocation régissent les fonctions d'offre et de demande, avec une priorité accordée aux feuilles photosynthétiques pour les assimilats carbonés et pour leurs besoins en S nécessaires aux fonctions structurales et métaboliques.

La **Figure II.34** ainsi que les **Tableaux II.6**, **II.7** et **II.8** présentent le fonctionnement mécaniste du modèle ainsi que les équations utilisées pour décrire les relations source-puits pour le carbone et pour le soufre dans la plante, les symboles, les définitions et les unités des différentes variables et

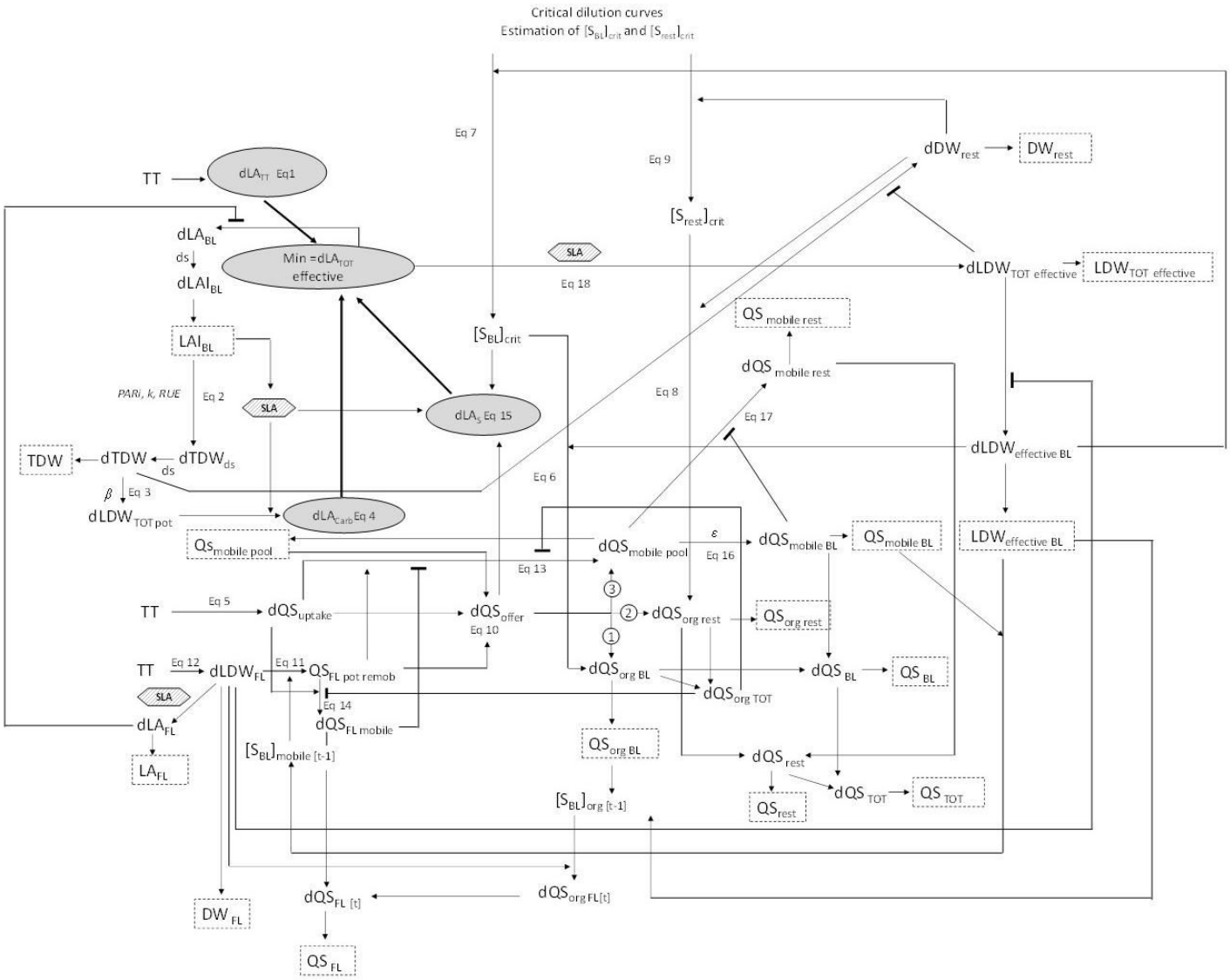
Tableau II.7 : Symbole, définition et unité des paramètres utilisés dans les équations du modèle présentées dans la Figure II.34. D'après Brunel-Muguet *et al.* (2015b).

Symbol	Definition	Unit	Equations
Sowing condition			
ds	Plant density	plant m^{-2}	
PAR interception			
k	PAR extinction coefficient	m^2 m^2	Eq. 2
S uptake			
QS_{ini}	Initial S uptake	mg S $plant^{-1}$	Eq. 5
aQS	Parameters of the function describing QS as a function of TT	mg S $plant^{-1}$	
bQS		°Cd $^{-1}$	
Potential leaf growth			
LA_0	Initial leaf area of photosynthetic leaves	m^2 $plant^{-1}$	Eq. 1
LA_{max}, K, *n*	Leaf area expansion parameters	m^2 $plant^{-1}$, °Cd, dimensionless	
C acquisition and plant offer			
$PARabs_{ini}$	Initial absorbed PAR	MJ m^{-2}	Eq. 2
TDW_{ini}	Initial total dry weight	g DW $plant^{-1}$	
RUE	Radiation use efficiency	g DW MJ^{-1}	Eq. 12
$DW_{FL\ ini}$	Initial dry weight of fallen leaves	g DW $plant^{-1}$	
$aLDW_{FL}$	Parameters of the function describing the time progression of dry	g DW $plant^{-1}$°Cd^{-1}	
$bLDW_{FL}$	weight of the fallen leaves	dimensionless	
C allocation to leaves			
β	Coefficient of dry weight allocation to the leaves	dimensionless	
Big leaf C demand			Eq. 3
$LDW_{BL\ ini}$	Initial dry weight of the big leaf	g DW $plant^{-1}$	
SLA	Specific Leaf Area	m^2 g DW $^{-1}$	
Growth S Demand			
α_{BL}	Parameters to estimate critical S content in BL as a function of	mg S $plant^{-1}$	Eq. 7
β_{BL}	the dry weight of the BL	dimensionless	
α_{rest}		mg S $plant^{-1}$	Eq. 9
β_{rest}	Parameters to estimate critical S content in the rest of the plant as a function of dry weight of the rest of the plant	dimensionless	
Mobile S allocation to leaves			
ε_{pot}	Coefficient of potential repartition of mobile S to the leaves	dimensionless	Eq. 17

Tableau II.8 : Valeurs des paramètres utilisés pour la calibration du modèle SuMoToRI en conditions HS (High Sulphur) et LS (Low Sulphur). D'après Brunel-Muguet *et al.* (2015b).

Symbol	Definition	HS	LS	Unit	Source
PAR interception					
k	PAR extinction coefficient	k=0.75		m^2 m^{-2}	Bonhomme et al. 1982
Potential leaf growth					
LA_{max}	Leaf area expansion parameters	LA_{max}=0.20		m^2 $plant^{-1}$	Estimated
K		K=872.96		°Cd^{-1}	
n		n=6.31		dimensionless	
C acquisition and plant offer					
RUE	Radiation use efficiency	4.59	3.11	g DW MJ^{-1}	Estimated
$aLDW_{FL}$	Parameters of the function describing the time progression of LDW_{FL}	0.0092		g DW $plant^{-1}$ °Cd^{-1}	Estimated
$bLDW_{FL}$		0.0043		dimensionless	
C allocation to leaves					
β	Coefficient of DW allocation to the leaves	0.41		dimensionless	Estimated
C demand of the big leaf					
SLA	Specific leaf area	0.028		m^2 g DW^{-1}	Estimated
Growth S Demand					
α_{BL}	Parameters to estimate critical S content in BL	5.11		mg S $plant^{-1}$	Estimated
β_{BL}	as a function of LDW_{BL}	-0.52		dimensionless	
		For LS: threshold value $[S]_{BL}crit$ = 3 mg S g DW^{-1} for LDW_{BL}< 3 g $plant^{-1}$			
α_{rest}	Parameters to estimate critical S content in the	1.83		mg S $plant^{-1}$	Estimated
β_{rest}	rest of the plant as a function of DW_{rest}	-0.004		dimensionless	
Potential mobile S allocation to leaves					
ε_{pot}	Coefficient of potential repartition of mobile S to the leaves	0.8		dimensionless	Estimated

des différents paramètres utilisés dans les équations du modèle, comme présentés dans Brunel-Muguet *et al*. (2015).



<u>Figure II.34</u> : Schéma « workflow » du modèle SuMoToRI. Le modèle prédit l'expansion de la surface foliaire, la biomasse et les quantités de S dans la plante entière et pour les différents compartiments de la plante (feuilles vertes, feuilles chutées et reste de la plante), divisé en deux fractions : organique (besoins structurels en S, remplissage prioritaire des feuilles) et mobile (constitution du pool mobile de S lequel est réparti entre les feuilles et le reste de la plante selon les règles d'allocation en fonction de leur capacité de stockage en SO_4^{2-}), de la fin de l'hiver jusqu'au début de formation des siliques.

Les flèches indiquent les variables précédentes et dépendantes. Les lignes à extrémité plate représentent la soustraction de la variable (pour plus de détails, voir les équations correspondantes dans les **Tableaux II.6 et II.7**). Les chiffres entourés d'un cercle indiquent l'ordre de priorité pour satisfaire les demandes de S par rapport à l'offre en S. Les variables d'état sont encadrées avec des lignes en pointillés. Les définitions des variables et des paramètres abrégés sont données dans les **Tableaux II.6 et II.7**. D'après Brunel-Muguet *et al.* (2015b).

PLAN DE RECHERCHE

Objectifs et démarches associées

PLAN DE RECHERCHE : OBJECTIFS ET DÉMARCHES ASSOCIÉES

L'importance de la fertilisation soufrée a émergé suite à l'apparition, principalement en Europe de l'ouest, de symptômes de carences en soufre, essentiellement dûs à la forte diminution des retombées atmosphériques industrielles soufrées (protocoles d'Helsinki ; 1985, protocole de Oslo ; 1994), pouvant conduire à une forte altération des rendements et de la qualité des graines de colza. De plus, l'existence de fortes interactions entre les métabolismes soufré et azoté peuvent impacter l'efficience d'utilisation de ces éléments ainsi que le rendement ou la qualité des graines si les apports en S et N ne sont pas équilibrés.

Dans ce contexte, étudier l'impact de différentes stratégies de fertilisation en S et N sur les composantes du rendement et la qualité des graines de colza est un prérequis à l'amélioration de la gestion de la fertilisation S et N et/ou à l'identification de nouveaux indices de qualité de la graine. Nous avons ainsi conduit (i) des expérimentations *in planta* en conditions contrôlées et de plein champ (**Partie A**) et (ii) des expérimentations numériques (*in silico*) *via* un modèle écophysiologique (**Partie B**) simulant les réponses de croissance à la disponibilité en S (SuMoToRI « Sulphur Model Towards Rapeseed Improvement »), réalisées dans différents contextes de fertilisation S et conditions climatiques. Les principaux objectifs de la thèse sont d'étudier, au moyen de ces deux approches complémentaires, (i) l'impact de différentes stratégies de fertilisation S en interaction avec la fertilisation N sur les composantes de rendement et la qualité de la graine, (ii) l'incidence du changement climatique en se focalisant sur l'augmentation des températures et (iii) l'effet de la variabilité des paramètres « plante » du modèle (relatifs à l'efficience d'usage du rayonnement et à l'allocation du C aux feuilles) sur la croissance ainsi que sur les composantes du rendement et la qualité des graines de colza.

Les attendus de la thèse concernent donc (i) la recherche de **stratégies de fertilisation en S** qui soient raisonnées avec les **apports de N** pour optimiser le rendement et la qualité grainière et/ou qui prennent en compte les **effets du réchauffement climatique** et, (ii) l'identification de **nouveaux indicateurs de la qualité grainière** permettant notamment de rendre compte de la qualité protéique en fonction des apports de S et de N.

A. Expérimentations *in planta* en conditions contrôlées et de plein champ

A.1 Étude de différentes stratégies de fertilisation S et N sur les performances agronomiques et la qualité protéique des graines de colza : identification d'indicateurs de la qualité protéique des graines

Hypothèse : L'impact de la fertilisation S sur les rendements et sur la qualité nutritionnelle des graines pourrait être modulée en fonction des quantités de fertilisants N apportées et en fonction de la date et/ou du fractionnement de l'apport en fertilisants S, étant donné les fortes interactions existant entre les métabolismes S et N et l'importance du stade de développement auquel survient la limitation en S.

Objectif : L'objectif est de comparer différentes stratégies de fertilisations se différenciant par la dose des apports en minéraux S et N et par le fractionnement ou l'apport tardif en fertilisants S, afin d'optimiser l'efficience d'utilisation en S et N, le rendement et la qualité nutritionnelle des graines.

Méthodologie : Différentes modalités de fertilisations S et N faisant varier les doses, les stades et le fractionnement ont été appliquées en conditions contrôlées. À la fin de la culture, les productions de biomasses, les composantes de rendement (nombre de graines produites par plante, indices de récoltes en S et en N) et les efficiences d'utilisation du S et du N ont été étudiées en réponse aux modalités de fertilisations. L'analyse de la composition des graines (teneurs en huile, protéines et S) ainsi que l'analyse de la qualité des protéines de réserves des graines a été menée.

Ces travaux sont regroupés dans un article dont la soumission est prévue début Novembre dans Frontiers in Plant Science : Seed yield components and seed quality of oilseed rape are impacted by the sulfur fertilization and its interactions with nitrogen fertilization.

A.2 Évaluation de l'impact de différents schémas de fertilisation soufrée sur la qualité protéique des graines de colza et validation d'indicateurs de la qualité protéique des graines en condition de plein champ

Hypothèse : La fertilisation soufrée est cruciale en condition de plein champ afin de garantir une bonne qualité protéique des graines de colza. Le %S dans les graines est un indicateur de la qualité des protéines de réserves de la graine et peut permettre d'identifier les sites ou les génotypes les plus sensibles à une limitation en S.

Objectif : Évaluer l'impact de différents schémas de fertilisation soufrée au champ sur les composantes du rendement et la qualité protéique des graines de colza. Ces données pourront aider à la validation d'indicateurs de la qualité protéique des graines en champ, et à souligner l'effet de la fertilisation soufrée quel que soit le site ou le génotype.

Méthodologie : Une culture de colza d'hiver (Variété ATTLETICK) ayant reçu différents niveaux de fertilisation en S a été conduite au champ en 2015-2016 (site de Prenois, Bourgogne, collaboration avec ARTEMIS Dijon-Céréales). Ce dispositif expérimental a été mis en place afin d'évaluer les effets de la variation des niveaux de disponibilité en sulfate dans le sol sur le rendement et la qualité protéique des graines de colza. En complément, des analyses de la teneur en S dans les lots de graines provenant des réseaux d'essais de Terres Inovia de deux campagnes (2015 et 2016) ont été réalisées. Les lots de graines (2015 et 2016) provenaient respectivement de 14 variétés de colza cultivées sur 4 sites en 2015 et 8 variétés sur 7 sites en 2016 selon des itinéraires de fertilisation S variables. Ces analyses ont permis d'étudier séparément l'effet génotype et l'effet site, c'est-à-dire l'effet des pratiques culturales mais également des variabilités environnementales et pédologiques sur la teneur en S et sur la qualité protéique des graines de colza.

B. Expérimentation numériques in silico avec le modèle écophysiologique SuMoToRI

B.1 Optimisation de la fertilisation soufrée dans un contexte d'augmentation des températures printanières : simulations avec le modèle SuMoToRI sous différents scénarios climatiques

Hypothèse : L'augmentation des températures projetée par les différents scénarios climatiques pourrait avoir un impact sur les cultures de colza, du fait des interactions entre les facteurs climatiques (température, rayonnement, précipitations, etc) et nutritionnels. Ces interactions peuvent avoir un impact sur le développement du colza et à terme, sur la qualité nutritionnelle des graines.

Objectif : Les objectifs sont (i) de prédire et quantifier les performances des plantes (production de biomasse, quantité de S minéral dans les feuilles, indice de surface foliaire) sous des projections climatiques à l'horizon 2100 (issues des 4 scénarios climatiques RCP du 5ème rapport du GIEC, pour 7 localités dans l'hémisphère Nord retenues parmi les principaux pays producteurs de colza) et (ii) d'analyser les contraintes induites par les facteurs climatiques considérés (température et

rayonnement) sur les performances de la plante en regard de la fertilisation soufrée. Pour des raisons de paramétrage inhérentes à la version actuelle du modèle, les performances sont simulées jusqu'au début de formation des siliques. Il est fait l'hypothèse que les teneurs en sulfates au niveau foliaire simulées sont indicatrices du potentiel de remobilisation du S vers les siliques en croissance et par conséquent du statut soufré des graines à maturité.

Méthodologie : Dans cette étude, nous avons utilisé le modèle de culture SuMoToRI, qui simule la dynamique de croissance, l'allocation du S dans les différents compartiments de la plante (feuilles photosynthétiques, feuilles chutées et les autres organes regroupés) et les quantités de S minéral et organique dans différents compartiments de la plante, depuis la fin de la période de repos végétatif (GS30) au début de formation des siliques (GS70). Afin d'estimer l'impact des projections thermiques et de rayonnement associées à horizons 2100, sur la croissance et la gestion du S au sein de la plante, des simulations ont été réalisées pour chaque localité, pour chaque scénario climatique et pour deux niveaux contrastés de disponibilité en S.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans European Journal of Agronomy : SuMoToRI Model Simulations for Optimizing Sulphur Fertilization in Oilseed Rape in the Context of Increased Spring Temperatures (Poisson *et al*., 2018b).

B.2 Identification d'idéotypes pour optimiser les performances du colza sous différentes stratégies de fertilisation soufrée par simulations avec le modèle SuMoToRI et analyses de sensibilité

Hypothèse : Les caractéristiques d'un génotype peuvent avoir une grande influence sur les performances de la plante. Les différences génotypiques peuvent par exemple distinguer des génotypes selon leur degré d'efficience d'utilisation du S et ainsi leur réponse à la fertilisation en S. Dans un modèle de culture, l'étape de calibration des paramètres décrivant les caractéristiques de la plante fixe leur valeur qui peut néanmoins varier selon le génotype. Dans le modèle SuMoToRI, trois paramètres associés au fonctionnement de la plante ont été ciblés car ils présentaient une variabilité de réponse à la disponibilité en S. Il s'agit de l'efficience d'utilisation des rayonnements (RUE, g de $MS.MJ^{-1}$), de la surface foliaire spécifique (SLA, $m^2.g\ MS^{-1}$) et du coefficient d'allocation du C aux feuilles (β, sans dimension). **Les combinaisons de différentes valeurs de ces paramètres** peuvent alors définir une **multitude de génotypes virtuels ou idéotypes** dont on peut tester les performances par modélisation. Souvent, il s'agit de tester plusieurs de ces paramètres

conjointement ou non et de quantifier l'impact de leur variation sur les sorties du modèle pour guider des schémas d'amélioration.

Objectif : Dans le cadre de notre étude, nous avons cherché à identifier l'importance de certains paramètres du modèle sur les performances du colza en termes de croissance et de gestion des réserves soufrées en fonction de différentes stratégies de fertilisation en S. Cette démarche vise à définir des **idéotypes variétaux** *i.e.* en testant la variabilité des valeurs de certains paramètres inhérents au fonctionnement de la plante et **des idéotypes culturaux** *i.e.* en testant différents schémas de fertilisation soufrée.

Les objectifs sont (i) de quantifier les impacts des variations de trois paramètres de la plante sur les variables de sortie du modèle, principalement la biomasse de la plante, l'indice de surface foliaire et la fraction de S mobile dans les feuilles qui est un indicateur du S remobilisable vers les organes reproducteurs en croissance (péricarpes des siliques et graines) et (ii) d'identifier des combinaisons de valeurs des trois paramètres pour définir des idéotypes adaptés aux différentes stratégies de fertilisation S testées.

Méthodologie : Des analyses de sensibilités globales ont été effectuées et deux indices de sensibilité ont été déterminés *i.e.* le coefficient de corrélation partielle (PRCC) et l'indice de Sobol. Les simulations ont été réalisées sous différentes stratégies de fertilisation S, différant en termes de disponibilité en S (5 niveaux : 20, 37,5, 50, 75 et 300 U SO_3), de date d'apport (à la montaison (GS30) ou en début de floraison (GS60)) et de fractionnement des apports (apport en une ou deux fois *i.e.* montaison et floraison).

L'ensemble de ces résultats est rassemblé au sein d'un article publié dans PLOS ONE : Sensitivity analyses for improving sulfur management strategies in Winter Oilseed Rape / Sensitivity analyses and sulfur management (Poisson *et al.*, 2018a).

B.3 Autres développements réalisés avec le modèle SuMoToRI

Hypothèse : La prévision de la teneur en S dans les feuilles au début de formation des siliques par le modèle SuMoToRI est un proxy de la qualité protéique des graines de colza. Le niveau de fertilisation en N et l'apport fractionné de S doivent être pris en compte dans les formalismes du modèle SuMoToRI pour simuler correctement les variables de sortie.

Objectif : Les objectifs sont de (i) vérifier que les performances sous les modalités d'apport unique, fractionné ou décalé sont bien simulées par le modèle, (ii) vérifier que la teneur en S dans les feuilles au début de la floraison est bien simulée et peut donc être un indicateur précoce fiable

de la qualité grainière, notamment de la teneur en S dans les graines, et (iii) mettre en évidence la nécessité d'intégrer les interactions SxN pour prédire les performances du colza dans des conditions limitantes en N.

Méthodologie : Nous avons cherché à comparer les observations issues des différentes cultures réalisées en conditions contrôlées (**Chapitre IV.A.1**) aux simulations réalisées dans les mêmes conditions climatiques (température et rayonnement) et d'alimentation en S. Dans un premier temps, nous avons comparé les observations issues des conditions **non limitantes en N et pour lesquelles l'apport en S a été réalisé en une fois** (0S_HN, 8S_HN, 30S_HN) avec les simulations réalisées avec les fonctions de prélèvements correspondantes dans l'objectif de **vérifier la pertinence de la teneur en S foliaire prédite comme indice précoce de la qualité de la graine**. Puis, nous avons confronté les observations issues des conditions **non limitantes en N et pour lesquelles les apports en S ont été fractionnés** (0+30S_HN et 8+22S_HN) avec les simulations réalisées avec les fonctions de prélèvements correspondantes dans l'objectif de **vérifier si le fractionnement de l'apport en S était bien simulé**. Enfin, nous avons confronté les observations issues des conditions limitantes en N (0S_LN, 8S_LN, 30S_LN) avec les simulations réalisées avec les fonctions de prélèvement en S correspondantes pour mettre en évidence **l'importance d'intégrer les interactions SxN dans le modèle pour améliorer les simulations**.

CHAPITRE III

Matériels & Méthodes

<u>Tableau III.A.1</u> : Composition de la solution nutritive utilisée (Hoagland ¼ avec seulement des traces de S et N) pour la culture de colza en serre, en complément des apports manuels en S et en N. **Élements apportés uniquement entre le semis et le premier apport de S et de N afin de compenser les apports en Mg et Ca. **$NiCl_2$ apporté uniquement entre les semis et la fin de vernalisation.*

Macroéléments	Concentration (mM)	Microéléments	Concentration (µM)
KH_2PO_4	0,25	H_3BO_3	14
KCl	1,25	$MnSO_4$, H_2O	5
EDTA, NaFe, $3H_2O$	0,2	$ZnSO_4$, $7H_2O$	3
$MgCl_2$, $6H_2O$*	0,5	$CuSO_4$, $5H_2O$	0,7
$CaCO_3$*	2,375	$(NH_4)_6$ Mo_7O_{24}	0,7
		$CoCl_2$	0,1
		$NiCl_2$**	0,04

<u>Tableau III.A.2</u> : Composition des différentes solutions apportées manuellement au stades GS32 (début de montaison) et/ou GS53 (boutons accolés) afin d'étudier les interactions entre la fertilisation S et N (**A**) et d'étudier l'impact du fractionnement ou du retard de l'apport en S (**B**) sur la qualité des graines de colza.

	Traitements	Solution apportée à GS32		Solution apportée à GS53		Volume apporté par plante
		$Ca(\mathbf{NO_3})_2$, $4H_2O$	$Mg\mathbf{SO_4^{2-}}$, $7H_2O$	$Ca(\mathbf{NO_3})_2$, $4H_2O$	$Mg\mathbf{SO_4^{2-}}$, $7H_2O$	
A	**0S_HN**		0 mM			
	8S_HN	250 mM	31 mM	178,5 mM		
	30S_HN		117 mM			
	8S_MN		31 mM		0 mM	20 ml
		190 mM		134 mM		
	30S_MN		117 mM			
	8S_LN		31 mM			
		127 mM		0 mM		
	30S_LN		117 mM			
B	**30+0S_HN**		117 mM		0 mM	
	0+30S_HN	250 mM	0 mM	178,5 mM	117 mM	20 ml
	8+22S_HN		31 mM		86 mM	

CHAPITRE III – MATÉRIELS & MÉTHODES

A. Expérimentations végétales *in planta*, conditions de cultures et analyses associées

I. Descriptif des cultures

I.1 En conditions contrôlées

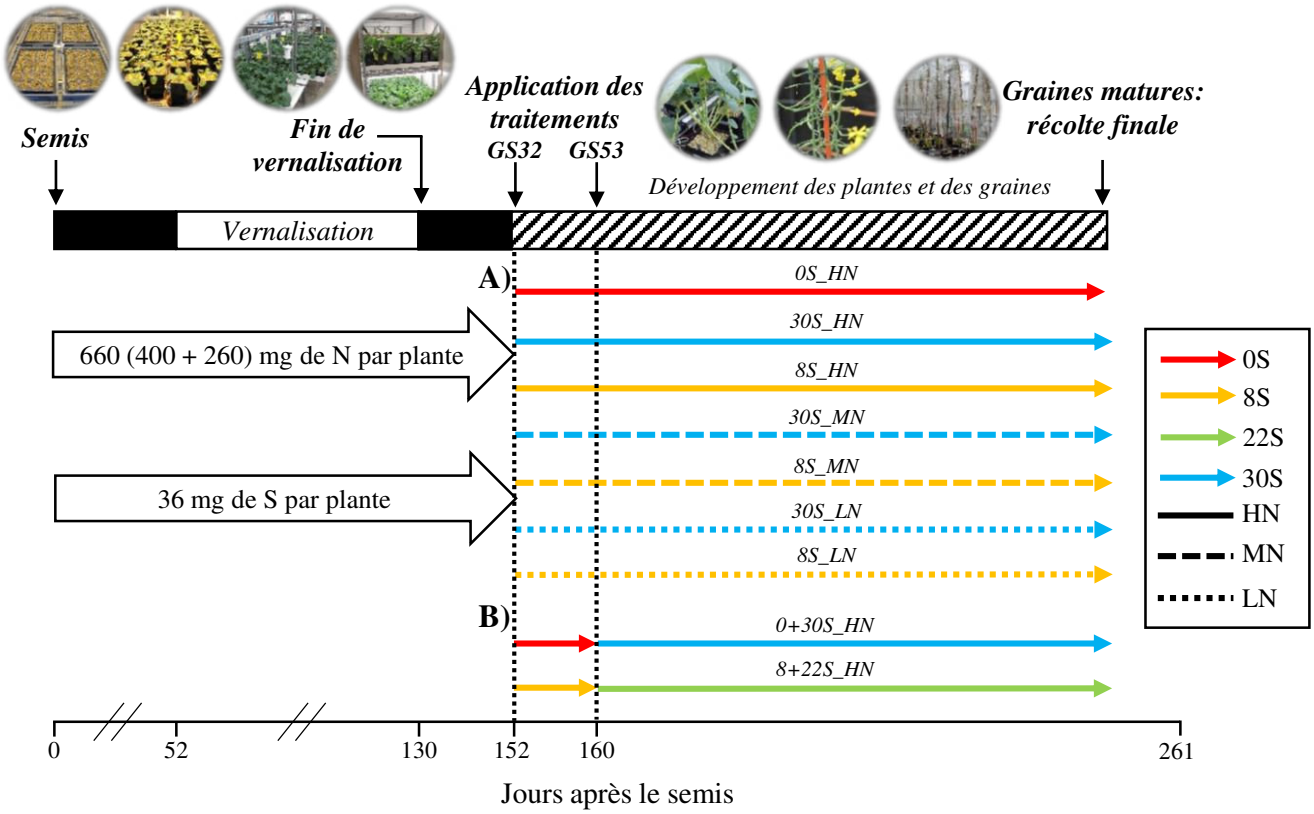
Le dispositif expérimental mis en place en serre avait pour objectifs (i) d'étudier les effets d'apports contrastés en engrais S et N (interactions S et N) et (ii) de déterminer l'impact d'un apport fractionné ou tardif en S en condition non limitante en N sur les composantes du rendement en graines et sur la qualité nutritionnelle des graines de colza.

Les semences de colza (*Brassica napus* L.) de la variété « 00 » Aviso ont été stérilisées à l'éthanol 80 % pendant 30 secondes puis à l'hypochlorite de sodium 20 % pendant 10 minutes. Après un rinçage abondant à l'eau osmosée, les graines ont été mises à germer sur de la vermiculite imbibée d'eau osmosée puis alimentées avec une solution nutritive à 25 % de Hoagland sans S ni N (seulement des traces) renouvelée deux fois par semaine, ceci jusqu'au premier apport de S et de N (**Tableau III.A.1**). Après 24 jours, les plantules ont été transférées individuellement dans des pots de 2 L contenant un substrat inerte correspondant à un mélange de perlite/vermiculite (2V/1V). La thermopériode était de 16 h de jour à 20 °C et de 8 h de nuit à 15 °C, ceci pendant 26 jours. La lumière naturelle était fournie par des lampes au sodium à haute pression (Philips, MASTER GreenPower T400W) avec un rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) de 400 µmol photon.s^{-1}.m^{-2} au sommet de la canopée. Afin de contrôler les apports en S et en N, chaque plante a reçu manuellement et directement sur le substrat 10 mL d'une solution de $MgSO_4,7H_2O$ et de $Ca(NO_3)_2,4H_2O$, fournis à 3 reprises avant la vernalisation (18, 28 et 40 jours après le semis), correspondant à un total de 36 mg de S et de 400 mg de N. Les plantes ont chacune reçu selon leur besoin entre 30 et 90 mL par jour d'une solution nutritive à 25 % de Hoagland sans S ni N (seulement des traces) (**Tableau III.A.1**).

Les plantes ont ensuite été soumises à une période de vernalisation de 78 jours : 46 jours en condition naturelle extérieure (température entre 2 °C et 14 °C et photopériode de 8 h à 9 h) suivies de 32 jours en conditions contrôlées à 8 °C (jour de 10 h) et 4 °C (nuit de 14 h). Après la vernalisation, les plantes ont été transférées en serre à la Plateforme de Phénotypage Haut Débit (PPHD) de l'INRA de Dijon. Elles ont été cultivées sous une thermopériode de 20 °C (jour de 16

<u>Tableau III.A.3</u> : Descriptif des différents traitements en termes d'unités (U : kg S.ha^{-1}) de S et/ou de N apportées à GS32 (début de montaison) et/ou GS53 (boutons accolés) afin d'étudier les interactions entre la fertilisation S et N (**A**) et d'étudier l'impact du fractionnement ou du retard de l'apport en S (**B**) sur la qualité des graines de colza.

	Traitements	U de **S** apportées à **GS32**	U de **S** **apportées** à **GS53**	U de **N** **apportées** à **GS32**	U de **N** **apportées** à **GS53**
A	**0S_HN**	0			
	30S_HN	30	0	57,2	40
	8S_HN	8			
	30S_MN	30	0	42,7	30
	8S_MN	8			
	30S_LN	30	0	28,4	0
	8S_LN	8			
B	**0+30S_HN**	0	30	57,2	40
	8+22S_HN	8	22		



<u>Figure III.A.1</u> : Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour l'étude les effets d'apports contrastés en engrais S et N (A) et l'étude de l'impact d'un apport fractionné ou tardif en S en condition non limitante en N (B) sur les composantes du rendement en graines et sur la qualité nutritionnelle des graines de colza. Les différents niveaux de S correspondent à un apport de 0 kg S.ha^{-1} (0S), 8 kg S.ha^{-1} (8S), 22 kg S.ha^{-1} (22S) ou 30 kg S.ha^{-1} (30S), et les différents niveaux de N correspondent à un apport de 28,4 kg N.ha^{-1} (Low N : LN), 72,7 kg N.ha^{-1} (Mid N : MN) ou 97,2 kg N.ha^{-1} (High N : HN). Ces traitements ont été appliqués manuellement à deux stades de développement différents : GS32 (début de montaison) et/ou GS53 (boutons accolés).

h) et 15 °C (nuit de 8 h). Dès leur installation en serre après vernalisation, chaque plante a reçu un premier apport de N de 260 mg par une solution de $Ca(NO_3)_2,4H_2O$, correspondant à un équivalent de 100 unités de N (100 kg de $N.ha^{-1}$) calculé pour une densité de 40 plantes.m^{-2} (la véritable densité des plantes étant de 18 plantes.m^{-2}).

I.1.a Dispositif expérimental mis en place pour l'étude des interactions entre la fertilisation soufrée et azotée sur la qualité des graines de colza

Afin de mimer les apports de S et de N fournis dans des conditions de plein champ, 7 différentes combinaisons de fertilisations S et N ont été appliquées manuellement aux plantes *via* différentes solutions de $MgSO_4,7H_2O$ et de $Ca(NO_3)_2,4H_2O$ dont les compositions sont précisées dans le **Tableau III.A.2**, ceci à 2 stades différents de développement (GS32 : début de montaison et/ou GS53 : boutons accolés ; Lancashire *et al.*, 1991). Ces différents traitements comprenaient 3 niveaux de S total allant de 0 kg $S.ha^{-1}$ (0S), 8 kg $S.ha^{-1}$ (8S) à 30 kg $S.ha^{-1}$ (30S), et 3 niveaux de N total allant de 28,4 kg $N.ha^{-1}$ (Low Nitrogen, LN), 72,7 kg de $N.ha^{-1}$ (Mid Nitrogen, MN) à 97,2 kg de $N.ha^{-1}$ (High Nitrogen, HN) (**Tableau III.A.3**). Les apports de N ont été appliqués en deux fois, aux stades de développement C2/GS32 (début de montaison entre-nœuds visibles) et D2/GS53 (boutons accolés) (**Figure III.A.1**). Les quantités de N apportées correspondaient à 57,2 ; 42,7 et 28,4 Unités de N (U : kg de $N.ha^{-1}$) au stade GS32 et à 40, 30 et 0 U de N au stade GS53 respectivement pour les conditions HN, MN et LN (**Tableau III.A.3**). Les apports de S (30S et 8S) ont été fournis uniquement au stade GS32 et ont été associées à chaque condition N (30S_HN, 8S_HN, 30S_MN, 8S_MN, 30S_LN et 8S_LN). La condition 0S a été uniquement associée à la modalité HN (contrôle négatif, HN_0S).

I.1.b. Dispositif expérimental mis en place pour l'étude de l'impact du fractionnement ou du retard de l'apport en S sur la qualité des graines de colza

Le second objectif de ce travail était d'étudier l'impact du retard ou du fractionnement de l'apport de S sur le rendement et la qualité nutritionnelle des semences. En condition non limitante en N (HN), le S a été fourni à un ou deux stades de développement différents : au stade C2 (GS32) et/ou au stade D2 (GS53) (**Tableau III.A.3**). La condition fractionnée (8+22S_HN) correspond à un double apport de 8 U et 22 U de S fourni respectivement à GS32 et à GS53. L'apport retardé en S (0+30S_HN) correspond à un seul apport de 30U de S à GS53 et le traitement 30+0S_HN correspond à un seul apport de 30 U de S à GS32 (traitement de contrôle correspondant à la condition 30S_HN) (**Tableau III.A.3**, **Figure III.A.1**).

B4	402 **30K2**	406 **30P2**	403 **30P1**	407 **30P1+30P2**	405 **60P1**	401 **0S**	404 **60P2**
B3	305 **60P1**	304 **60P2**	303 **30P1**	306 **30P2**	302 **30K2**	301 **0S**	307 **30P1+30P2**
B2	207 **30P1+30P2**	206 **30P2**	202 **30K2**	205 **60P1**	201 **0S**	203 **30P1**	204 **60P2**
B1	101 **0S**	102 **30K2**	103 **30P1**	104 **60P2**	105 **60P1**	106 **30P2**	107 **30P1+30P2**

Figure III.A.2 : Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place au champ (Prenois, Bourgogne). La parcelle comprend 4 blocs (B1 à B4) et 7 modalités d'apports en S détaillées dans le **tableau III.A.4**. *Chaque traitement est associé à un code couleur.*

Tableau III.A.4 : Détail des 7 modalités d'apport en S pour l'expérimentation au champ (Prenois, Bourgogne).

Modalité	Type d'apport en S	Unités de S à C1	Unités de S à C2	N
0S	0 kg	**/**	**/**	
30K2	Kieserite (150 kg)		**30 U**	
30P1	Polysulphate (156 kg)	**30 U**		
30P2	Polysulphate (156 kg)		**30 U**	171,6 U (Méthode bilan)
60P1	Polysulphate (312 kg)	**60 U**		
60P2	Polysulphate (312 kg)		**60 U**	
30P1+30P2	Polysulphate fractionné (156 kg x 2)	**30 U**	**30 U**	

I.1.c. Mode de récolte des échantillons

Les plantes ont été récoltées à huit dates différentes tout au long de la culture (T0 : GS30, 08/03/2016 ; T1 : GS32, 30/03/2016 ; T2 : GS53, 07/04/2016 ; T3 : GS60-62, 14/04/2016 ; T4 : GS65-70, 27/04/2016 ; T5 : GS75, 19/05/2016 ; T6 : GS85, 14/06/2016 et T7 : GS99, 18/07/2016) jusqu'à la production de graines matures (temps T7). Pour chaque date de récolte, la surface foliaire des feuilles séparées en différents pools (feuilles sénescentes, feuilles matures et feuilles jeunes) a été mesurée à l'aide d'un planimètre LICOR 300 (LICOR). Les différentes parties des plantes (racines, pools de feuilles, tiges, inflorescences et siliques immatures, enveloppes des siliques et graines) ont été séparées puis pesées avant (matière fraîche) et après (matière sèche, MS) lyophilisation puis broyées en fine poudre pour les analyses élémentaires ou biochimiques. Après lyophilisation, les graines ont été stockées à – 20 °C pour les analyses protéomiques ultérieures.

I.2. Dispositifs au champ

I.2.a. Essai soufre à Prenois

Le dispositif expérimental mis en place au champ à Prenois avait pour objectifs (i) d'étudier les effets d'apports contrastés, fractionnés ou retardés en engrais S sur les composantes du rendement grainier et sur la qualité nutritionnelle des graines de colza et (ii) de vérifier si les résultats obtenus en conditions contrôlées étaient transposables en condition de plein champ, à savoir si un indice de la qualité nutritionnelle (protéique) des graines pouvait être relié à la stratégie de fertilisation S.

Le dispositif expérimental au champ a été réalisé sur 28 microparcelles de 25 m² chacune localisées à Prenois (47°22′ 35″N ; 4°53′54″E) en partenariat avec Dijon Céréales et Terres Inovia en 2015-2016 (**Figure III.A.2**). Le semis de colza d'hiver (cv. Attletick) a été réalisé le 21 août 2015 sur un sol argilo-calcaire superficiel à une profondeur de semis de 2,5/3 cm, une densité de semis de 3,6 kg.ha^{-1} en rangs séparés de 12,5 cm. Un apport de 100 kg.ha^{-1} de phosphate d'ammonium (engrais starter DAP 18N-46P) a été appliqué le 13 août 2015. Les apports de fertilisants azotés sous forme liquide (solution 39N, https://www.agriconomie.com) ont été appliqués à trois moment différents ; 50,7 unités de N.ha^{-1} le 6 février 2016, 78 unités de N.ha^{-1} le 11 mars 2016 et 42,9 unités de N.ha^{-1} le 24 mars 2016.

La fertilisation soufrée a été apportée sous 7 modalités différentes faisant varier la dose, le type de fertilisant utilisé ainsi que le stade et le fractionnement de l'apport en S (**Tableau III.A.4**) : S0 correspond à aucun apport de S, 30K2 correspond à un apport de 150 kg.ha^{-1} de kieserite (30 U de S) au stade C2, 30P1 correspond à un apport de 156 kg.ha^{-1} de polysulphate (30 U de S) au stade C1, 30P2 correspond à un apport de 156 kg.ha^{-1} de polysulphate (30 U de S) au stade C2, 60P1

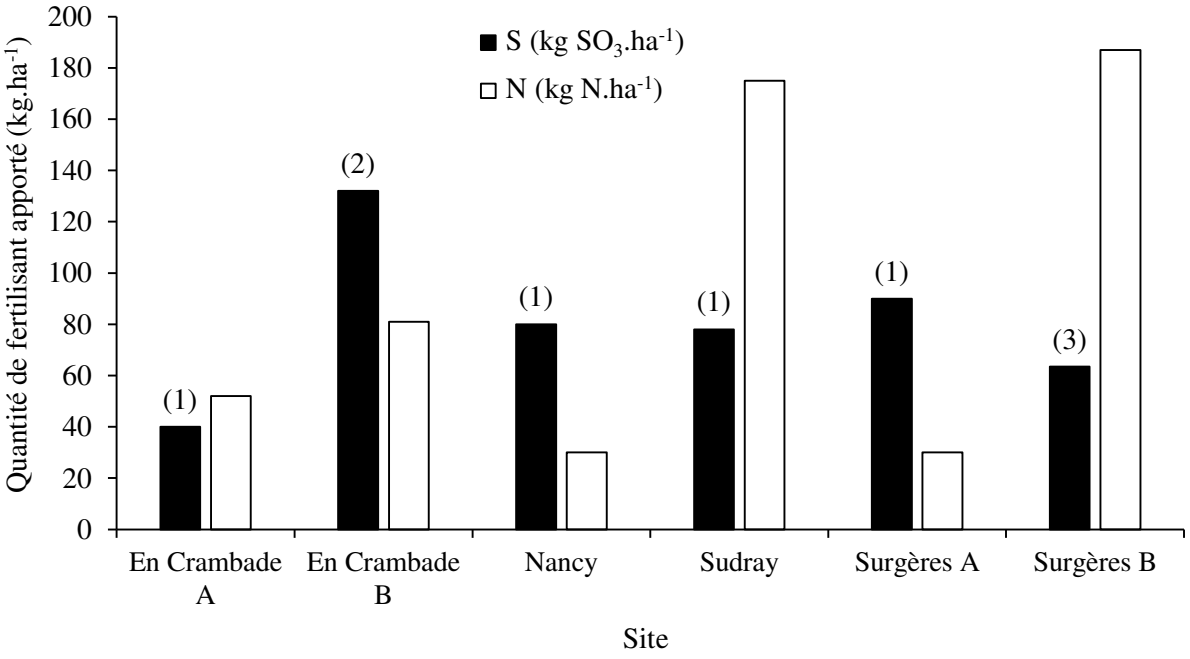
<u>Tableau III.A.5</u> : Listes des sites et des génotypes issus des essais de Terres Inovia de la campagne 2015 (**A**) et 2016 (**B**).

A

SITES	GÉNOTYPES
Subdray	APULCO
	ASTRONOM
En Crambade A	BARAQUE
	BLUESTAR
En Crambade B	CRISTIANO.KWS
	DK-EXPLORATION
	FERNANDO.KWS
Nancy	GAELIS
	HOURRA
Surgères A	INV.1010
	MANZZANA
	PT246
Surgères B	SEVERINO.KWS
	WHISKY

B

SITES	GÉNOTYPES
Subdray A	ALICANTE
Subdray B	BONANZA
En Crambade	DK-EXCEPTION
Nancy	DK-EXENTIEL
Etoile	DK-EXSTORM
Surgères B	ES-MAMBO
Dijon	FERNANDO.KWS
Mons	PT256



<u>Figure III.A.3</u> : Fertilisations S et N des essais Terres Inovia de 2015. Quantités de soufre (kg de $SO_3.ha^{-1}$) et d'azote (kg de $N.ha^{-1}$) apportées pour les 6 sites (En Crambade A, En Crambade B, Nancy, Subdray, Surgères A et Surgères B). Les sites En Crambade et Surgères ont reçus deux conduites de fertilisation différentes (A et B). Le chiffre entre parenthèse indique le nombre d'apports de fertilisants S.

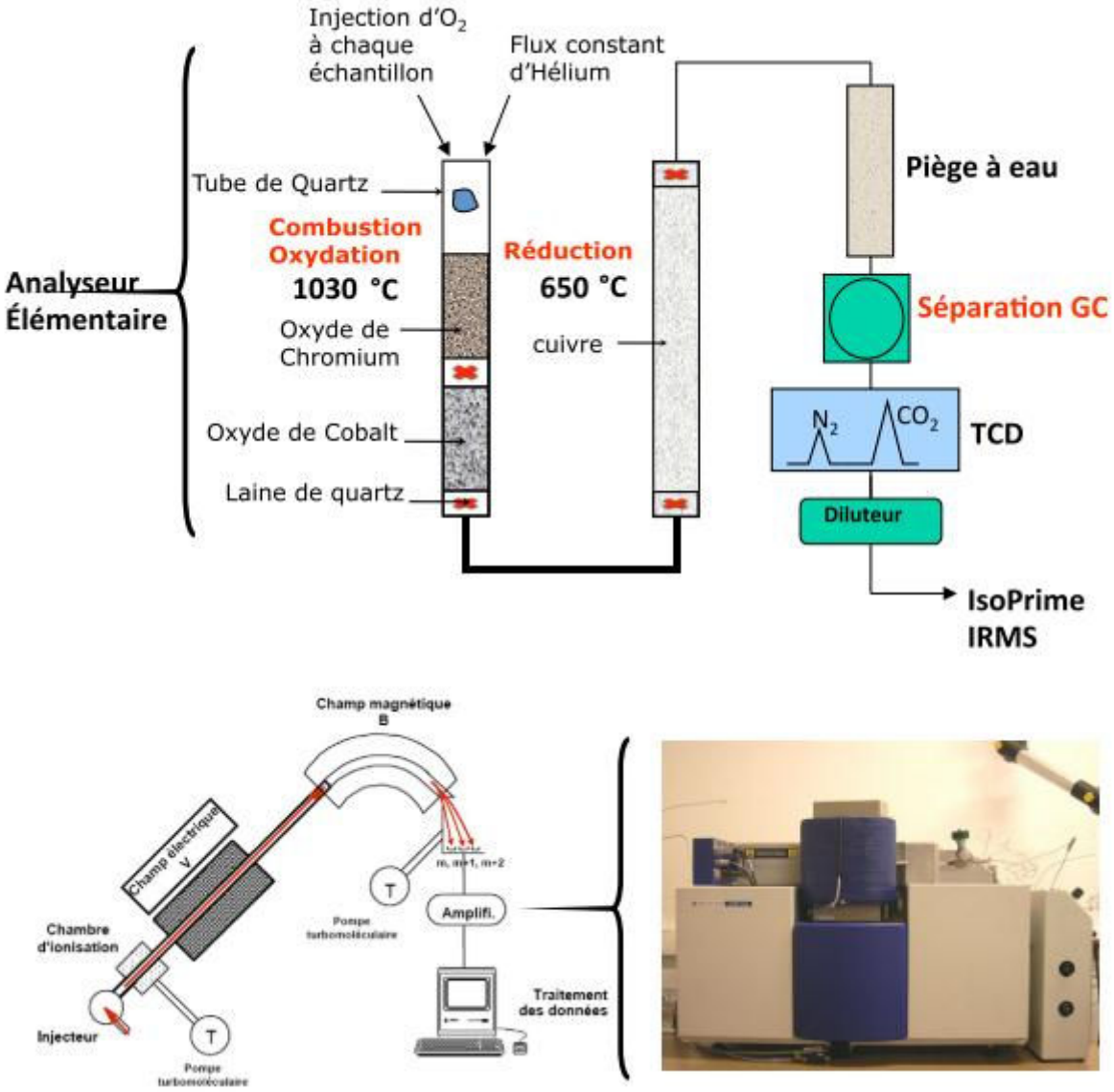
correspond à un apport de 312 kg.ha^{-1} de polysulphate (60 U de S) au stade C1, 60P2 correspond à un apport de 312 kg.ha^{-1} de polysulphate (60 U de S) au stade C2 et 30P1+30P2 correspond à un apport fractionné de 156 kg.ha^{-1} de polysulphate (30 U de S) au stade C1 et 156 kg.ha^{-1} de polysulphate (30 U de S) au stade C2. Le stade C1 correspond à la reprise de végétation (GS 30) et le stade C2 au début de la montaison (GS32). La date du premier apport de la fertilisation S était le 09 février 2016 et celle du deuxième apport le 2 mars 2016. Les graines matures produites ont été récoltées après moissonnage (20/07/2016), séchées puis utilisées pour de multiples analyses (analyses élémentaires par XRF, analyses protéomiques).

I.2.b. Essais au champ par Terres Inovia (2014-2015 et 2015-2016)

Des graines de colza récoltées en 2015 et en 2016 par Terres Inovia sur son réseau d'essais en France ont fait l'objet de différentes analyses dans le but de rechercher des effets site ou génotype sur la qualité de la graine de colza. Les lots de graines proviennent de différents génotypes cultivés sur différents sites (**Tableau III.A.5**), présentant des conduites culturales différentes, notamment en termes de fertilisation soufrée. Cependant, seules les informations relatives à la fertilisation soufrée des essais Terres Inovia 2015 (**Figure III.A.3**), ainsi que le rendement, la teneur en protéines et en huile des graines, préalablement mesurés par les laboratoires de Terres Inovia sont connues. Des analyses de la teneur en soufre des graines (%S) ont été réalisées au sein de l'UMR EVA par l'utilisation de la fluorescence à rayon X (XRF).

Concernant la campagne 2015, les graines disponibles provenaient de 14 variétés de colza cultivées sur 4 sites (Surgères, En Crambade, Subdray et Nancy ; **Tableau III.A.5-A**). Les sites de Surgères et d'En Crambade présentent deux modalités différentes de conduite en termes de fertilisation soufrée aboutissant ainsi à 6 modalités différentes (**Figure III.A.3** ; deux niveaux de fertilisation soufrée différents).

Les graines produites lors de la campagne 2016 proviennent de 8 variétés de colza cultivées sur 7 sites (Surgères, En Crambade, Subdray, Etoile, Mons, Dijon et Nancy ; **Tableau III.A.5-B**). Le site de Subdray présente deux conduites différentes en termes de fertilisation soufrée aboutissant à 8 modalités différentes. Les informations précises concernant les conduites de la fertilisation soufrée n'ont pas été communiquées. Les différentes informations fournies par ces deux campagnes ont permis d'étudier l'effet génotype et l'effet site, c'est-à-dire l'effet des pratiques culturales et des variabilités environnementales et pédologiques, sur la teneur en S des graines de colza et l'impact possible sur la qualité protéique des graines.



<u>Figure III.A.4</u> : 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). Cet analyseur (EA-IRMS) a été utilisé pour déterminer les teneurs totales en S et en N dans les différents tissus végétaux.

II. Analyses élémentaires et biochimiques

II.1. Détermination des teneurs en S et N totaux

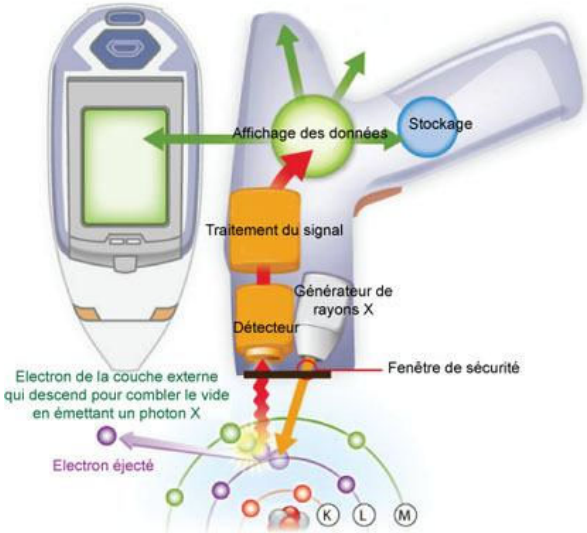
II.1.a. Détermination des teneurs en S et N par EA-IRMS

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.A.4**). Les échantillons secs finement broyés ont été pesés avec précision (± 1 µg) dans de fines nacelles en étain.

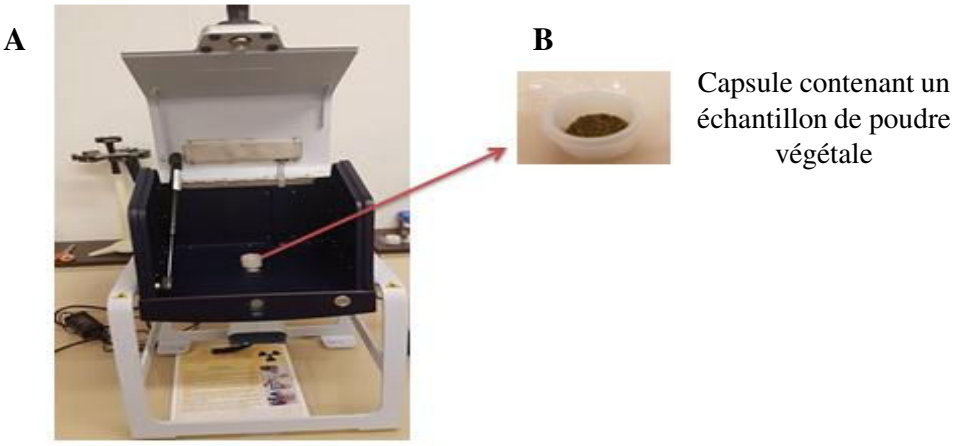
Les échantillons ont ensuite été disposés dans l'injecteur placé en tête de la colonne d'oxydation de l'analyseur élémentaire en présence d'un flux d'hélium en légère surpression, permettant d'éviter toute contamination par l'air. Pour la détermination de la quantité d'azote (N) de l'échantillon, la 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 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. 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.

<u>Figure III.A.5</u> : Analyseur de fluorescence à rayons X ou XRF (S1 TITAN, BRUKER).



<u>Figure III.A.6</u> : Schéma de fonctionnement de l'analyseur XRF S1 TITAN 600-800. L'analyseur XRF émet des rayons X pour exciter les électrons autour de l'atome en provoquant leur changement de couche. Le retour à l'état normal de l'atome engendre l'émission d'une fluorescence caractéristique de la composition et de la concentration atomique dans l'échantillon.



<u>Figure III.A.7</u> : Dispositif d'analyse d'échantillons de graines de colza par XRF. Une capsule contenant l'échantillon (**B**) est installée dans le stand de l'appareil sur la fenêtre de tir de l'analyseur qui est fixé en dessous du stand (A). Le stand et l'appareil XRF sont connectés et pilotés depuis un ordinateur.

II.1.b. Détermination de la teneur en S par fluorescence à rayon X

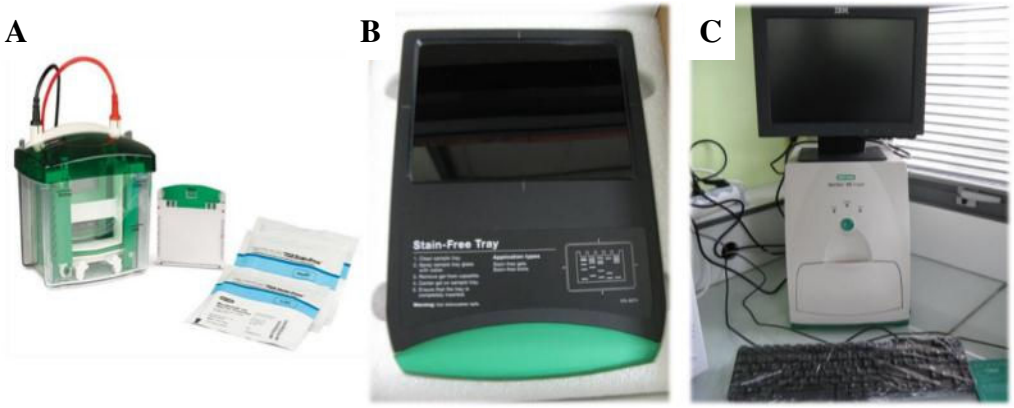
La quantification des teneurs en S de différents tissus et organes de colza a également été réalisée pour certaines parties des résultats (**Chapitre IV-partie A.2 et B.3**) *via* l'utilisation d'un système d'analyse élémentaire par fluorescence à rayons X (spectromètre XRF portatif S1 TITAN 800, BRUKER, **Figure III.A.5**). Cet appareil a été conçu en premier lieu pour des applications en géologie et utilisé comme outil de détection d'une très large gamme d'éléments chimiques dont la masse molaire atomique est supérieure ou égale au Magnésium (24,3 $g.mol^{-1}$) *via* la fluorescence émise par la matière testée suite à une excitation par des rayons X (**Figure III.A.6**). Le système d'analyse par XRF permet de déterminer la composition élémentaire de différents échantillons frais ou secs, solides, en gel, poudre ou liquide, sans vaporisation ou combustion préalable et de manière rapide (64 à 90 s). Cette méthode non destructive permet donc de réutiliser les échantillons végétaux analysés (**Figure III.A.7**).

Cet appareil peut quantifier l'élément S (seuil de détection à 200 ppm soit 0,02 %). La détermination de la composition élémentaire par le système XRF nécessite de définir préalablement des équations d'étalonnage de l'appareil pour chaque élément chimique et chaque type de matrice (liquide, poudre végétale, feuille intacte, etc).

Les réglages de l'appareil XRF ont permis d'optimiser les mesures élémentaires en choisissant une configuration de détection de type « GeoChem - Geochem Trace » avec une phase de détection des éléments lourds de 4 secondes et une phase de détection des éléments légers de 60 secondes, soit 64 secondes par mesure XRF. Les coefficients de calibration ont été définis *via* une équation de la droite d'étalonnage déterminée par corrélation entre les teneurs variables en S mesurées par XRF et celles obtenues sur les mêmes échantillons par EA-IRMS.

II.2. Extraction, dosage et électrophorégramme des protéines totales des graines

L'extraction des protéines totales de graines matures a été réalisée à partir de 40 mg de matière sèche broyée préalablement à l'azote liquide (n = 5 pour 0S_HN, 8S_MN, 30S_MN, 0+30S_HN et 8+22S_HN, n = 4 pour 8S_HN, 8S_LN, 30S_HN et 30S_LN), selon un protocole décrit par (Gallardo *et al*., 2002). 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.



<u>Figure III.A.8</u> : Présentation du dispositif d'électrophorèse, de la migration des protéines à leur détection. Dispositif d'électrophorèse et gels Stain free Mini-PROTEAN® TGX™ (**A**) à déposer sur la plaque de révélation (**B**) et à insérer au sein du scanner Gel Doc™ EZ (Bio-Rad) (**C**).

Un volume d'extrait protéique a été mélangé à un volume de tampon Laemmli 2X (Laemmli, 1970) et a été chauffé pendant 10 min au bain marie à 100 °C. Pour chaque extrait, 10 µg de protéines ont été chargés sur gel. L'électrophorèse SDS-PAGE a été réalisée sur des gels pré-coulés « stain free » (gel de polyacrylamide à 4-15 %, Bio-Rad, www.bio-rad.com/en-us/product/mini-protean-tgx-stain-free-precast-gels) en présence de tampon de migration Tris / SDS / Glycine 2X (25 mM / 0,1 % / 192 mM : 8,8 ; Laemmli, 1970) (**Figure III.A.8-A**). Ces gels « stain free » contiennent des composés trihalogènés qui réagissent avec les résidus tryptophane de protéines pouvant être alors détectées par émission de fluorescence après excitation UV. Après l'électrophorèse (200 volts, 75 mA pendant 30 à 40 min), les gels ont été placés sur un plateau spécialement conçu pour la détection des bandes de protéines par fluorescence en utilisant le système Gel Doc TM EZ (www.bio-rad.com) (**Figure III.A.8-B**). Le niveau d'abondance relative des protéines de la graine a été déterminé par analyse d'image à l'aide d'Image Lab Software (Bio-Rad, www.bio-rad.com/en-us/product/image-lab-software) (**Figure III.A.8-C**).

II.3. Détermination des teneurs en huile et en glucosinolates par Near InfraRed Spectroscopy (NIRS)

Les échantillons ont été analysés sur la Plateforme 2P2M (Plateau de Profilage Métabolique et Métabolomique) de l'IGEPP de Rennes (INRA du Rheu), à l'aide d'un spectromètre proche infrarouge NIR-TF MPA (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA). Environ 5 g de graines matures sèches et intactes (n = 5) ont été placés dans une coupelle standard et scannés. Les résultats ont été prédits en utilisant une courbe de calibration externe établie pour la teneur en huile et en glucosinolates dans les graines de colza (équations IGEPP).

III. Exploitation des données et analyses statistiques

III.1. Calcul des indices de récoltes et des efficiences d'usages en S et en N

Différents indices reflétant l'efficience de remobilisation du S ou du N vers les graines et l'efficience d'usage du S ou du N ont été calculés. L'indice de récolte en S ou en N (en anglais SHI ou NHI pour « sulfur/nitrogen harvest index ») correspond à la quantité de S ou de N dans les graines exprimée en pourcentage du S ou du N total de la plante à la récolte finale. L'efficience d'usage en S ou en N (en anglais SUE ou NUE pour « sulfur/nitrogen use efficiency ») est calculée comme étant la biomasse de graines produites par gramme de S ou de N apporté par les fertilisants.

<u>Figure III.B.1</u> : Interface du portail CCAFS-Climat (http://www.ccafs-climate.org/), qui permet d'accéder à des ensembles de données climatiques à haute résolution, à l'échelle mondiale et régionale (http://www.ccafs-climate.org/data_bias_correction/). Les cadres en rouge représentent les paramètres à sélectionner (localité, scénarios, modèle climatique, valeurs observées, période, variables, méthode de correction etc).

III.2. Exploitation statistique des données

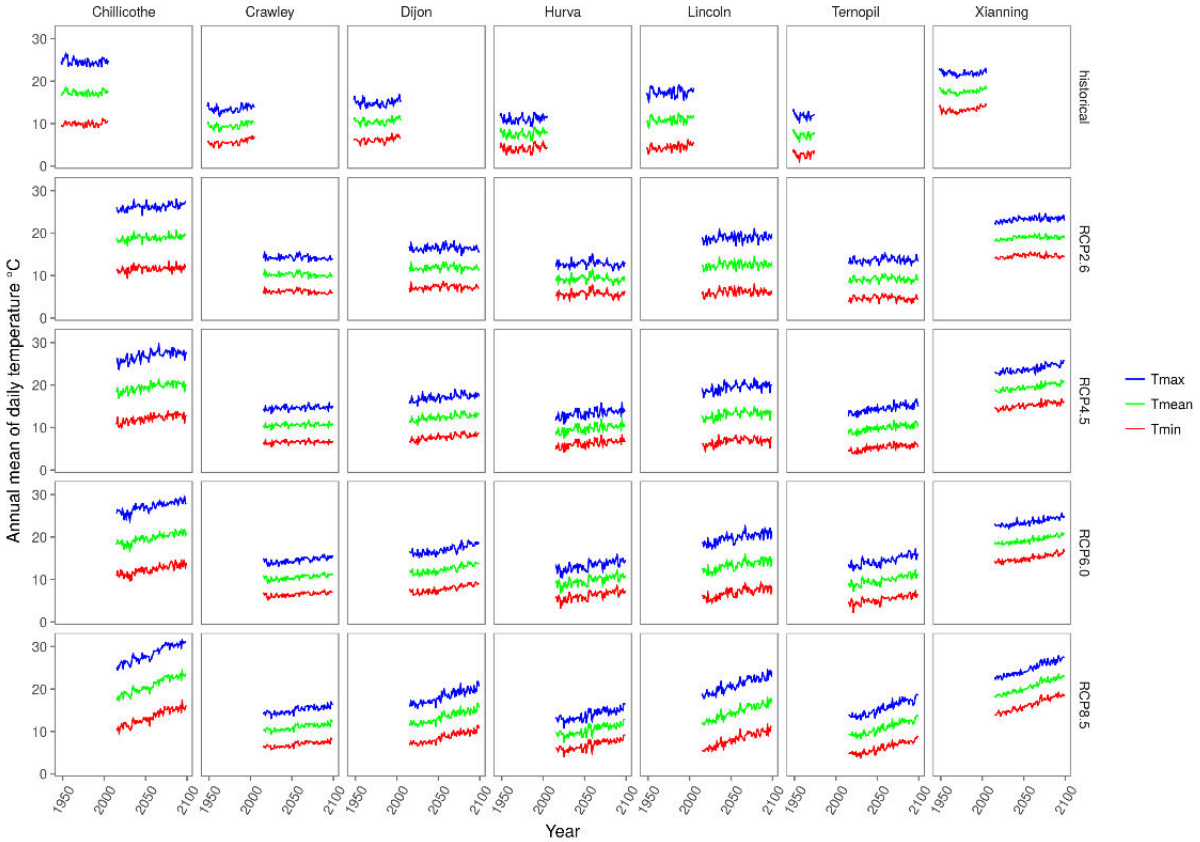
Les résultats du **Chapitre IV.A.1** sont exprimés par la moyenne des valeurs obtenues pour l'ensemble des répétitions biologiques (n = 4 au minimum) ± les erreurs standards (SE). Les analyses statistiques ont été réalisées sur différents logiciels [Microsoft Excel 2018/XLSTAT©-Premium (Version 15.0, Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA) ; R © avec le package complémentaire Rcmdr (Fox, 2005) (version 3.4.3, The R Foundation for statistical Computing). Les effets des différents traitements ont été comparés par une ANOVA (analyse de la variance) suivie par un test de Newman-Keuls (comparaisons multiples) afin de classer les moyennes des différents groupes correspondant aux traitements ($p < 0,05$). Des ANOVA doubles ont été réalisées afin de déterminer les effets S, N ou les effets d'interaction SxN sur différentes variables ($p < 0,05$).

Les résultats du **Chapitre IV.A.2** sont exprimés par la moyenne des valeurs obtenues pour l'ensemble des répétitions ± les écart-types (ET). La normalité de la distribution des données a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk (à 95 %). Lorsque la distribution des données suivait une loi normale, les effets des différents traitements ont été comparés par une ANOVA suivie par un test de Newman-Keuls afin de classer les moyennes des différents groupes correspondant aux traitements ($p < 0,05$). Lorsque la distribution des données ne suivait pas une loi normale, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé suivi d'un test de comparaison multiple de Conover-Iman ($p < 0,05$). Dans le cas où seulement deux conditions ont été testées, le test t de Student pour deux échantillons indépendants a été utilisé ($p < 0,05$).

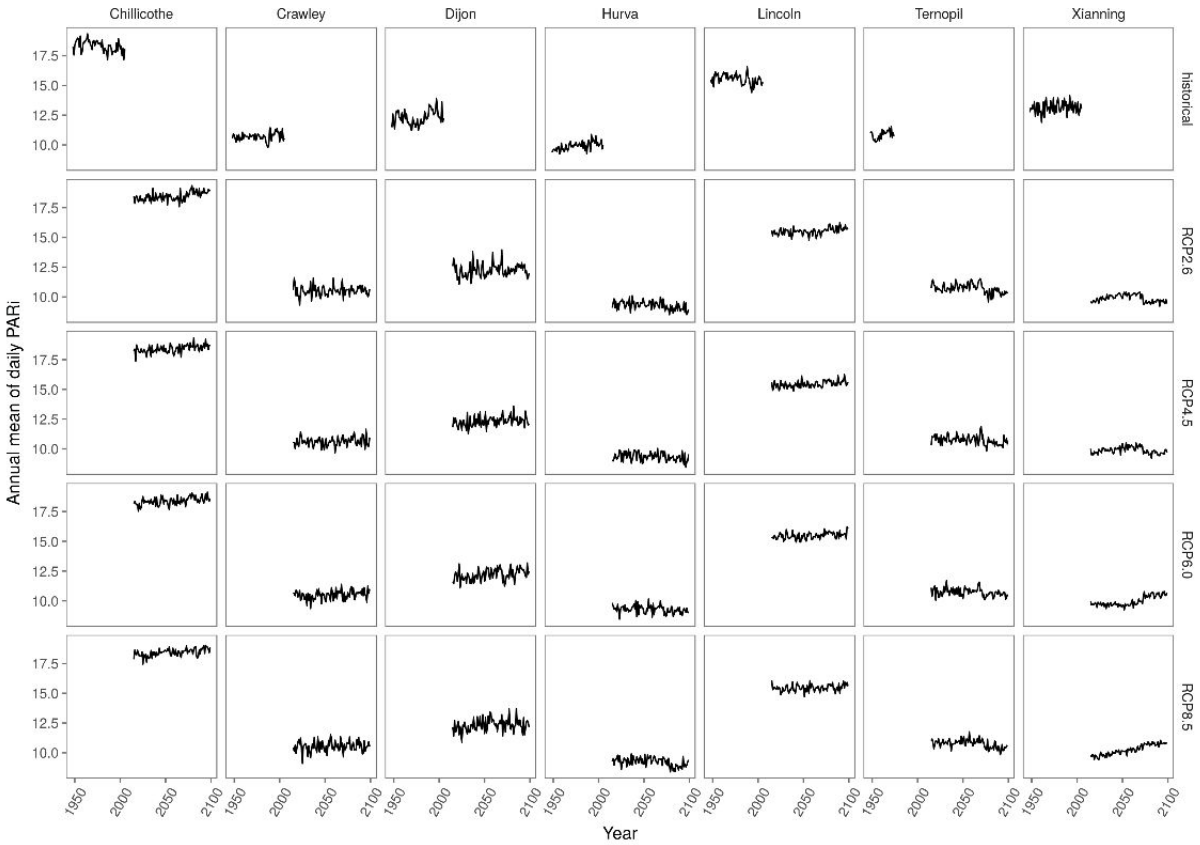
B. Expérimentations numériques *in silico*

I. Choix des scénarios climatiques et acquisition des variables environnementales pour les simulations avec le modèle SuMoToRI

Différentes expérimentations numériques ont nécessité (i) d'acquérir des variables climatiques (températures et rayonnement) pour les différents scénarios de changement climatique (**Chapitre IV.B.1**) et (ii) de calibrer différentes fonctions de prélèvement en soufre (**Chapitre IV.B.2 et IV.B.3**).



<u>Figure III.B.2</u> : Température annuelle moyenne (Tmean), minimale (Tmin) et maximale (Tmax) journalières pour chaque localité (Chillicothe, Lincoln, Crawley, Dijon, Hurva, Ternopil et Xianning), **de 1948 à 2005 (historical) et de 2015 à 2099 selon la prédiction des scénarios d'émission de GES** : RCP2.6, RCP4.5, RCP6.0 et RCP8.5.



<u>Figure III.B.3</u> : Rayonnement photosynthétiquement actif incident annuel moyen (PARi) pour chaque localité (Chillicothe, Lincoln, Crawley, Dijon, Hurva, Ternopil et Xianning) **de 1948 à 2005 (historical) et de 2015 à 2099 selon la prédiction des quatre scénarios d'émission de GES** : RCP2.6, RCP4.5, RCP6.0 et RCP8.5.

I.1. Utilisation de bases de données climatiques pour l'acquisition de la température et du rayonnement journaliers

Afin de réaliser des simulations sous une large gamme de conditions climatiques tout en prenant en compte les projections climatiques des différents scénarios RCP, l'accès à une base de données climatique était primordial. Les différentes conditions requises étaient (i) l'accès à la température et au rayonnement à pas de temps journalier, (ii) un large choix de localités dans l'hémisphère Nord où les variétés de colza d'hiver sont préférentiellement cultivées et (iii) l'accès aux projections de l'évolution climatique pour les 4 différents scénarios RCP. Toutes ces conditions ont pu être réunies en utilisant les données du portail CCAFS-Climat (http://www.ccafs-climate.org/), qui permet d'accéder à des ensembles de données climatiques à haute résolution, à l'échelle mondiale et régionale (http://www.ccafs-climate.org/data_bias_correction/) (**Figure III.B.1**).

Dans le cadre de notre étude, ce sont sept localités de l'hémisphère Nord qui ont été choisies parmi des pays producteurs de colza d'hiver. Ces localités sont les suivantes : Chillicothe et Lincoln (34°15'N, 99°21'W et 40°49'N, 96° 41'W respectivement, USA), Crawley (51°6'N, 0°11'W, Royaume-Uni), Dijon (48°51'N, 2°17'E, France), Hurva (55°79', 5°04'E, Suède), Ternopil (49°33'N, 25°35'E, Ukraine) et Xianning (29°50'N, 114°19'E, Chine). Pour chaque localité, nous avons acquis les températures moyennes journalières annuelles, les températures minimales et maximales journalières moyennes annuelles (**Figure III.B.2**) et les rayonnements incidents photosynthétiquement actifs journaliers (**Figure III.B.3**) observés au cours d'une période passée (1948 à 2005) et projetés par les différents scénarios climatiques (2015 à 2099).

I.2. Détermination des fonctions de prélèvements en soufre

Il a été nécessaire pour les **Chapitres IV.B.2** et **IV.B.3** de déterminer des fonctions de prélèvements en soufre. Au total, pour ces deux parties, nous avons déterminé 20 fonctions de prélèvements en S, chacune se différenciant en termes de quantité et de date d'apport en S (fractionnement ou retard par rapport aux recommandations d'usage).

Dans le modèle SuMoToRI, le prélèvement en S n'est pas intégré en tant que processus mécaniste. Les fonctions de prélèvements utilisées représentent le S prélevé dans la plante et sont obtenues à partir des données expérimentales observées. Initialement, le modèle a été calibré et évalué avec la variété Yudal, pour deux conditions d'approvisionnement en S contrastées (condition non limitante HS pour High S, condition limitante LS pour Low S), correspondant respectivement à 300 et 20 U de trioxyde de soufre (SO_3) fournies régulièrement tout au long du cycle de culture (jusqu'à maturation des graines) selon le système de dosage des nutriments à taux d'addition relatif

<u>Tableau III.B.1</u> : Paramétrage des 15 fonctions de prélèvements en S (fonction de Hill).

Apport total en S (Unités: kg.ha^{-1})	**Définition**	**QS_{max1}**	**n_1**	**K_{a1}**	**QS_{max2}**	**n_2**	**K_{a2}**
Apport à la sortie d'hiver							
20	Correspond à un apport de S à la fin de la période végétative (GS30: reprise de la croissance).	14,5	9,1	654	/	/	/
37,5		26,6	9,0	656	/	/	/
50		35,2	8,9	658	/	/	/
75		52,4	8,6	661	/	/	/
300		207,5	6,7	686	/	/	/
Apport avec un retard de 20 jours							
20	Correspond à un apport en S 20 jours après la sortie d'hiver (GS60),	14,5	24,6	854	/	/	/
37,5		26,6	24,4	856	/	/	/
50		35,2	24,2	858	/	/	/
75		52,4	24,0	861	/	/	/
300		207,5	20,8	886	/	/	/
Apports fractionnés en S							
20	Correspond à un apport fractionné en S à la sortie de l'hiver et 20 jours après (GS30+GS60),	7,3	18,3	327	7,3	18,3	654
37,5		13,3	18,0	328	13,3	18,0	656
50		17,6	17,7	329	17,6	17,7	658
75		26,2	17,3	330	26,2	17,3	660
300		103,7	13,3	342	103,7	13,3	685

(« relative addition rate nutrient-dosing system ») afin d'accorder en temps réel l'offre à la demande (Ingestad et Lund, 1986 ; Oscarson *et al.*, 1989). L'évolution du prélèvement suit une courbe de type exponentielle, représentant le cumul journalier du S prélevé jusqu'au début de formation des siliques, sans considérer les quantités perdues par les feuilles chutées. Afin d'optimiser l'ajustement, les fonctions de prélèvements ont été ajustées au modèle de Hill dont l'équation (**Éq. 1**) est la suivante :

$$QS = \frac{QS_{max} \times TT^n}{K_a + TT^n} + QS_{\text{ini}} \qquad (\textbf{Éq. 1})$$

Avec QS_{max} (mg S.plante^{-1}), K_a (°Cj) et n, les paramètres de la plante décrivant la dynamique de prélèvement de S, QS_{ini} (mg S.plante^{-1}), la quantité initiale de S prélevée par la plante à la sortie de l'hiver et TT, le temps thermique (en °Cj, Tb = 4 °C).

Dans le Chapitre IV.B.2, trois niveaux supplémentaires de fertilisations S ont été déterminés à partir des deux conditions initiales du modèle (HS et LS) : (i) 75 U de SO_3 correspondant aux apports recommandés par Terres Inovia (www.terresinovia.fr), (ii) 50 U de SO_3 et (iii) 37,5 U de SO_3. Associées aux niveaux de fertilisants S, 3 dates d'apports différentes ont été testées : (i) un apport à la sortie de l'hiver (reprise de la croissance, début des simulations avec le modèle) correspondant au stade GS30 (Lancashire *et al.*, 1991), (ii) un apport retardé de 20 jours après la sortie d'hiver (correspondant à 200 °Cj après la sortie d'hiver) correspondant au stade GS60 et (iii) un apport fractionné apporté en deux fois aux stades GS30 et GS60. Afin de simuler le fractionnement, nous avons utilisé un modèle double de Hill (**Éq. 2**) dont l'équation est présentée ci-dessous :

$$QS = \frac{QS_{max1} TT^{n1}}{K_{a1} + TT^{n1}} + \frac{QS_{max2} TT^{n2}}{K_{a2} + TT^{n2}} + QS_{ini} \qquad (\textbf{Éq. 2})$$

Les paramètres du modèle de Hill ont été déterminés pour les 15 conditions d'approvisionnement en S, c'est-à-dire 5 niveaux de fertilisation soufrée x 3 modalités d'apport (en un seul apport à GS30, et à GS60 et en deux fois à GS30 et GS60 pour le fractionnement) (voir **Chapitre IV.B.2** ; **Tableau III.B.1**). Afin de simuler un apport tardif en S, il a été ajouté 200 °Cj au paramètre K_a (point d'inflexion) et le paramètre n a été ajusté afin d'atteindre la quantité de S demandée pour le cycle de culture, soit 300 U, 75 U, 50 U, 37,5 U ou 20 U de SO_3. Les ajustements ont été réalisés avec le logiciel R.

Dans le chapitre IV.B.3, les cinq conditions de prélèvement en soufre non limitantes en N de la culture en serre (0S_HN, 8S_HN, 30S_HN, 0+30S_HN et 8+22S_HN) ont été utilisées pour des simulations avec le modèle SuMoToRI. Les expérimentations numériques ont permis de comparer les valeurs simulées de variables de sorties illustrant les performances des plantes au début de

formation des siliques (GS70, correspondant à la fin de la période de simulation du modèle), telles que les biomasses, l'indice de surface foliaire et les quantités de S dans les feuilles, avec les valeurs observées. Pour réaliser ces simulations, nous avons utilisé des ajustements des valeurs cinétiques des quantités de S total dans la plante mesurées pour définir les cinq fonctions de prélèvement (fonction de Hill) correspondant au 5 traitements. Les ajustements (fonctions de Hill) ont été réalisés sous Excel (Microsoft Excel ©) en utilisant le complément Solver.

II. Méthodes d'analyses de sensibilité utilisées avec les données de simulations

Les analyses de sensibilité (SAs) sont généralement réalisées pour évaluer la sensibilité des résultats d'un modèle par rapport aux variables et/ou paramètres d'entrée (due à leur incertitude d'estimation ou à une variabilité inhérente à leur nature). Dans le cadre de l'utilisation de modèle de culture, les SAs ont plusieurs objectifs, (i) elles constituent une étape préalable et indispensable pour explorer le fonctionnement du modèle, (ii) elles permettent d'améliorer la calibration du modèle en aidant à définir son niveau de complexité en ajoutant ou en supprimant des processus (paramètres et équations) en fonction de leurs impacts sur les variations des sorties (Iooss et Lemaître, 2015), (iii) elles fournissent une estimation quantitative de l'ampleur des impacts des variables d'entrée sur la performance des cultures, et (iv) elles permettent d'identifier les paramètres de la plante les plus influents (représentant les caractéristiques de la plante) et contribuent ainsi à la définition d'idéotypes (ou génotypes virtuels). Deux catégories de SAs sont généralement effectuées. Premièrement, l'approche locale (LA, « Local Approach ») qui vise à étudier la variabilité des sorties induite par la faible variation d'un seul paramètre et/ou variable d'entrée tout en maintenant les autres paramètres fixes (Saltelli *et al*., 2000). Deuxièmement, l'analyse de sensibilité globale (GSA, « Global Sensitivity Analysis ») qui considère au contraire l'ensemble des domaines de variation des entrées, ce qui permet d'analyser les résultats en fonction de la variabilité combinée. Elles sont couramment utilisées avec des modèles complexes où la méthode conventionnelle (LA) ne permettrait pas de représenter les interactions entre les nombreux paramètres et variables d'entrée (Colbach *et al*., 2004).

II.1. Coefficient de corrélation de rang partiel (Partial Rank Correlation Coefficient)

Le coefficient de corrélation de rang partiel (PRCC) mesure la force des associations linéaires entre les sorties et chaque paramètre d'entrée, après suppression de l'effet linéaire des autres paramètres. Ces mesures basées sur le classement font partie de la méthode dite d'analyse de sensibilité globale basée sur l'échantillonnage. Le PRCC varie entre − 1 et + 1 et quantifie les liens

entre les facteurs d'entrée et les variables de sortie ainsi que le sens de la relation. Nous avons utilisé un « échantillonnage par hypercube latin » (LHS) pour générer l'échantillonnage de combinaisons entre paramètres (Mckay *et al.*, 1979), ce qui permet d'augmenter la précision des indices de sensibilité. Au total, 3 000 simulations (200 répétitions x 15 conditions) ont été effectuées pour chaque sortie, permettant ainsi de tester 200 combinaisons de paramètres dans les 15 conditions d'approvisionnement en S. Les indices PRCC ont été calculés en utilisant un programme codé sous R spécifiquement écrit pour les besoins de l'expérimentation.

II.2. Indices de Sobol

La méthode Sobol est une méthode basée sur la décomposition de la variance. Elle utilise un ratio de variances pour estimer l'importance des paramètres (Saltelli, 2002 ; Sobol, 1990). Les indices de sensibilité calculés sont les indices de Sobol représentant la proportion de variance expliquée par une entrée ou un groupe d'entrées. Deux indices de sensibilité principaux sont définis pour chaque paramètre. L'indice de premier ordre ou d'ordre principal de sensibilité mesure l'effet moyen d'un paramètre sur une sortie du modèle, sans tenir compte des effets d'interactions avec les autres paramètres. L'indice de second ordre exprime la sensibilité du modèle aux interactions entre les paramètres. La somme des deux indices fournit l'indice d'effet total. Avant leur estimation, nous avons utilisé la méthode d'échantillonnage de Monte Carlo, qui permet d'évaluer le modèle N fois [$N = n (d + 2)$, avec $n = 2000$ représentant la taille de l'échantillon initial de Monte Carlo (nombre de répétitions) et le nombre de paramètres ciblés, $d = 3$]. Cette méthode d'échantillonnage permet de créer N combinaisons entre les 3 paramètres ciblés. Par conséquent, les estimations de l'indice ont nécessité 10^4 évaluations du modèle (N) par condition de fertilisation S et pour chaque sortie. En totalité, 10^4 x 15 simulations ont été effectuées (15 conditions de fertilisation S). Les indices de Sobol ont été calculés en utilisant un programme codé sous R spécifiquement écrit pour les besoins de l'expérimentation.

CHAPITRE IV

Résultats

Partie A

Expérimentations *in planta* en conditions contrôlées et de plein champ

CHAPITRE IV – RÉSULTATS

A. Expérimentations *in planta* en conditions contrôlées et de plein champ

A.1 Étude de différentes stratégies de fertilisation S et N sur les performances agronomiques et la qualité protéique des graines de colza : identification d'indicateurs de la qualité protéique des graines

Contexte : Le colza (*Brassica napus* L.) est une plante de grande culture exigeante en soufre (S). Bien que l'impact de la disponibilité en S sur le rendement et la qualité nutritionnelle des graines de colza ait été démontré, son impact associé à la disponibilité en azote (N) et/ou à des modalités d'apports fractionnés ou retardés reste peu étudié. L'étude de ces interactions SxN et des nouvelles modalités d'apports pourrait aider à améliorer la gestion de la fertilisation S et/ou N de manière durable.

Objectifs : Nos objectifs étaient de déterminer les effets de différents schémas de fertilisation (i) en fonction de différents niveaux de fertilisation en S et N et (ii) en fonction du stade d'application de la fertilisation S (en retardant ou en fractionnant les apports en S) sur les composantes du rendement et la qualité nutritionnelle des graines de colza.

Démarche expérimentale : Une culture de colza d'hiver faisant intervenir 9 stratégies de fertilisation S et/ou N a été conduite en conditions contrôlées. À la fin de la culture, les productions de biomasses, les composantes de rendement (poids de mille grains, nombre de graines produites par plante), les indices de récoltes en S et en N et les efficiences d'utilisation du S et du N ont été mesurés en réponse aux traitements. L'analyse de la composition des graines (teneurs en huile et protéines) et de la qualité des protéines de réserves des graines ont été réalisées.

Résultats : Nos résultats ont mis en évidence des effets synergiques sur l'efficience d'utilisation du S et du N pour des apports en S et en N supposés optimaux et des effets antagonistes pour des apports excessifs en l'un des deux éléments. Les données ont indiqué que l'équilibrage des apports en S et N pouvait permettre d'atteindre un bon rendement grainier et une haute qualité protéique des graines, en particulier dans un contexte de réduction des apports en azote. Retarder l'apport en S a amélioré la qualité des protéines de la graine en augmentant considérablement l'abondance relative en napines, suggérant que des apports d'engrais en S fractionnés ou retardés pourraient être de nouvelles stratégies de gestion des apports en S et N pour maintenir ou améliorer le rendement et la qualité des graines. En outre, nous avons démontré que la teneur en S dans les graines à maturité pouvait être un indicateur de la qualité protéique des graines (seuil de 0,32 % de S) et que la forte corrélation entre la teneur en S et le ratio napines:cruciférines 30 kDa pourrait permettre d'utiliser la teneur en S comme indicateur de la qualité protéique des graines rendant compte de l'ajustement de la fertilisation S et N.

A.1 Seed yield components and seed quality of oilseed rape are impacted by sulfur fertilization and its interactions with nitrogen fertilization

Poisson E.[1], Trouverie J. [1], Brunel-Muguet S.[1] Avice J.-C. [1]

1. EVA, Normandie Univ, UNICAEN, INRA, 14000, Caen, France

Abstract

Although the impact of sulfur (S) availability on the seed yield and nutritional quality of seeds has been demonstrated, its impact coupled with nitrogen (N) availability remains poorly studied in oilseed rape. A deeper knowledge of S and N interactions on seed yield components and seed quality could improve S and N fertilization management in a sustainable manner. To address this question, our goals were to determine the effects of 9 different S fertilization management strategies (i) in interaction with different levels of N fertilization and (ii) according to the timing of application (by delaying and fractionating the S inputs) on agronomic performances and seed nutritional quality in oilseed rape. Our results highlighted synergetic effects on S and N use efficiencies at optimum rates of S and N inputs and antagonistic effects at excessive rates of one of the two elements. The data indicated that adjustment of S and N fertilization may lead to high seed yield and seed protein quality in a sustainable manner, especially in the context of reductions in N inputs. Because delaying S inputs improved the seed protein quality by significantly increasing the relative abundance of napin, our observations suggest that fractionated or delayed S fertilizer inputs could provide additional insights into the development of N and S management strategies to maintain or improve seed yield and quality. In addition, we demonstrated that the S% and the napins:30 kDa-cruciferins ratio, which could be used as a relevant index for the determination of seed quality, is highly dependent on S/N fertilization in relation to S supply.

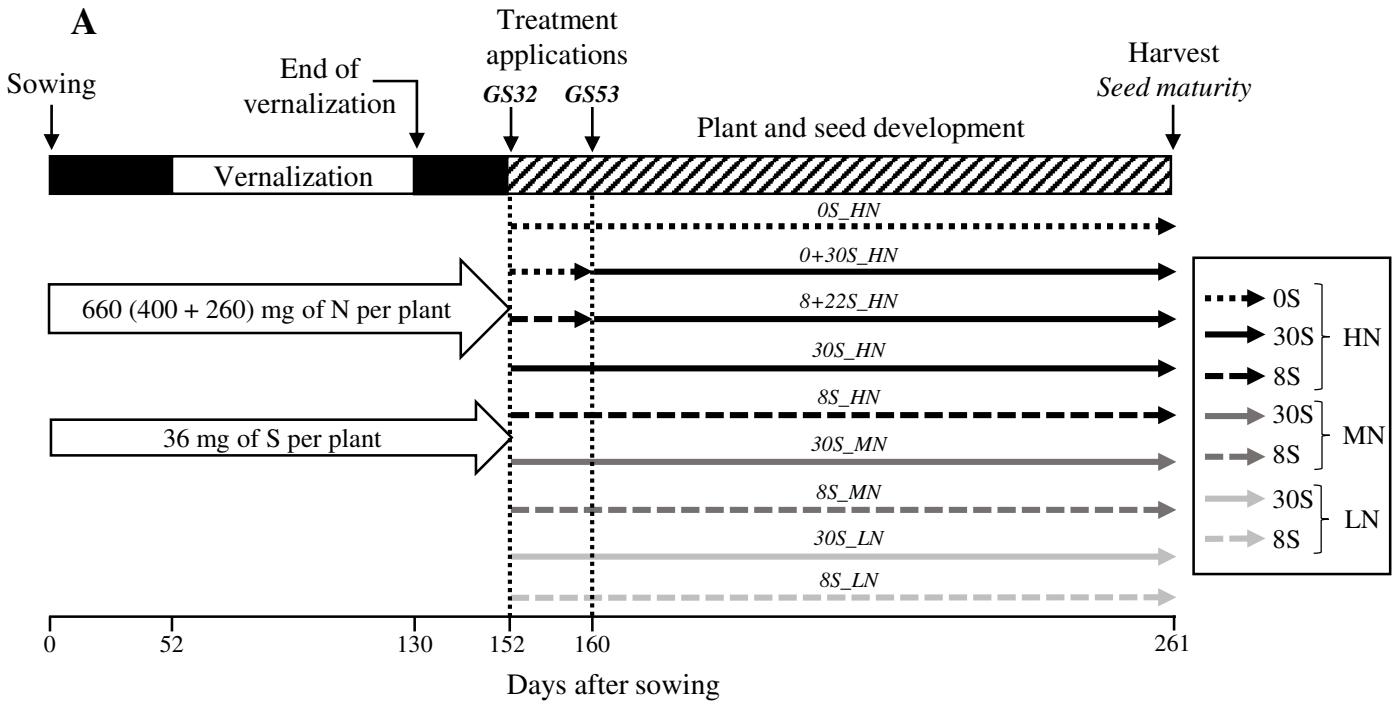
I. Introduction

Sulfur (S) is an essential element for growth and metabolic functioning in plants (Leustek and Saito, 1999). Like nitrogen (N), S is an important constituent of proteins due to S-containing essential amino acids like methionine as well as non-essential amino acids like cysteine in particular, which allows the formation of disulfide bonds for protein structure and function (Brosnan and Brosnan, 2006). S fertilization in crops has been of concern since the 1980s as a result of environmental policies that aimed to reduce atmospheric sulfur dioxide (SO_2) from industrial

emissions (McGrath *et al*., 2002; Schnug *et al*., 1993). As a consequence, S deposition into the soil was strongly reduced (McNeill *et al*., 2005) leading to increasing symptoms of S deficiency in crops, mainly in Western Europe. In oilseed rape (*Brassica napus* L.), which is a high S-demanding crop compared to other species like wheat (Oenema and Postma, 2003), S limitation can severely impact seed yield (between 40 and 50 % of loss) and quality (Terres Inovia, http://www.terresinovia.fr). In order to prevent S deficiency, the recommendations from the technical center for oilseed production in France (Terres Inovia) are to provide about 30 kg of $S.ha^{-1}$ once at the bolting stage (GS32, Lancashire *et al*., 1991). However, S-inputs can range from 15 to 60 kg $S.ha^{-1}$ depending on the environment (soil type, previous crops, etc.) (Grant *et al*., 2012). Thus, it is difficult to recommend adequate S inputs because of the lack of indicators of soil and/or plant S status that can be used easily in the field.

Seeds of oilseed rape are an important source of oil and proteins for diverse nutritional and non-edible uses. Proteins are essential in meal used for feeding livestock and they could be potentially used in human food products as an alternative to soybean proteins with the increasing global demands for vegetable proteins for human nutrition (vegetarian or vegan diets) (Von Der Haar *et al*., 2014). Previous studies have demonstrated the tight relationship between plant S status or availability and the quality of oil and protein in oilseed rape (D'Hooghe *et al*., 2014; Dubousset *et al*., 2010; Zhao *et al*., 1997). Protein quality might be determined by the level of S-containing amino acids, which impacts the levels of S-rich or S-poor seed storage proteins (SSPs). Cruciferins (11-12S globulins) are the major form of SSP present in Brassica species and account for about 50 % of the total seed protein content (Bérot *et al*., 2005). Napins (2S albumin) represent 10 to 20 % of the SSPs and are very rich in S-containing amino acids (10 % of the total protein amino acids) (Monsalve *et al*., 1991). Thus, S limitation leads to decreased seed protein content and/or favors the accumulation of S-poor SSPs (CruBnC1) to the detriment of S-rich SSPs such as napin and CRU4 (D'Hooghe *et al*., 2014; Higashi *et al*., 2006).

A large number of studies have focused on the impact of N on seed yield and its components (Allen and Morgan, 1972) with the perspective of reducing N fertilizer inputs because of deleterious environmental impacts that drastically increased following the boom of the Green Revolution in the 1970s (Davies, 2003). Several works support evidence for strong interactions between S and N metabolism (Coleto *et al*., 2017; Hesse *et al*., 2004; Karmoker *et al*., 1991; Koprivova *et al*., 2000) particularly for the synthesis of S-containing amino acids. S limitation can decrease N use efficiency (Fismes *et al*., 2000; Schnug *et al*., 1993) and N deficiency can also reduce S use efficiency (Fismes *et al*., 2000; Salvagiotti *et al*., 2009). Furthermore, the impacts of S limitation vary according to N



B

Treatments	N level at GS32 (Units of N)	N level at GS53 (Units of N)	S level at GS32 (Units of S)	S level at GS53 (Units of S)
HN_0S			0	0
HN_8+22S			8	22
HN_0+30S	57.2	40	0	30
HN_30S			30	0
HN_8S			8	0
MN_30S	42.7	30	30	0
MN_8S			8	0
LN_30S	28.4	0	30	0
LN_8S			8	0

<u>Figure IV.A.1.1</u> : Schematic diagram of experimental design (A) and table of the different S and N fertilization strategies (B). 7 combinations of S and N fertilization treatments with S levels of 0 kg S.ha^{-1} (0S), 8 kg S.ha^{-1} (8S) and 30 kg S.ha^{-1} (30S), and N levels from 28.4 kg N.ha^{-1} (Low N: LN), 72.7 kg N.ha^{-1} (Mid N: MN) and 97.2 kg N.ha^{-1} (High N: HN), which were applied manually to the plants. N supplies were provided at the bolting (GS32) and early flowering stages (GS53). S supplies (30S and 8S) were provided at the GS32 stage and were included with each N condition. The 0S condition was only included with the HN condition (negative control). To investigate the impact on seed nutritional quality of delaying or fractionating S inputs, S was provided at GS32 and/or at GS53 under non-limiting N conditions (HN). The fractionated condition (8+22_HN) corresponded to a dual input of 8U and 22U of S provided at GS32 and GS53, respectively. The delayed S input (0+30S_HN) corresponded to a single input of 30U of S provided at GS53.

supply (Janzen and Bettany, 1984) and when one of these elements is low or in excess it can lead to reduced seed yield, growth and quality of harvested products (Fismes *et al*., 2000; Malhi and Gill, 2007). The quality criteria targeted in most studies correspond to the seed yield or to the oil and seed protein contents, but less is known about S and N interactions on fatty acids profiles and specific SSPs, which are determining criteria for nutritional quality. Previous studies performed under controlled conditions have shown that an S deficiency applied at early flowering (GS53) or at the start of pod filling (GS70) did not affect seed yield and seed protein content but did affect the nutritional quality of the seeds (oil and protein quality) (D'Hooghe *et al*., 2014; Dubousset *et al*., 2010). Thus an increase in the ω6/ω3 ratio was observed as well as a decrease in the accumulation of S-rich SSPs (like cruciferin CRU4 or napin) compared to S-poor SSP (cruciferin BnC1), leading to a decrease in protein quality (D'Hooghe *et al*., 2014). Although the impact of S availability on the seed nutritional quality has been demonstrated, this impact coupled with N availability remains poorly studied. A deeper knowledge of the effect of S and N interactions on seed yield components and seed quality could improve S and N fertilization management either by adjusting the amount of fertilizer or the timing of inputs. In the case of N fertilization, applications may occur once or be split across 2 to 4 inputs during the growth cycle (Terres Inovia, http://www.terresinovia.fr). With the same idea, testing new technical routes/schedules to fractionate or delay S applications might also be worth exploring in order to better respond to plant needs throughout the crop cycle.

Therefore, the aims of this study were to determine the effects of different S fertilization management strategies (i) on interactions with different levels of N fertilization and (ii) according to the timing of application, which includes assessing the impact of delaying and fractionating conditions on growth performance and seed nutritional quality in oilseed rape. Outcomes of this analysis will target the definition of innovative S fertilization strategies in terms of application (timing and fractionating designs) that consider SxN interactions and also the determination of S related indicators of seed quality.

II. Materials and methods

II.1 Experimental treatments and tissue sampling

The experimental design is described in **Figure IV.A.1.1-A**. Briefly, sterilized seeds of *Brassica napus* L. (cv. Aviso) were germinated on vermiculite and were grown initially under greenhouse conditions with a thermoperiod of 20 °C (day-16 h) and 15 °C (night-8 h) for 26 days. Natural light was supplied by high-pressure sodium lamps (Philips, MASTER GreenPower T400W) with a PAR

(Photosynthetically Active Radiation) of 400 µmol photon.s^{-1}.m^{-2} at the top of the canopy. Plants were supplied with 25 % Hoagland nutrient solution (0.25 mM KH_2PO_4, 1.25 mM KCl, 0.2 mM EDTA,NaFe,3H_2O, 14 µM H_3BO_3, 5 µM $MnSO_4$,7H_2O, 3 µM $ZnSO_4$,7H_2O, 0.7 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 0.1 µM $CoCl_2$, 0.04 µM $NiCl_2$) renewed twice a week. Each plant also received a total of 36 mg of S and 400 mg of N, provided at 3 different times before vernalization (18, 28 and 40 days after sowing) by a solution of $MgSO_4$,7H_2O and $Ca(NO_3)_2$,4H_2O (**Figure IV.A.1.1-A**). Twenty-six days after sowing, plants were transferred into 2 L pots containing mixed vermiculite (1V) and perlite (2V). Plants were then submitted to a vernalization period for 78 days: 46 days under natural outdoor conditions (temperature between 2 °C and 14 °C and photoperiod from 8 h to 9 h) followed by 32 days under controlled conditions at 8 °C (day 10 h) and 4 °C (night 14 h). After vernalization, plants were submitted to a thermoperiod of 20 °C (day 16 h) and 15 °C (night 8 h) and transferred to a greenhouse. As the first N input after vernalization, each plant was supplied with 0.26 g of N with a solution of $Ca(NO_3)_2$,4H_2O, corresponding to an equivalent of 100 Units of N calculated for a plant density of 40 plant.m^{-2} (100 U: 100 kg N.ha^{-1}; **Figure IV.A.1.1-B**).

In order to mimic S and N inputs provided under field conditions, 7 combinations of S and N fertilization treatments with levels of S including 0 kg S.ha^{-1} (0S), 8 kg S.ha^{-1} (8S) and 30 kg S.ha^{-1} (30S), and levels of N including 28.4 kg N.ha^{-1} (Low N, LN), 72.7 kg N.ha^{-1} (Mid N, MN) and 97.2 kg N.ha^{-1} (High N, HN) were applied to the plants manually (**Figure IV.A.1.1-B**). N supplies were provided at the bolting stage (GS32; 57.2, 42.7 or 28.4 units of N, Lancashire *et al.*, 1991) and at the early flowering stage (GS53; 40, 30 or 0 units of N) for HN, MN and LN conditions, respectively. S supplies (30S or 8S) were provided at the GS32 stage (Lancashire *et al.*, 1991) and were associated with each N condition. The 0S condition was only associated with the HN condition (negative control). Plants were grown until the production of mature seeds (GS99, final harvest).

The second aim of this work was to investigate the impact of delaying or fractionating S inputs on seed nutritional quality. In non-limiting N conditions (HN), S was provided at one or two different stages of development: at GS32 and/or at GS53 (Lancashire *et al.*, 1991). The fractionated condition (8+22_HN) corresponded to an input of 8 and 22 units of S provided at GS32 and GS53, respectively. The delayed S input (0+30S_HN) corresponded to a single input of 30 units of S provided at GS53 and the 30+0S_HN treatment corresponded to a single input of 30 units of S provided at GS32 (control treatment corresponding to the 30S_HN condition, **Figure IV.A.1.1-B**). Plants were grown until production of mature seeds.

For each harvest date, the different parts of plants (roots, leaves, stem, inflorescences + immature pods, pod walls and seeds) were weighed before (fresh matter) and after (dry matter, DM) freeze-

<u>Table IV.A.1.1</u> : S, N and SxN effects on total DM, seed dry matter, thousand seed weight and harvest index (HI) (A) and total DM (g.plant^{-1}), seed dry matter (g.plant^{-1}), thousand seed weight (mg) and harvest index (HI, DM in seeds as % of total DM in plant) for plants grown under 0S_HN, 8S_LN, 8S_MN, 8S_HN, 30S_LN, 30S_MN and 30S_HN conditions (B). S, N and SxN effects were estimated by omitting 0S_HN condition. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$, ns: not significant (A). The values correspond to the mean ± SE (n = 5, n = 6 for 8S_LN). Different letters indicate that mean values are significantly different ($p < 0.05$) (B).

	Treatments	DM_{total}	Seed DM	Thousand seed weight	HI
A	**S effect**	*** $p = 0.0007$	** $p = 0.0096$	ns $p = 0.77$	ns $p = 0.44$
	N effect	** $p = 0.003$	ns $p = 0.158$	** $p = 0.004$	** $p = 0.003$
	SxN effect	** $p = 0.006$	** $p = 0.0031$	ns $p = 0.16$	ns $p = 0.28$

	Treatments	DM_{total} (g.plant^{-1})	Seed DM (g.plant^{-1})	Thousand seed weight (mg)	HI (DM in seeds as % of total plant DM)
B	**0S_HN**	28.8 ± 1.0 ^{a}	2.5 ± 1.0 ^{a}	2971 ± 693 ^{a}	9.2 ± 3.7 ^{a}
	8S_LN	29.7 ± 1.0 ^{a}	8.5 ± 0.3 ^{bc}	3350 ± 134 ^{a}	28.8 ± 0.4 ^{b}
	8S_MN	30.7 ± 0.8 ^{a}	8.8 ± 0.2 ^{bc}	3138 ± 124 ^{a}	28.8 ± 0.4 ^{b}
	8S_HN	30.2 ± 1.1 ^{a}	7.6 ± 0.5 ^{b}	3434 ± 47 ^{a}	25.3 ± 1.5 ^{b}
	30S_LN	28.7 ± 0.7 ^{a}	8.2 ± 0.2 ^{bc}	3211 ± 55 ^{a}	28.5 ± 0.5 ^{b}
	30S_MN	33.1 ± 1.3 ^{a}	9.5 ± 0.3 ^{bc}	3220 ± 348 ^{a}	28.6 ± 0.3 ^{b}
	30S_HN	37.0 ± 1.7 ^{b}	10.1 ± 0.6 ^{c}	3578 ± 168 ^{a}	27.2 ± 0.8 ^{b}

drying and then ground to fine powder for elemental analyses. After freeze-drying, the seeds were stored at -20 °C for protein analysis. The seed yield components (total seed weight per plant, thousand seed weight) and the harvest index (HI, fraction of the total DM allocated to the seed) were also determined.

II.2 S and N analyses and determination of SHI, NHI, SUE and NUE

Freeze-dried and ground organs were weighed and placed into tin capsules for analysis of both total S and N contents. Total S and N relative concentrations in the different tissues were determined with an elemental analyzer (EA3000, EuroVector, Milan, Italy) connected to a continuous flow isotope mass spectrometer (IRMS, Isoprime, GV Instruments, Manchester, UK). Different indices that indicate the plant N and S status were calculated using the S and N relative concentrations: the S and N harvest indices (SHI or NHI, i.e. S or N amounts in seeds expressed as a percentage of the total amount of S or N in the plant at harvest) and the S and N use efficiency (SUE or NUE, calculated as the seed DM produced per 1 gram of S or N provided by fertilizer).

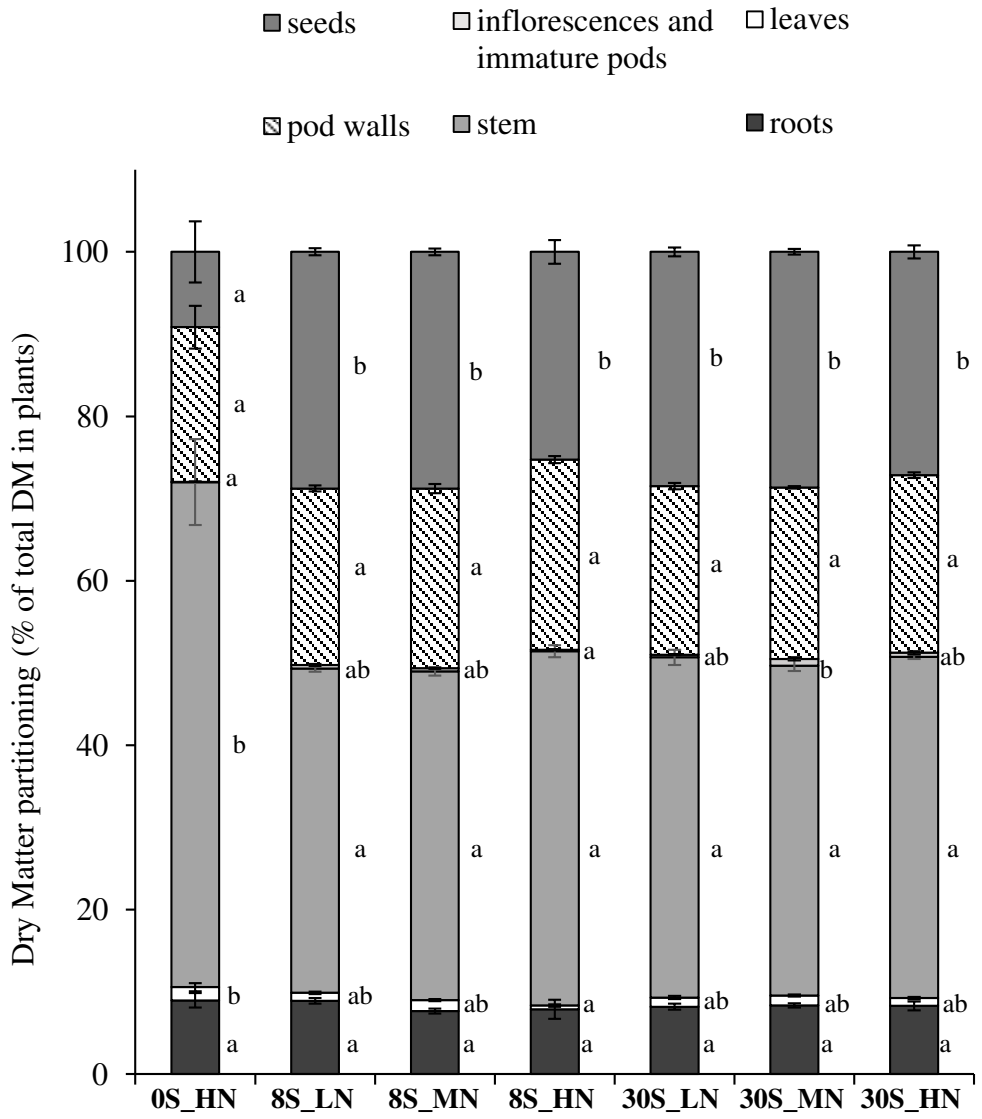
II.3 Determination of seed nutritional quality

II.3.a Oil content

Intact seeds (about 1 to 3 g) were placed in a standard ring cup and were scanned on a near infrared monochromator system (FT-NIR MPA, Bruker Corporation, Billerica, MA, USA). The results were determined from an external calibration established for oil content (CRAW, Gembloux, Belgium) and were given as a percentage of oil per seed dry matter (DM).

II.3.b Extraction and quantification of total proteins in seeds

Total seed proteins were extracted from 40 mg of seed powder previously ground with liquid nitrogen, as in Gallardo *et al.* (2002) (n = 5 for 0S_HN, 8S_MN, 30S_MN, 0+30S_HN and 8+22S_HN, n = 4 for 8S_HN, 8S_LN, 30S_HN and 30S_LN). After 1 hour incubation at room temperature in thiourea/urea buffer, the extracts were centrifuged twice at 20 000 g at 4 °C for 10 min. Protein concentration was then determined according to Bradford (1976). One volume of protein extract was mixed with one volume of Laemmli 2X buffer (Laemmli, 1970) and was heated for 10 min in boiling water. For each extract, 10 µg of proteins were loaded per lane. The SDS-PAGE electrophoresis was carried out on precast stain-free gels (4-15 % polyacrylamide gel, Bio-Rad, www.bio-rad.com/en-us/product/mini-protean-tgx-stain-free-precast-gels) in the presence of Tris / SDS / Glycine 2X migration buffer (25 mM / 0.1 % / 192 mM; 8.8, Laemmli, 1970). These stain-free gels contain trihalogen compounds that allow reactions with tryptophan residues of



<u>Figure IV.A.1.2</u> : Dry matter (DM) partitioning (as % of total DM in plants) for different plant parts (roots, leaves, stems, inflorescence and immature pods, pod walls and seeds) at harvest for plants grown under 0S_HN, 8S_LN, 8S_MN, 8S_HN, 30S_LN, 30S_MN and 30S_HN conditions. Vertical bars indicate ± SE of the mean (n = 5, n = 6 for 8S_LN). Different letters indicate that mean values are significantly different ($p < 0.05$) between treatments for the different plant parts.

proteins that can be detected by fluorescence emission after UV excitation. After electrophoresis (200 volts, 75 mA for 30-40 min), gels were placed on a Stain-Free tray for the detection of protein bands by fluorescence using the Gel DocTM EZ system (www.bio-rad.com/en-us/product/gel-doc-ez-gel-documentation-system). The level of seed protein abundance was determined by image analysis using Image Lab Software (Bio-Rad, www.bio-rad.com/en-us/product/image-lab-software).

II.4 Statistical analyses

The variability of the results is expressed as the mean ± standard error (SE) of *n* replicates (*n* = 4 or 5). Analysis of variance (ANOVA) and the Newman-Keuls mean comparison test were performed with a statistical significance at $p < 0.05$ using Microsoft Excel 2018/XLSTAT©-Premium (Version 15.0, Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA). Two-Way ANOVAs were performed for S, N and SxN interaction effects on different variables. S, N and SxN effects were estimated without considering the 0S_HN condition, which was extreme (and not comparable to an N-deprived condition, which is not compatible with plant growth) and tended to exacerbate the S effect and to silence putative N or SxN effects.

III. Results

A. Impacts of different levels of S and N fertilization

III.1 Influence of S and N availability on DM distribution and seed yield

Significant S, N and SxN effects were detected in total DM (**Table IV.A.1.1-A**). Compared to the highest S and N fertilization (30S_HN), the whole plant DM was significantly lower for all the other treatments and was strongly reduced under 0S_HN and 30S_LN conditions (ca. -22.2 %), reaching about 28.7 g per plant (**Table IV.A.1.1-B**). The biomass partitioning in 0S_HN strongly differed from the other treatments, especially for stem and seed DM (**Figure IV.A.1.2**). For instance, stem and seed DM represented respectively 61 % (17.9 g.plant^{-1}) and 9 % (2.5 g.plant^{-1}) of the total DM under 0S_HN conditions versus 41 % (15.3 g.plant^{-1}) and 27 % (10 g.plant^{-1}) of the total DM under 30S_HN conditions. The harvest index (HI) was the lowest under 0S_HN conditions (9.2 ±3.7 %). No significant differences in HI were observed between the other treatments (**Table IV.A.1.1-B**).

For seed yield, S and SxN effects were detected but no significant N effect was observed (**Table IV.A.1.1-A**). The highest seed yield was reached under 30S_HN conditions (10.1 g.plant^{-1}) while

<u>Table IV.A.1.2</u> : S, N and SxN effects on total N in plants, total S in plants, the N harvest index (NHI), the S harvest index (SHI), N utilization efficiency (NUE) and S utilization efficiency (SUE) (A) and total N in plants (mg.plant^{-1}), total S in plants (mg.plant^{-1}), the NHI (N in seeds as % of total N in plants), the SHI (S in seeds as % of total S in plants), NUE (g of mature seed DM per g of N input) and SUE (g of mature seed DM per g of S input) for plants grown under 0S_HN, 8S_LN, 8S_MN, 8S_HN, 30S_LN, 30S_MN and 30S_HN conditions (B). S, N and SxN effects were estimated by omitting 0S_HN condition. * : p < 0.05, ** : p < 0.01, *** : p < 0.001, ns : not significant (A). The values correspond to the mean ± SE (n = 5, n = 6 for 8S_LN). Different letters indicate that mean values are significantly different (p < 0.05) (B).

	Treatments	Total S in plants	Total N in plants	SHI	NHI	SUE	NUE
A	S effect	*** $p = 2.47\text{x}10^{-12}$	*** $p = 0.0002$	* $p = 0.012$	*** $p = 0.0006$	*** $p = 8.06\text{x}10^{-14}$	* $p = 0.015$
	N effect	** $p = 0.0012$	*** $p = 3.26\text{x}10^{-11}$	ns $p = 0.095$	*** $p = 8.5\text{x}10^{-7}$	ns $p = 0.206$	** $p = 0.0026$
	SxN effect	ns $p = 0.145$	*** $p = 0.0006$	*** $p = 0.00064$	* $p = 0.031$	** $p = 0.006$	** $p = 0.0039$

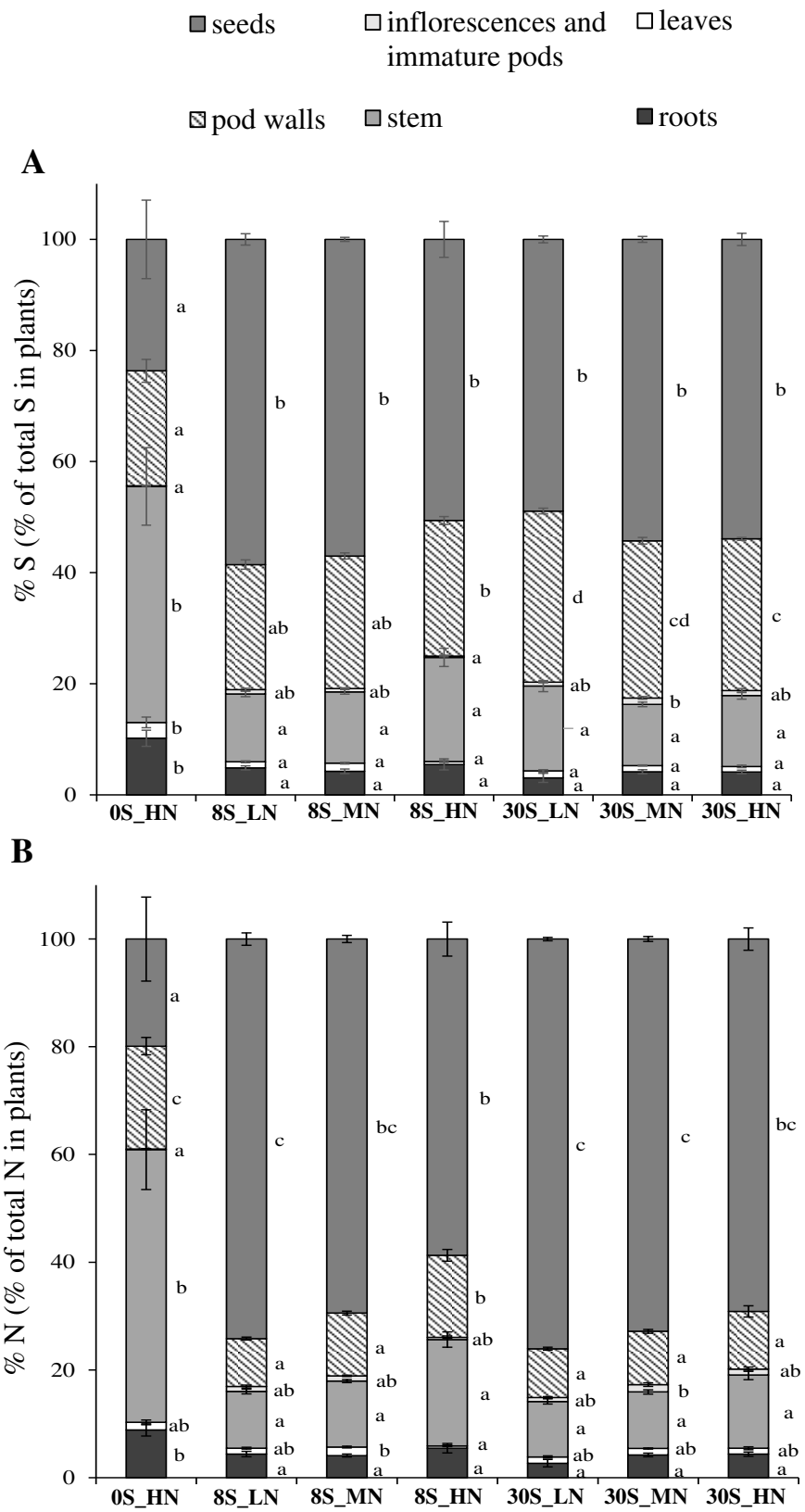
	Treatments	Total S in plants (mg.plant^{-1})	Total N in plants (mg.plant^{-1})	SHI (S in seeds as % of total S in plants)	NHI (N in seeds as % of total N in plants)	SUE (g of mature seed DM/g of S input)	NUE (g of mature seed DM/g of N input)
B	0S_HN	27.7 ± 3.3 ^{a}	543 ± 13.8 ^{bc}	23.7 ± 7.1 ^{a}	19.9 ± 7.8 ^{a}	70.7 ± 28.1 ^{a}	2.8 ± 1.1 ^{a}
	8S_LN	66.6 ± 2.5 ^{c}	491 ± 15.6 ^{a}	58.5 ± 1.0 ^{b}	74.2 ± 1.1 ^{c}	152.6 ± 5.6 ^{b}	11.7 ± 0.4 ^{c}
	8S_MN	59.3 ± 3.1 ^{c}	522 ± 10.1 ^{ab}	57.0 ± 0.4 ^{b}	69.4 ± 0.7 ^{bc}	158.0 ± 3.4 ^{b}	10.4 ± 0.2 ^{c}
	8S_HN	45.5 ± 4.4 ^{b}	577 ± 2.9 ^{c}	50.6 ± 3.2 ^{b}	58.7 ± 3.2 ^{b}	135.7 ± 8.6 ^{b}	8.4 ± 0.5 ^{b}
	30S_LN	96.6 ± 3.4 ^{d}	483 ± 6.4 ^{a}	48.9 ± 0.6 ^{b}	76.1 ± 0.3 ^{c}	77.1 ± 2.2 ^{a}	11.2 ± 0.2 ^{c}
	30S_MN	101.1 ± 3.6 ^{d}	560 ± 12.4 ^{bc}	54.3 ± 0.5 ^{b}	72.8 ± 0.5 ^{c}	89.3 ± 3.3 ^{a}	11.1 ± 0.4 ^{c}
	30S_HN	89.5 ± 5.1 ^{d}	669 ± 11.6 ^{d}	53.9 ± 1.1 ^{b}	69.1 ± 2.1 ^{bc}	94.9 ± 5.8 ^{a}	11.2 ± 0.7 ^{c}

the lowest seed yield was observed for the 0S_HN treatment (2.5 g.plant^{-1}, **Table IV.A.1.1-B**). The seed yield under 8S_HN, which was one of the most unbalanced S and N treatments, was significantly different from 30S_HN conditions. Only the N effect was detected on thousand seed weight (**Table IV.A.1.1-A**) with the highest values under HN for a given S supply (**Table IV.A.1.1-B**). Altogether, this means that under HN, seed number was lower under the most unbalanced conditions (8S_HN) than under 30S_HN.

III.2 Effects of treatments on S and N partitioning

Only S and N effects were detected in the total S amount (**Table IV.A.1.2-A**). As expected, the total S amount decreased as a function of the reduction in S supply, for instance, from 89.5 mg per plant under 30S_HN conditions to 27.7 mg of S per plant under 0S_HN (**Table IV.A.1.2-B**). Out of all the treatments, 0S_HN had the greatest effect on the final S partitioning among the different plant parts (**Figure IV.A.1.3-A**). The majority of the S in plants grown under the 0S_HN treatment was allocated to the stem (42.5 % of the total S in the plant) while the larger proportion of S was allocated towards the seeds in the other treatments (48.9 to 58.5 % of the total S in the plants). The proportion of S in pod walls was significantly reduced by S limitation (0S_HN and all of the 8S conditions) and reached on average 23 % of the total S in the plants, versus 29 % under the 30S conditions. Under 0S_HN conditions, the proportion of S in roots (10.2 %) was also significantly higher than under 30S and 8S conditions, whatever the level of N supply, where it reached between 3 and 5.5 %. The distribution of S under the different conditions was less contrasting for the leaves (significantly higher for 0S_HN) and for the inflorescence and immature pods (significantly lower for 0S_HN and 8S_HN). Significant S and SxN effects were observed in the SHI (**Table IV.A.1.2-A**). The lowest SHI was observed for the 0S_HN treatment with 23.7 % of the total S recovered in the seeds (**Table IV.A.1.2-B** and **Figure IV.A.1.3-A**).

Highly significant S, N and SxN effects were detected in the total N amount in plants at the final stage of harvest (**Table IV.A.1.2-A**). As expected, the total N amount in plants was strongly reduced by LN treatment, whatever the S supply (483 mg.plant^{-1} for 30S_LN), when compared to 30S_HN conditions (669 mg.plant^{-1}) (**Table IV.A.1.2-B**). The distribution of N in plants was very different under 0S_HN conditions compared to other conditions (**Figure IV.A.1.3-B**) with the highest proportion in stems: 50.6 % of the total N versus 10.3 % for 30S_LN and 19.7 % for 8S_HN. The higher the N supply, the higher the proportion of N in stems under the 8S or 30S treatment (**Figure IV.A.1.3-B**). S, N and SxN effects were detected in the NHI (**Table IV.A.1.2-A**). In response to S restriction (0S) under HN conditions, the NHI was drastically reduced (around 20 % of the total N



<u>Figure IV.A.1.3</u> : Final S partitioning (%) (A) and final N partitioning (%) (B) for plants grown under 0S_HN, 8S_LN, 8S_MN, 8S_HN, 30S_LN, 30S_MN and 30S_HN conditions. Vertical bars indicate ± SE of the mean (n = 5, n = 6 for 8S_LN). Different letters indicate that mean values are significantly different ($p < 0.05$) between treatments for the different plant parts.

in plants) (**Table IV.A.1.2-B**). However, a greater NHI was observed under 30S_MN (72.8 %), 8S_LN (74.2 %) and 30S_LN (76.1 %) conditions.

III.3 Effects of treatments on S and N use efficiencies

SUE is strongly impacted by S and SxN effects (**Table IV.A.1.2-A**). Indeed, SUE was lower under 0S and 30S than under 8S conditions, whatever the N supply (**Table IV.A.1.2-B**). S, N and SxN effects were detected between treatments for NUE (**Table IV.A.1.2-A**). Compared to 30S conditions and irrespective of the N supply, NUE was significantly reduced by S deprivation (0S) or S limitation (8S) under non-limiting N conditions (HN) (**Table IV.A.1.2-B**). In the context of S limitation (8S), the increase in N fertilization reduced the NUE by 39.3 % (from 11.7 to 8.4 g of mature seed DM per g of N input for 8S_LN and 8S_HN, respectively). However, N supply had no effect on the NUE when S availability was non-limiting, and it reached 11.2 g of mature seed DM per g of N input in 30S_HN conditions.

III.4 Changes in seed nutritional quality in response to the management of S and N fertilization

For oil content, an S effect was observed mainly due to the 0S_HN treatment (with 31.9 % of the seed DM, **Table IV.A.1.3-A**). When the 8S and 30S treatments were compared for analysis of the S effect (excluding the 0S_HN treatment so as to avoid distortions), only an N effect was detected in the oil content, and no S or SxN effects were observed. Under 8S conditions, the lower the N supply, the higher the oil content in seeds, which increased by about 6.5 % between HN and LN conditions (**Table IV.A.1.3-B**).

The protein content in seeds is strongly dependent on the N fertilization effect (**Table IV.A.1.3-A**). Indeed, compared to HN, N limitation (LN) strongly reduced the seed protein content, irrespective of the S fertilization levels, with a reduction of 49.3 % and 54.5 % under 30S and 8S conditions, respectively (**Table IV.A.1.3-A**).

In order to evaluate the seed protein quality, the relative abundances of two different types of seed storage proteins (SSPs) including cruciferins at 30 kDa (S-poor SSP as BnC1 and CRU1) and napins at 12 kDa (S-rich SSP i.e. which contains higher levels of S-amino acids) were determined after SDS-PAGE on stain free gels (**Figure IV.A.1.4-A**). A decline in S-rich SSP accumulation was considered as a loss in seed quality. Variations in the proportion of napins and 30 kDa-cruciferins were significant between treatments, as shown in **Figure IV.A.1.4-B**. The effects of S and N fertilization on the relative abundances of 30 kDa-cruciferins and napins were significant (**Figure**

<u>Table IV.A.1.3</u> : S, N and SxN effects on oil content, protein content, and the napin:30 kDa-cruciferin ratio in mature seeds (A) and oil content (in % of DM, estimated by NIRS), protein content (mg.g DM^{-1}), and the napins:30 kDa-cruciferins ratio in mature seeds for plants grown under 0S_HN, 8S_LN, 8S_MN, 8S_HN, 30S_LN, 30S_MN and 30S_HN conditions (B). S, N and SxN effects were estimated by omitting 0S_HN condition. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$, ns : not significant (A). The values correspond to the mean ± SE (for oil content, n = 5 and n = 6 for 8S_LN ; for protein content, n = 5 ; for napin/cruciferin, n = 5 for 0S_HN, 8S_MN and 30S_MN and n = 4 for 8S_HN, 8S_LN, 30S_HN and 30S_LN). Different letters indicate that mean values are significantly different ($p < 0.05$) (B).

	Treatments	Oil content in mature seeds	Protein content in mature seeds	Napins:30 kDa-cruciferins ratio
A	S effect	ns $p = 0.138$	ns $p = 0.069$	*** $p = 3\text{x}10^{-7}$
	N effect	** $p = 0.007$	*** $p = 1.32\text{x}10^{-5}$	*** $p = 2.4\text{x}10^{-5}$
	SxN effect	ns $p = 0.066$	ns $p = 0.393$	* $p = 0.012$

	Treatments	Oil content in mature seeds (% DM)	Protein content in mature seeds (mg.g DM^{-1})	Napin:30 kDa-cruciferin ratio
B	0S_HN	31.9 ± 1.0 ^{a}	105 ± 5.2 ^{b}	0.1 ± 0.03 ^{a}
	8S_LN	39.4 ± 0.4 ^{c}	77 ± 9.2 ^{a}	1.0 ± 0.27 ^{bcd}
	8S_MN	38.6 ± 0.4 ^{bc}	118 ± 1.5 ^{b}	0.7 ± 0.12 ^{abc}
	8S_HN	36.9 ± 0.5 ^{b}	119 ± 13.3 ^{b}	0.4 ± 0.07 ^{ab}
	30S_LN	39.5 ± 0.5 ^{c}	73 ± 5.2 ^{a}	3.3 ± 0.52 ^{e}
	30S_MN	38.0 ± 0.5 ^{bc}	95 ± 3.7 ^{ab}	1.6 ± 0.10 ^{d}
	30S_HN	38.8 ± 0.5 ^{bc}	109 ± 4.2 ^{b}	1.3 ± 0.23 ^{cd}

IV.A.1.4-B). The abundance of napins was drastically reduced under the 0S_HN treatment, comprising only 3 % of the total detected seed proteins. Compared to the 0S_HN treatment, the abundance of napins was significantly improved by the increase in S fertilization (3.4 and 6.3 fold higher for 8S_HN and 30S_HN, respectively, **Figure IV.A.1.4-B**). As expected, the relative abundance of napins was significantly higher under 30S than under 8S conditions for a given level of N fertilization (+ 1.6 fold for LN or MN, + 1.9 fold for HN). The opposite occurred for the relative abundance of 30 kDa-cruciferins, which was lower under 30S conditions than under 8S conditions for a given level of N fertilization (**Figure IV.A.1.4-B**). Under non-limiting S conditions (30S), the decrease in the proportion of the 30 kDa-cruciferins associated with high N supplies was significant (**Figure IV.A.1.4-B**). Under 8S conditions, higher N supplies increased the relative proportion of 30 kDa-cruciferins: from 18.6 % for 8S_LN to 28.6 % for 8S_HN.

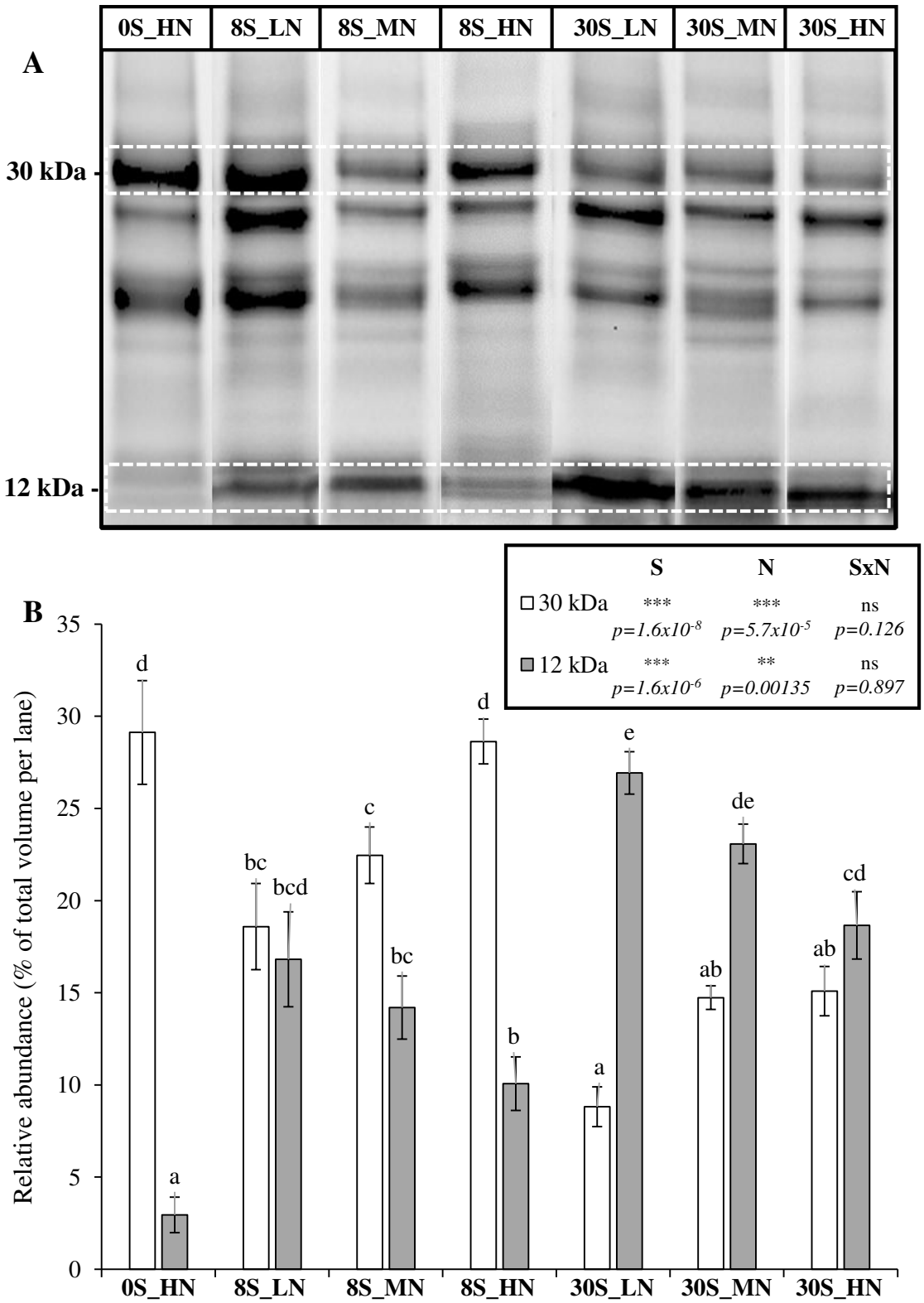
In order to provide a reliable indicator of seed protein quality, a ratio between the relative abundance of napins and 30 kDa-cruciferins was calculated (**Table IV.A.1.3**) and the higher the ratio, the higher the seed quality. The napins:30 kDa-cruciferins ratio was subject to highly significant S, N and SxN effects (**Table IV.A.1.3-A**). The lowest napins:30 kDa-cruciferins ratio was observed under the 0S_HN treatment (0.1) followed by 8S_HN (0.4). Under 8S conditions, the napins:30 kDa-cruciferins ratio was less than or equal to 1 whereas it was higher than 1 under 30S conditions, reaching 3.63 in the 30S_LN treatment (**Table IV.A.1.3-B**).

B. Effects of fractionated and delayed S inputs

The second aim of the study was to investigate the impact of fractionating or delaying S inputs under non-limiting N conditions on yield components, plant N and S status, and seed nutritional quality. Both treatments were compared to the 30+0S_HN treatment (corresponding to the previous 30S_HN).

III.5 Effects of fractionated or delayed S inputs on yield components and S and N plant status

No significant differences were observed between the treatments for DM partitioning (**Table IV.A.1.5-A**), total DM, seed DM, thousand seed weight or HI (**Table IV.A.1.4**), which meant that fractionated or delayed S inputs had no impact on seed yield components. No significant differences were detected between treatments for the total S in plants, NHI, SHI, NUE or SUE (**Table IV.A.1.5**). Concerning N status, the total N amount in plants was significantly higher for plants grown under 30+0S_HN conditions (669 mg.plant^{-1}) than under 0+30S_HN conditions (603 mg.plant^{-1}) (**Table**



<u>Figure IV.A.1.4</u> : SDS-PAGE of proteomic profiles from mature seeds (A) and the relative abundance (% of total volume per lane) of a 30 kDa protein (cruciferins, S-poor proteins) and a 12 kDa proteins (napins, S-rich proteins) in mature seeds (B) of plants grown under 0S_HN, 8S_LN, 8S_MN, 8S_HN, 30S_LN, 30S_MN and 30S_HN conditions. Vertical bars indicate ± SE of the mean (n = 5 for 0S_HN, 8S_MN and 30S_MN, n = 4 for 8S_HN, 8S_LN, 30S_HN and 30S_LN). Different letters indicate that mean values are significantly different ($p < 0.05$) between treatments. S, N and SxN effects were estimated by omitting 0S_HN condition. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$, ns : not significant.

IV.A.1.5). Plants in the 8+22S_HN treatment had an intermediate total N amount of about 632 mg.plant^{-1}.

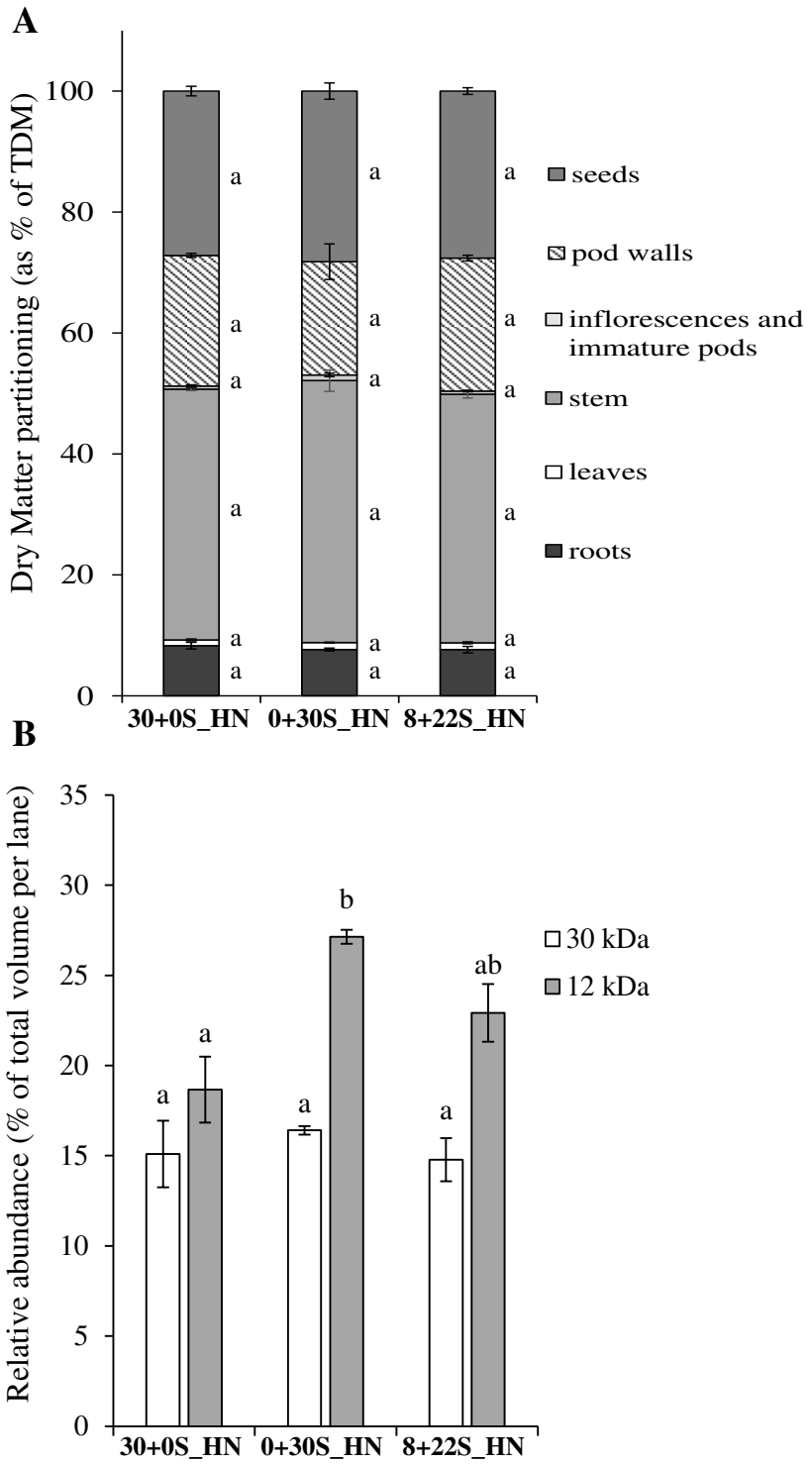
III.6 Effects of fractionated or delayed S supply on seed nutritional quality

Delaying or fractionating the S supply did not significantly affect oil and protein contents in seeds, as presented in **Table IV.A.1.6**. The relative abundance of napins (12 kDa, S-rich SSP) and 30 kDa-cruciferins (S-poor SSP) (**Figure IV.A.1.5-B**) revealed a significant increase in the percentage of 30 kDa-cruciferins under 0+30S_HN conditions compared to 30+0S_HN conditions, rising from 18.7 % to 27.1 %, respectively, with an intermediate level observed under 8+22S_HN conditions (22.9 %). The napins:30 kDa-cruciferins ratio presented in **Table IV.A.1.6** showed no significant differences between the three treatments. It was higher than 1 and ranked as 1.30, 1.66 and 1.70 for 30+0S_HN, 0+30S_HN and 8+22S_HN treatments, respectively.

IV. Discussion

IV.1 Adjustment of S and N inputs to optimize growth, seed yield and S and N use efficiencies

The results of our study are in line with previous studies in Brassicaceae species (Dubousset *et al*., 2009; Koralewska *et al*., 2007) which reported that biomass allocation was strongly affected under S deprivation and not under low sulfate availability (**Figure IV.A.1.2**). As expected, total DM and seed DM were significantly reduced by 0S_HN treatment (Scherer, 2001) as well as SUE, NUE, SHI and NHI (**Table IV.A.1.2**). Nevertheless, the stem biomass and the S and the N allocated to the stem were significantly increased in response to S deprivation, which indicated that S and N were sequestered mainly in the stem, which was a higher sink organ (**Figure IV.A.1.3**). Furthermore, the analysis of the effects of various S and N supplies on plant growth, DM allocation, and S and N plant status highlighted the tight interaction between S and N metabolism (Anjum *et al*., 2012; Fismes *et al*., 2000; Kopriva and Rennenberg, 2004; Salvagiotti and Miralles, 2008) and the necessity to jointly monitor S and N fertilization. The increase in S fertilization in non-limiting N conditions led to improvement in the seed yield (from 7.6 to 10 g.plant^{-1}), whereas it had no effect on seed yield under N limiting conditions. Dubousset *et al*. (2010) showed that low S conditions improved S remobilization into the sulfate form (SO_4^{2-}) from the leaves independently of N during the grain filling period in order to satisfy seed S requirements. This explains the high SUE observed in all the 8S treatments (**Table IV.A.1.2**). It has been shown in rapeseed that low N availability promoted early N remobilization and recycling (Desclos *et al*., 2009) and allowed remobilization



<u>Figure IV.A.1.5</u> : Dry matter partitioning (as % of total DM in plant) (A) and relative abundance (% of total volume per lane) of a 30 kDa protein (cruciferin, S-poor protein) and a 12 kDa protein (napin, S-rich protein) in mature seeds (B) of plants grown under 30+0S_HN, 0+30S_HN and 8+22S_HN conditions. Vertical bars indicate ± SE of the mean (n = 5, **B** ; n = 4 for 30+0S_HN). Different letters indicate that mean values are significantly different.

from the rosette to the seeds. Overall, as expected from other studies (Dubousset *et al*., 2009; Girondé *et al*., 2015a, 2015b), N-limiting conditions enhanced the NHI, NUE and SHI but they interfered with S availability because SxN interaction effects were also detected for the NHI, SHI, NUE and SUE. Depending on S availability, the response to N limitation was modulated and was the most impaired under 30S condition, thus showing the importance of balancing the fertilizer N:S ratio carefully. For instance, the NHI increased significantly by 21 % between the HN and LN conditions under 8S but was not significantly different under 30S. Our results also highlighted synergetic effects on S and N use efficiencies at optimum rates of S and N inputs, and antagonistic effects at excessive rates of one of the two elements, as also described by Fismes *et al*. (2000). These results clearly indicate that adjustments of S and N fertilizer applications may lead to high seed yields and agronomic performance while increasing sustainability (*i.e.* a reduction in N fertilizer use).

IV.2 Importance of balancing S and N inputs to maintain seed nutritional quality

Previous studies based on proteomic approaches (D'Hooghe *et al*., 2014) have underlined that seed protein quality was reduced in winter oilseed rape in response to S fertilization limitation. Indeed, S limitation led to reductions in the accumulation of S-rich seed storage proteins (SSPs) such as napins, whereas the accumulation of S-poor SSPs (such as cruciferins BnC1) was favored. In our experiment, although S deficiency reduced seed protein quality, seed protein content was not affected by S deficiency and remained stable, whatever the level of S fertilization (between 105 and 119 mg.g seed DM^{-1}, respectively, **Table IV.A.1.3**). Accordingly, Malhi and Gill (2007) have reported that higher N inputs increased protein concentration and reduced oil content in oilseed rape seed, whereas S fertilization did not significantly change seed protein concentrations. Our results underlined the negative effect of N limitation on seed protein content (**Table IV.A.1.3**), which decreased by 33 % and 35 % between HN and LN conditions, respectively, under both the 30S and 8S conditions. Moreover, Aminpanah (2013) positively correlated the N rate input fertilizer with the protein content in seed. The present study shows that oil content was also reduced by a high N input, but only under S limitation conditions (8S) or more severely by S deprivation (0S) (**Table IV.A.1.3**). Our results confirmed that S deprivation (0S_HN) drastically affected the seed protein quality of oilseed rape by reducing the relative abundance of napins, without strong reductions in seed protein content (D'Hooghe *et al*., 2014). In contrast, the relative abundance of 30 kDa-cruciferins (S-poor SSP) increased, which acted as a compensatory mechanism to maintain seed protein content, thus leading to adjustment of the S-rich/S-poor protein ratio. Generally, the relative abundance of napins was lower under 8S than under 30S conditions (**Table IV.A.1.2**). However,

Table IV.A.1.4 : Total DM (g.plant^{-1}), seed DM (g.plant^{-1}), thousand seed weight (mg) and the harvest index (HI, DM in seeds as % of total DM in plant) for plants grown under 30+0S_HN, 0+30S_HN and 8+22S_HN conditions. The values correspond to the mean ± SE (n = 5). Different letters indicate that mean values are significantly different ($p < 0.05$).

Treatments	DM_{total} (g.plant^{-1})	Seed DM (g.plant^{-1})	Thousand seed weight (mg)	HI (DM in seeds as % of total DM in plants)
30+0S_HN	37.0 ± 1.7 ^{a}	10.1 ± 0.4 ^{a}	3578 ± 75 ^{a}	27.2 ± 0.8 ^{a}
0+30S_HN	35.8 ± 1.1 ^{a}	10.1 ± 0.6 ^{a}	3584 ± 43 ^{a}	28.2 ± 1.4 ^{a}
8+22S_HN	36.6 ± 0.7 ^{a}	10.1 ± 0.3 ^{a}	3541 ± 92 ^{a}	27.6 ± 0.5 ^{a}

Table IV.A.1.5 : Total N in plants (mg.plant^{-1}), total S in plants (mg.plant^{-1}), N Harvest Index (NHI : N in seeds as % of total N in plant), S Harvest Index (SHI : S in seeds as % of total S in plant), N Utilization Efficiency (NUE; g of mature seed DM.g^{-1} of N input) and S Utilization Efficiency (SUE : g of mature seed DM.g^{-1} of S input) for plants grown under 30+0S_HN, 0+30S_HN and 8+22S_HN conditions. The values correspond to the mean ± SE (n = 5). Different letters indicate that mean values are significantly different ($p < 0.05$).

Treatments	Total S in plants (mg.plant^{-1})	Total N in plants (mg.plant^{-1})	SHI (S in seeds as % of total S in plants)	NHI (N in seeds as % of total N in plants)	SUE (g of mature seed DM/g of S input)	NUE (g of mature seed DM/g of N input)
30+0S_HN	89.5 ± 5.1 ^{a}	669 ± 11.6 ^{b}	53.9 ± 1.1 ^{a}	69.1 ± 2.1 ^{a}	94.9 ± 5.8 ^{a}	11.2 ± 0.7 ^{a}
0+30S_HN	91.1 ± 3.5 ^{a}	603 ± 10.8 ^{a}	56.9 ± 2.8 ^{a}	67.7 ± 2.3 ^{a}	94.8 ± 3.9 ^{a}	11.2 ± 0.5 ^{a}
8+22S_HN	98.3 ± 4.4 ^{a}	632 ± 24.4 ^{ab}	53.6 ± 1.8 ^{a}	69.3 ± 1.6 ^{a}	95.4 ± 2.7 ^{a}	11.2 ± 0.3 ^{a}

Table IV.A.1.6 : Oil content (in % of DM, estimated by NIRS), protein content (mg.g DM^{-1}) and the napin:30 kDa-cruciferin ratio in mature seeds for plants grown under 30+0S_HN, 0+30S_HN and 8+22S_HN conditions. The values correspond to the mean ± SE (n = 5, n = 4 for napin/cruciferin ratio for 30+0S_HN). Different letters indicate that mean values are significantly different ($p < 0.05$).

Treatments	Oil content in mature seeds (% DM)	Protein content in mature seeds (mg.g DM^{-1})	Napin:30 kDa-cruciferin ratio
30+0S_HN	38.8 ± 0.5 ^{a}	109 ± 4.2 ^{a}	1.30 ± 0.23 ^{a}
0+30S_HN	38.6 ± 0.5 ^{a}	104 ± 5.2 ^{a}	1.66 ± 0.04 ^{a}
8+22S_HN	39.4 ± 0.5 ^{a}	96 ± 9.1 ^{a}	1.70 ± 0.13 ^{a}

when low S is combined with low N inputs, the napins abundance was not significantly different from the levels observed under high S and high N conditions. This indicated that plants were able to increase their S and N use efficiencies through the optimization of S and N remobilization in response to low S and N availabilities (**Table IV.A.1.2**). However, despite the high quality of seed protein under the 8S_LN treatment, the protein content remained low. An unexpected effect was the very high relative abundance of napin in seeds of plants grown under 30S_LN conditions, whereas the SHI was low (reached 26.93 %). Because S was not limiting and protein content decreased in this condition, the proportion of napins and cruciferins in the seeds was out of balance. The increase in N input fertilizer was positively correlated with the relative abundance of 30 kDa-cruciferins and negatively correlated with the relative abundance of napins under both 8S and 30S conditions.

IV.3 Delaying or fractioning S inputs could be a lever for improving seed quality

As recommended, conventional S fertilization amounts attain 30 kg S ha^{-1} and are applied once at the end of the vegetative rest period in oilseed rape (GS32), when the level of S mineralization in the soil may be low (Terres Inovia, http://www.terresinovia.fr/). In our study we aimed to compare different S amounts and application timings from conventional recommendations and how they affected seed yield and seed quality criteria. It has been shown that in response to S limitation, S remobilization is strongly increased along with enhanced S uptake efficiency *via* an increase in root proliferation and the induction of sulfate transporters in both roots (Abdallah *et al*., 2010; Hawkesford and De Kok, 2006) and source leaves of oilseed rape (Dubousset *et al*., 2009; Girondé *et al*., 2014). Thereby, the hypothesis is that limiting S input at specific stages or fractionating S inputs might allow better S uptake and remobilization, which would lead to better seed protein quality. Our results showed no significant differences in growth performance or S and N uses efficiencies when S was delayed (0+30S_HN) or fractionated (8+22S_HN) (**Table IV.A.1.4** and **5**). The total N in plants was only significantly higher when S was applied once at bolting (GS32, 30+0S_HN), but this was not observed when applied once at early flowering (GS53, 0+30S_HN). The explanation could be that the amount of S taken up between GS32 and GS53 facilitated greater efficiency in N uptake and assimilation. Oil and protein contents were not reduced or improved by delaying or fractionating the S input (**Table IV.A.1.6**). However, delaying the S input improved the seed protein quality by significantly increasing the relative abundance of napins. These observations may lead to reconsideration of the conventional scheme because they demonstrate that fractionated or delayed S fertilizer inputs could (i) meet the requirements in terms of seed yield and quality criteria and (ii) facilitate on time adjustments according to the stage of growth. Coupling this

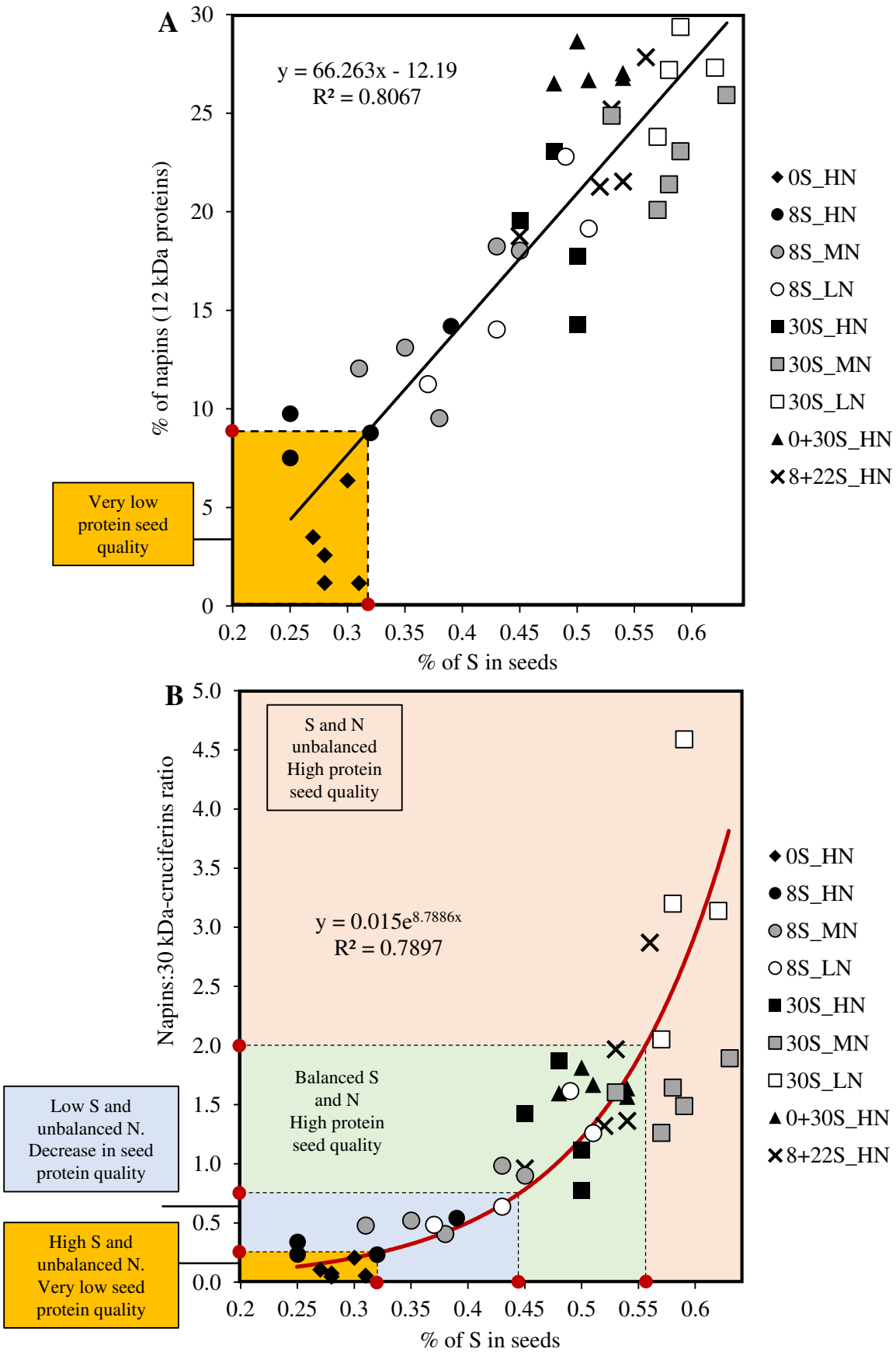


Figure IV.A.1.6 : Relationship between the relative S content (% S) and the relative abundance of napin (S-rich seed storage protein of 12 kDa) in mature seeds (A) and the relative S content (% of S) and the napin:30 kDa-cruciferin ratio (B). Data corresponding to the different S and N fertilization combinations were plotted to determine the linear correlation ($n = 41$, $p < 0.0001$, RMCE = 3.702).

fractionating approach with different levels of N fertilizer might provide additional insights for developing N and S management strategies.

IV.4 Towards new indicators to predict seed protein quality

The protein and oil contents of seeds are crucial factors for farmers and industry (e.g. compensation of farmers based on the percentage of wheat grain protein). However, to date the nutritional quality of the grain has not been taken into account, which could be detrimental for the baking quality of bread in the case of wheat (Ortolan and Steel, 2017; Timms *et al.*, 1981). In oilseed rape, seeds are used for the production of meal used for livestock feed. The increasing worldwide demand for vegetable protein for human nutrition (vegetarian or vegan diets) has led to a wider search for sources of vegetable protein, thus making oilseed rape proteins interesting alternatives due to their high content of essential S-amino acids (Von Der Haar *et al.*, 2014). Therefore, the protein quality can be associated to the level of S-rich proteins content in the seeds, especially like napins. In our study, a strong linear correlation between the relative S content in seed (% of S) and the relative abundance of napins in mature seeds was determined with the data from the 9 combinations of S and N fertilization (**Figure IV.A.1.6-A**). Therefore, this relationship suggests that the relative abundance of napin could be predicted by the measurement of S% in seeds. Below a threshold of 0.32 % of S in seeds, corresponding to a relative napin abundance of 9 %, the protein quality of the seeds is severely reduced (**Figure IV.A.1.6-A**). Our data obtained under controlled conditions have shown the significant relationship between the relative S content and the ratio of napins:30 kDa-cruciferins (**Figure IV.A.1.6-B**). As the napins:30 kDa-cruciferins ratio could be a reliable indicator of the seed protein quality taking into account S and N fertilization, this relationship could provide a new tool for the determination of seed protein quality in oilseed rape according to different N and S managements (**Figure IV.A.1.6-B**). For example, under our experimental conditions, seeds with a napins:30 kDa-cruciferins ratio value below 0.25 corresponded to seeds of very low protein quality and with less than 0.32 % of S (**Figure IV.A.1.6-B**). A threshold value at 0.44 % of S in seeds should be reached to ensure no deleterious effect of N and/or S availability on seed protein quality. When the napins:30 kDa-cruciferins ratio exceeds 2, which corresponded to S% value higher than 0.56 %, protein quality would not be affected but it would indicate an unbalanced management of S and N fertilization (**Figure IV.A.1.6-B**). These indices are interesting new tracks but it will be necessary to test these indices in other trials to verify their relevance and repeatability, or if there is a need to calibrate them for control or field conditions or for specific genotypes. In the perspective of imposing added values according to the markets (e.g.

edible oil, vegetable protein), this index (%S in seeds) may provide a relevant tool to direct specific seed lots for different uses according to protein quality levels.

V. Conclusion

Reducing fertilizer use while maintaining or even improving seed yield and quality has become an environmental and economic challenge. Our results are a step towards achieving these targets and they provide insights into the joint monitoring of S and N fertilization in oilseed rape. Here we have highlighted the importance of (i) balancing S and N inputs rather than providing a single element in an excessive way and (ii) delaying or fractionating S inputs. In addition, we have demonstrated that the S% and the napins:30 kDa-cruciferins ratio, which could be used as a relevant index for the determination of seed quality, is highly dependent on S/N fertilization in relation to S supply.

CHAPITRE IV - RÉSULTATS

A. Expérimentations *in planta* en conditions contrôlées et de plein champ

A.2 Évaluation de l'impact de différents schémas de fertilisation soufrée sur la qualité des graines de colza et validation d'indicateurs de la qualité protéique des graines en condition de plein champ

<u>*Contexte*</u> : La fertilisation soufrée est cruciale en condition de plein champ afin de garantir une bonne qualité protéique des graines de colza. Lors de l'expérimentation en conditions contrôlées, il a été montré que la teneur en S dans les graines permet d'évaluer la qualité protéique de la graine. L'utilisation de cette teneur en S permettrait aussi d'identifier des sites ou des génotypes plus sensibles à une limitation en S.

<u>*Objectifs*</u> : Nos objectifs étaient d'évaluer l'impact de différents schémas de fertilisation soufrée au champ sur les composantes du rendement et la qualité protéique des graines de colza. Ces données ont été utilisées dans la perspective de valider ou non des indicateurs de la qualité protéique des graines produites en champ et de caractériser l'effet de la fertilisation soufrée quel que soit les sites ou les génotypes.

<u>*Démarche expérimentale*</u> : Des cultures de colza d'hiver ayant reçu différents niveaux de fertilisation en S ont été conduites au champ par Terres Inovia en 2015 et 2016. Des lots de graines issus de ces deux campagnes et provenant respectivement de 14 et 8 variétés de colza cultivées sur 4 et 7 sites selon des itinéraires de fertilisation S variables, ont été analysés pour leur rendement en graines, teneur en huile et protéine, teneur en S (%S) et pour leur qualité protéique.

<u>*Résultats*</u> : Les principaux résultats ont confirmé la valeur seuil de 0,32 % de S dans les graines à atteindre pour garantir une bonne qualité protéique des graines de colza, critère essentiel à l'élaboration d'un tourteau de bonne qualité nutritionnelle. Un %S inférieur à ce seuil indique qu'une déficience en S est survenue lors de la culture, conduisant à une réduction de la qualité protéique des graines caractérisée par la diminution de la teneur en napines (protéines de réserve riches en acides aminés S) des graines matures. L'analyse des graines des essais Terres Inovia a montré l'existence d'une forte variabilité environnementale et génotypique de la teneur en S des graines de colza pouvant avoir un impact significatif sur la qualité protéique des graines de colza. La valeur seuil de 0,32 % de S a permis de détecter les lots de graines provenant de parcelles déficitaires en S, ceci quel que soit le génotype, conduisant à un fort risque de diminution de la qualité protéique des graines caractérisée par une baisse de l'abondance relative en napines. Le choix de la variété à utiliser en fonction du site est un élément à prendre en compte dans l'optique d'optimiser le rendement, l'efficience d'usage du S et la qualité grainière du colza.

A.2 Évaluation de l'impact de différents schémas de fertilisation soufrée sur le statut soufré et sur la qualité des graines de colza et validation d'indicateurs de la qualité protéique des graines en condition de plein champ

I. Introduction et objectifs

Cette deuxième section du **Chapitre IV.A** repose sur des expérimentations en condition de plein champ, visant à vérifier certaines observations acquises en conditions contrôlées. En effet, il est parfois difficile de valider au champ certains résultats obtenus en serre étant donné la multitude de variables supplémentaires à prendre en compte, notamment des facteurs environnementaux (climatiques, pédologiques, etc). Ce changement d'échelle peut modifier l'interprétation des résultats obtenus en conditions contrôlées.

L'objectif du travail présenté dans cette section est double. **Premièrement**, grâce à un essai au champ (Prenois, Bourgogne, France) faisant varier les modalités d'apport en S, il s'agit (i) d'étudier les **effets d'apports contrastés, fractionnés ou retardés en engrais soufrés sur les composantes du rendement et sur la qualité nutritionnelle des graines de colza** et (ii) de vérifier si **l'indicateur de la qualité protéique** des graines proposé à l'issue des expérimentations en conditions contrôlées peut être transposable au champ. **Deuxièmement**, des graines de différents génotypes cultivés sur plusieurs sites issus du réseau d'essais de Terres Inovia (campagnes 2015 et 2016) ont été analysées afin (i) de vérifier **l'impact de la fertilisation soufrée sur la composition et la qualité des graines** en intégrant une diversité de sites et de génotypes et (ii) de vérifier si la **qualité protéique des graines est affectée par la variabilité environnementale (associée aux sites) et génotypique de la teneur en S des graines.** Ces résultats ont été acquis et analysés avec la collaboration de Yacine Akmouche (M2) et Marion Hodel (M1), deux étudiants du Master Biologie Agrosciences Écoproduction, Biotechnologies et Biovalorisation végétale de l'Université de Caen Normandie.

II. Matériels et méthodes

II.1 Prenois

Ce dispositif expérimental est décrit dans le **Chapitre III.A section I.2**. Succinctement, l'essai au champ a été réalisé sur des microparcelles localisées à Prenois (Bourgogne, France, 47° 22'N, 4° 54'E) en partenariat avec Dijon Céréales en 2015-2016. La fertilisation soufrée a été apportée sous 7 modalités différentes, contrastées en termes de quantité d'apport en fertilisant soufré (0, 30 ou 60 unités de S), type de fertilisant utilisé (kieserite ou polysulphate), et de moment d'apport (apport en une fois à la reprise de végétation au stade C1 (GS3, Lancashire *et al.*, 1991); ou à la montaison, stade C2 (GS32) ; ou apport fractionné aux stades C1 et C2) (**Tableau III.A.4**). À la fin de la culture, les graines ont été récoltées, pesées, séchées puis broyées en poudre fine afin d'être utilisées pour des analyses élémentaires et biochimiques (EA-IRMS, XRF, analyses protéomiques, voir **Chapitre III.A sections II.1 et II.2**).

II.2 Essais Terres Inovia 2015 et 2016

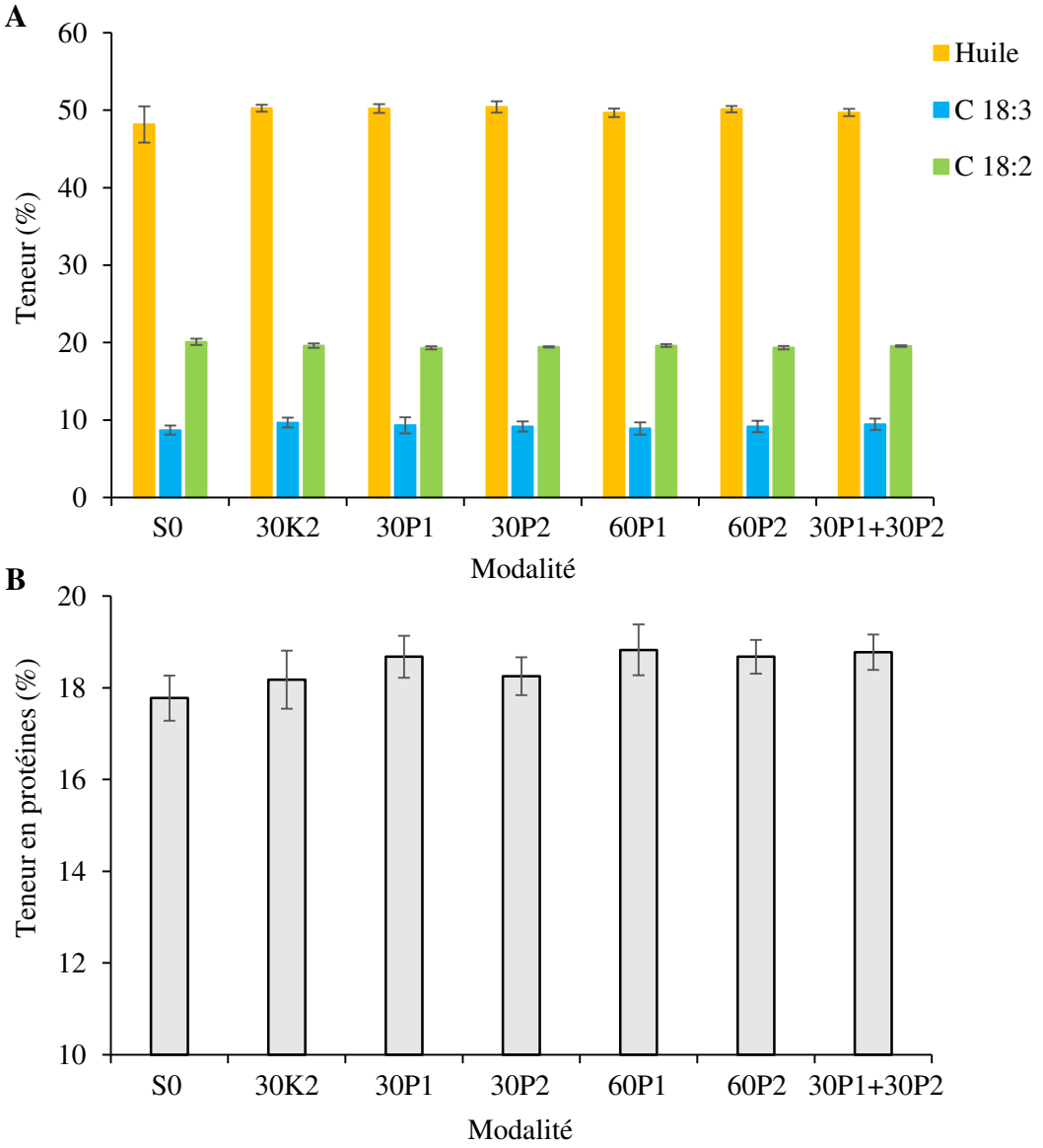
Des lots de graines provenant de deux campagnes (récoltes en 2015 et 2016) d'essais de Terres Inovia réalisées pour plusieurs génotypes cultivés sur des sites différents ont été analysés (**Tableau III.A.5**). Seules les informations relatives à la fertilisation soufrée, au rendement, à la teneur en protéines et en huile des graines des essais Terres Inovia 2015 nous ont été communiquées (**Figure III.A.3**). Des analyses de la teneur en S des différents lots de graines des essais 2015 et 2016 (%S) ont été réalisées par l'utilisation de la fluorescence à rayon X (XRF, voir **Chapitre III.A section II.1.b**).

Concernant la campagne 2015, les graines disponibles proviennent de 14 variétés de colza cultivées sur 4 sites (Surgères, En Crambade, Subdray et Nancy). Les sites de Surgères et de En Crambade présentent deux modalités différentes de conduite en termes de fertilisation soufrée ce qui nous a permis l'analyse de 6 modalités différentes au total.

Les graines produites lors de la campagne 2016 proviennent de 8 variétés de colza cultivées sur 7 sites (Surgères, En Crambade, Subdray, Etoile, Mons, Dijon et Nancy). Le site de Subdray présente deux conduites différentes en termes de fertilisation soufrée conduisant à l'analyse de 8 modalités différentes. Les informations précises concernant les conduites de la fertilisation soufrée n'ont pas été communiquées. Les différentes informations fournies par ces deux campagnes ont permis d'étudier l'effet génotype et l'effet site (incluant les pratiques culturales et les variabilités environnementales et pédologiques) sur la teneur en S des graines de colza et leurs impacts possibles sur la qualité protéique des graines.

<u>Tableau IV.A.2.1</u> : Rendement grainier (quintaux.ha^{-1}) des colzas cultivés au champ (Prenois) selon les 7 modalités de fertilisation soufrée. Le soufre a été apporté sous forme de Kieserite (K) ou de Polysulfate (P) à C1 (1) : reprise de végétation et/ou à C2 (2) : montaison. 30 : 150 kg de kieserite.ha^{-1} ou 156 kg de Polysulfate.ha^{-1}, 60 : 312 kg de Polysulfate.ha^{-1}.

Modalité	Rendement (qx/ha)
S0	18,495
30K2	19,019
30P1	19,607
30P2	19,803
60P1	19,904
60P2	19,366
30P1+30P2	19,460



<u>Figure IV.A.2.1</u> : Teneurs en huile et en acides gras (C18:3 : ω3 et C18/2 : ω6) (A) et teneur en protéines (B) des graines de colzas cultivés au champ selon les 7 modalités de fertilisation soufrée (Prenois), déterminées par analyse NIRS. Les valeurs représentées sont la moyenne ± l'écart-type (n = 4). Aucune différence significative n'a été détectée entre les modalités pour les teneurs en huile, en acides gras et en protéines.

III. Résultats et Discussion

A. Essai Prenois

III.A.1 Impacts des modalités de fertilisation soufrée sur le rendement grainier, les teneurs en huile, acides gras (ω6 et ω3) et protéines des graines

Le rendement grainier moyen varie entre 18,5 et 19,9 q.ha^{-1} respectivement pour les modalités S0 (aucun apport de S) et 60P1 (60 U de S en début de montaison), sans effet significatif du niveau de fertilisation S même s'il est observé une baisse moyenne du rendement de 7 % entre les modalités 60P1 et S0 (**Tableau IV.A.2.1**).

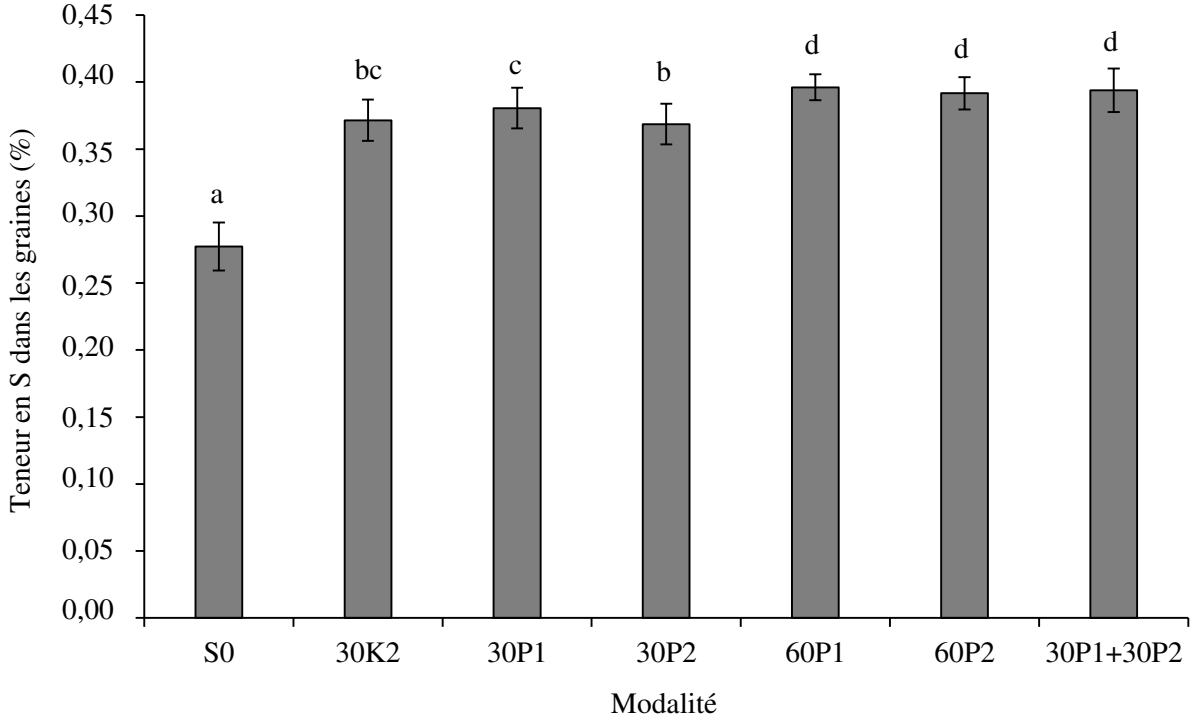
Les teneurs en huile et en acides gras essentiels (C18:2, ω6 et C18:3, ω3), estimées par analyses NIRS (**Figure IV.A.2.1-A**), ne sont pas affectées par les différents schémas de fertilisation S. La teneur en huile dans les graines de colza varie entre 48,1 % (S0) et 50,4 % (30P2), les teneurs en acide α-linolénique (C18:3) entre 8,7 % (S0) et 9,8 % (30K2) et les teneurs en acide linoléique (C18:2) entre 19,3 % (30P1) et 20 % (S0). Les teneurs en protéines des graines estimées par analyse NIRS ne sont pas significativement différentes entre les différentes modalités de fertilisation soufrée (**Figure IV.A.2.1-B**) et varient entre 17,7 % (S0) et 18,8 % (60P2).

III.A.2 Impacts des modalités de fertilisation soufrée sur les teneurs en S et la qualité protéique des graines

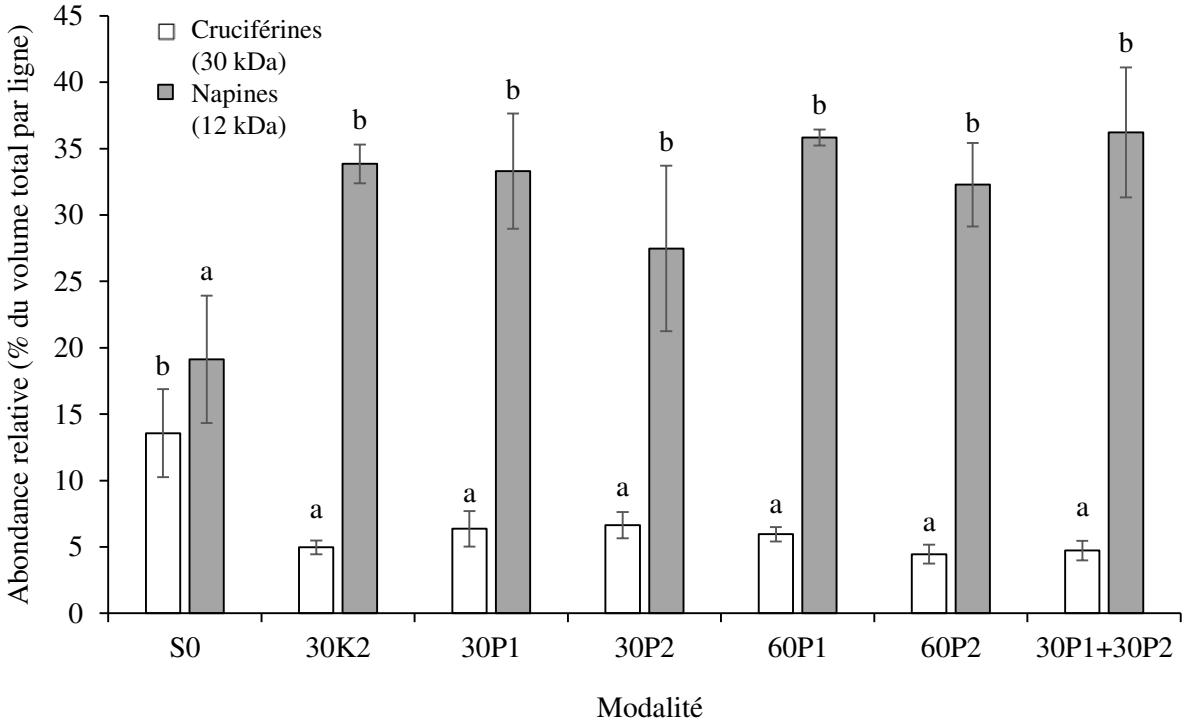
Les différentes modalités de fertilisation soufrée montrent des effets significatifs sur la teneur en S dans les graines de colza (**Figure IV.A.2.2**). La teneur en S des graines augmente en fonction de la quantité de S apportée par fertilisation, atteignant en moyenne 0,27 % pour la modalité S0, entre 0,36 et 0,38 % pour les modalités d'apport de 30 U de S et en moyenne 0,39 % pour les trois modalités d'apport de 60 U de S.

La qualité protéique des graines a été analysée *via* une approche protéomique en quantifiant les teneurs en deux catégories de protéines de réserve que sont les napines (protéines de réserves riches en S) et les cruciférines de 30 kDa (protéines de réserves pauvres en S) (**Chapitre IV.A.1**). Une teneur en protéines riches en S permet d'apporter des acides aminés essentiels (*i.e.* qui ne sont pas synthétisés par les animaux) tel que la méthionine (et d'un de ses dérivés la cystéine), essentiel par exemple à la formation des protéines.

L'abondance relative en napines est significativement plus faible pour la modalité S0 par rapport aux 6 autres modalités et atteint en moyenne 19 et 36,2 % respectivement pour les modalités S0 et 30P1+30P2 (**Figure IV.A.2.3**). Un apport de S, quel que soit le stade de développement et la



<u>Figure IV.A.2.2</u> : Teneur en S des graines de colzas cultivés au champ selon les 7 modalités de fertilisation soufrée (Prenois). Les valeurs représentées sont les moyennes ± l'écart-type de toutes les mesures de graines par XRF (n = 17, 19, 21, 23 ou 25 selon les traitements). Les lettres en minuscule indiquent les différences significatives entre traitements ($p < 0,05$).



<u>Figure IV.A.2.3</u> : Abondance relative (% du volume total par ligne) en cruciférines 30 kDa (protéines de 30 kDa pauvres en S) et en napines (protéines de 12 kDa riches en S) dans les graines matures des colzas cultivés selon les 7 modalités au champ (Prenois). Les valeurs représentées sont les moyennes ± l'écart-type (n = 4, sauf pour 30P2 où n = 3). Les lettres en minuscule indiquent les différences significatives entre traitements ($p < 0,05$).

dose, permet d'augmenter l'abondance relative en napines de près de 40 % (1,92 fois plus). Cependant, si la modalité S0 est exclue de l'analyse statistique, aucun effet dose ou date d'apport en S n'est observé. À l'inverse des napines, l'abondance relative en cruciférines 30 kDa dans les graines est significativement plus élevée pour la modalité S0. Elle atteint en moyenne 4,4 et 13,5 % respectivement pour les modalités 60P2 et S0. Les 6 autres modalités (S0 exclue) ne présentent pas de différences significatives de la teneur en cruciférines 30 kDa.

III.A.3 Discussion partielle

Les différents niveaux de fertilisation soufrée n'ont pas eu d'effet sur le rendement du colza cultivé au champ (**Tableau IV.A.2.1**) malgré un rendement plus faible pour le traitement S0 (18,5 $q.ha^{-1}$), le plus élevé étant associé au traitement 60P1 (19,9 $q.ha^{-1}$). En comparaison avec les rendements moyens observés en Bourgogne pour la campagne 2015-16 (30 $q.ha^{-1}$, source Agreste SAA - FranceAgriMer), le rendement grainier observé sur la parcelle de Prenois est faible. Les apports en azote (N), en phosphore (P) et potassium (K) ayant été apportés de façon optimale, ce faible rendement ne peut pas s'expliquer par une fertilisation N, P ou K limitante. Ce site avait été initialement choisi car il présentait de forts risques de carence en S notamment liés à un sol très superficiel et drainant. Cela pourrait expliquer en grande partie que les apports de 60 unités de S n'aient pas conduit à de forts rendements. Peuvent s'ajouter à cela d'autres facteurs limitants au champ qui vont influencer la disponibilité du S dans le sol ainsi que son prélèvement par la plante (pédologie du sol, conditions climatiques, lessivage du S etc). Des doses supérieures à 60 unités de S seraient donc à préconiser pour viser des objectifs de rendement plus élevé sur cette parcelle, qui pourraient être fractionnées dans le temps afin de s'adapter aux conditions et aléas climatiques (éviter le lessivage du S du sol qui est de plus drainant et superficiel) et d'adapter les apports en S aux besoins de la culture. De plus, aucun effet sur les teneurs en huile, en acides gras (ω6 et ω3) et en protéines (mesures NIRS) n'a été détecté. En effet, une limitation en S n'est pas systématiquement associée à une baisse significative des teneurs en huile et protéines (D'Hooghe *et al*., 2014 ; Dubousset *et al*., 2010). Cela peut être dû à la disponibilité initiale du sol en S (conditionnée par le précédant cultural par exemple), mais aussi au moment où apparaît la déficience en S. Plus l'occurrence de la limitation en S se produit tôt dans le cycle de développement du colza, plus la déficience en S aura un impact négatif sur les composantes du rendement et de la qualité des graines récoltées, notamment si celle-ci n'est pas corrigée par un apport tardif en fertilisant S (D'Hooghe *et al*., 2014 ; Dubousset *et al*., 2010 ; Girondé *et al*., 2014). Par exemple, une limitation en S apparaissant au début de la floraison n'a pas d'effet sur le rendement ni sur la teneur en huile

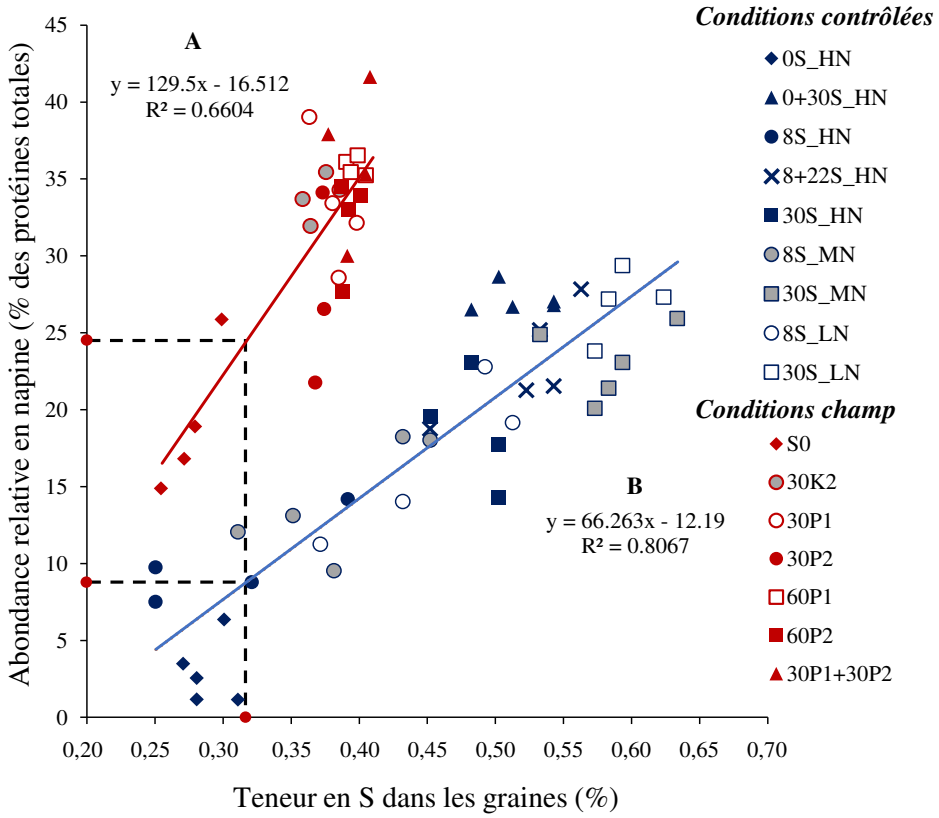


Figure IV.A.2.4 : Relation entre la teneur en S (%S) et l'abondance relative en napines (protéines de 12 kDa riches en S, en % des protéines totales) dans les graines matures produites lors de la culture en champ (Prenois) (A) et lors de la culture en conditions contrôlées (B). Les données au champ (n = 4, sauf pour 30P2 où n = 3) et en conditions contrôlées (n = 5, sauf pour les traitements 8S et 30S en conditions HN et LN) correspondant aux différentes modalités de fertilisation en S ont été rassemblées pour la détermination de la corrélation linéaire A (n = 27, p < 0,0001, RMCE = 3,993, R^2 = 0,66) et B (n = 41, p < 0,0001, RMCE = 3,702, R^2 = 0,8067).

Tableau IV.A.2.2 : Valeur du ratio entre l'abondance relative en napines et la teneur relative en cruciférines 30 kDa (napines:cruciférines 30 kDa) pour les graines de colzas cultivés au champ (Prenois) sous les 7 modalités de fertilisation S. Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'écart-type (n = 4, sauf pour 30P2 où n = 3).

Modalité	S0	30K2	30P1	30P2	60P1	60P2	30P1+30P2
napines:cruciférines 30 kDa	1,6 ±0,8[a]	6,6 ±1,1[bc]	5,6 ±2,3[bc]	4,5 ±1,7[b]	6,1 ±0,5[bc]	7,3 ±0,7[bc]	7,8 ±1,9[c]

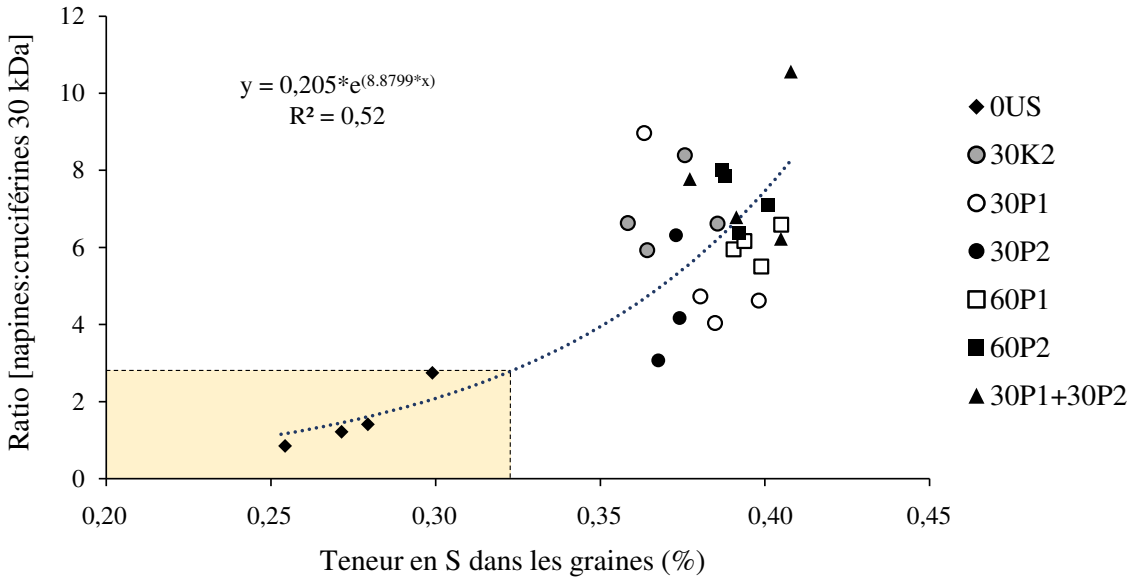
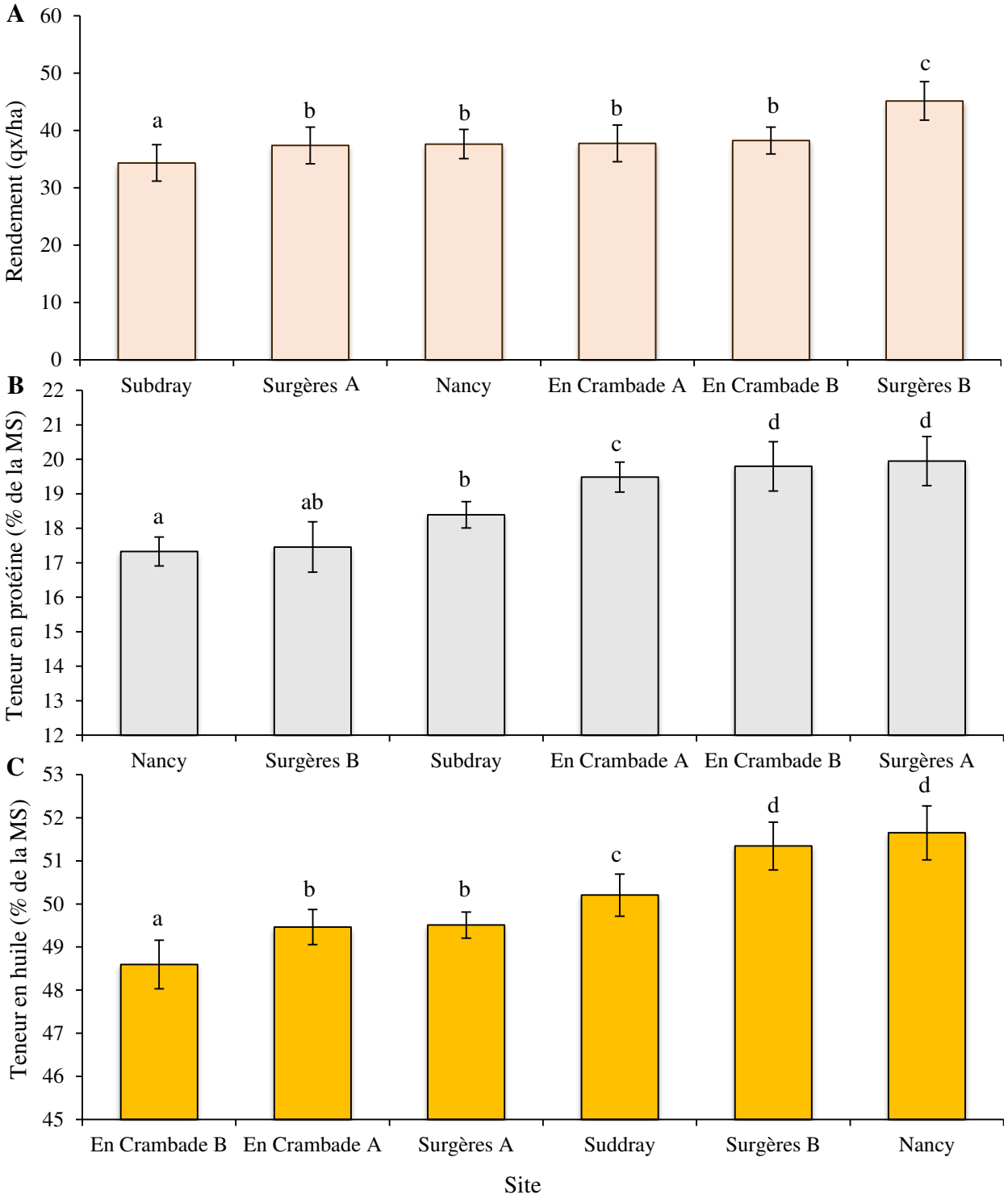


Figure IV.A.2.5 : Relation entre la teneur en S (%S) et le rapport [napines:cruciférines 30 kDa] pour la culture au champ de Prenois. Les données (n = 4, sauf pour 30P2 où n = 3) correspondant aux différentes modalités de fertilisation en S ont été rassemblées pour la détermination de la corrélation non linéaire (n = 27, RMCE = 1,688, R^2 = 0,52).

et en protéines des graines, mais va avoir un impact sur la qualité protéique des graines (D'Hooghe *et al.*, 2014).

Dans cette expérimentation, il est observé que la teneur en S des graines augmente avec la dose de fertilisants S apportée (**Figure IV.A.2.2**). La teneur en napines (protéines pauvres en S de 12 kDa) étant très affectée par le traitement limitant en S (S0), nous avons voulu vérifier si la relation obtenue en conditions contrôlées entre le %S et la teneur en napines dans les graines était retrouvée en condition de plein champ (voir **Chapitre IV.A.1**). **De manière très intéressante, ces résultats confirment pour la condition de plein champ la corrélation significative établie en conditions contrôlées entre l'abondance relative en napines et la teneur en S des graines** (R^2 = 0,66 ; **Figure IV.A.2.4**). L'abondance relative en napines dans les graines, qui est elle-même associée à la qualité protéique, pourrait donc être prédite *via* la teneur en S des graines, ceci en conditions contrôlées ou de plein champ. La corrélation établie à Prenois est plus faible qu'en conditions contrôlées (R^2 de 0,66 contre 0,8). Cela peut s'expliquer par le faible nombre d'échantillons et par la diversité des conditions d'apport en S. Malgré le jeu de données limité, le %S dans les graines est significativement différent entre la condition S0, les conditions d'apport à 30 U de S (30P1, 30P2 et 30K2) et à 60 U de S (60P1, 60P2 et 30P1+30P2) (**Figure IV.A.2.2**). La teneur en S des graines correspondant au traitement S0 ne dépasse pas 0,3 %. Cette faible teneur en S des graines a été aussi observée dans le **Chapitre IV.A.1** avec le traitement 0S_HN dont le %S dans les graines n'atteignait pas plus de 0,32 %. Ceci confirme que l'absence de fertilisation S conduit systématiquement à une baisse de la teneur en S dans les graines. **Nos résultats obtenus au champ et en conditions contrôlées indiquent et confirment clairement qu'en dessous d'une teneur en S des graines de 0,32 %, la qualité protéique des graines de colza est fortement affectée** et est associée à la diminution de l'accumulation de protéines de stockage riches en S de la graine, les napines.

L'abondance relative en napines associée au seuil de 0,32 %S est plus élevée pour la culture en champ que pour la culture en conditions contrôlées et représente en moyenne respectivement 24 et 9 % des protéines totales (**Figure IV.A.2.4**). Ceci reflète probablement l'impact du génotype qui détermine en partie la composition de la graine en huile et en protéine mais aussi la composition de la fraction protéique (Gacek *et al.*, 2018). En effet, le génotype Attletick utilisé au champ présente une teneur en huile (50 %) beaucoup plus importante qu'en protéine (19 %) alors que le génotype Aviso utilisé en conditions contrôlées présente une fraction protéique plus élevée (en moyenne 28 %) et une fraction en huile plus faible (39 %, valeurs obtenues par analyses NIRS, non présentées). En prenant en compte ces différences de proportion, le % de napines dans la graine est assez similaire et représente environ 6,3 et 5,3 % de la composition globale de la graine pour les conditions non limitantes en S (respectivement les conditions 30P1 et 30S_HN). Une limitation en S a un effet



<u>Figure IV.A.2.6</u> : Rendement (A), teneur en protéines (B) et teneur en huile (C) des graines de colza tous génotypes confondus en fonction du site de culture pour la campagne d'essai Terres Inovia 2015. Les teneurs en protéines et en huile ont été obtenues par analyses NIRS. Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'écart-type (n = 14). Les lettres indiquent les différences significatives entre les sites ($p < 0,05$).

négatif et entraîne une diminue de l'abondance en napines passant de 3,2 % pour la condition S0 (champ) à 0,7 % pour la condition 0S_HN (conditions contrôlées).

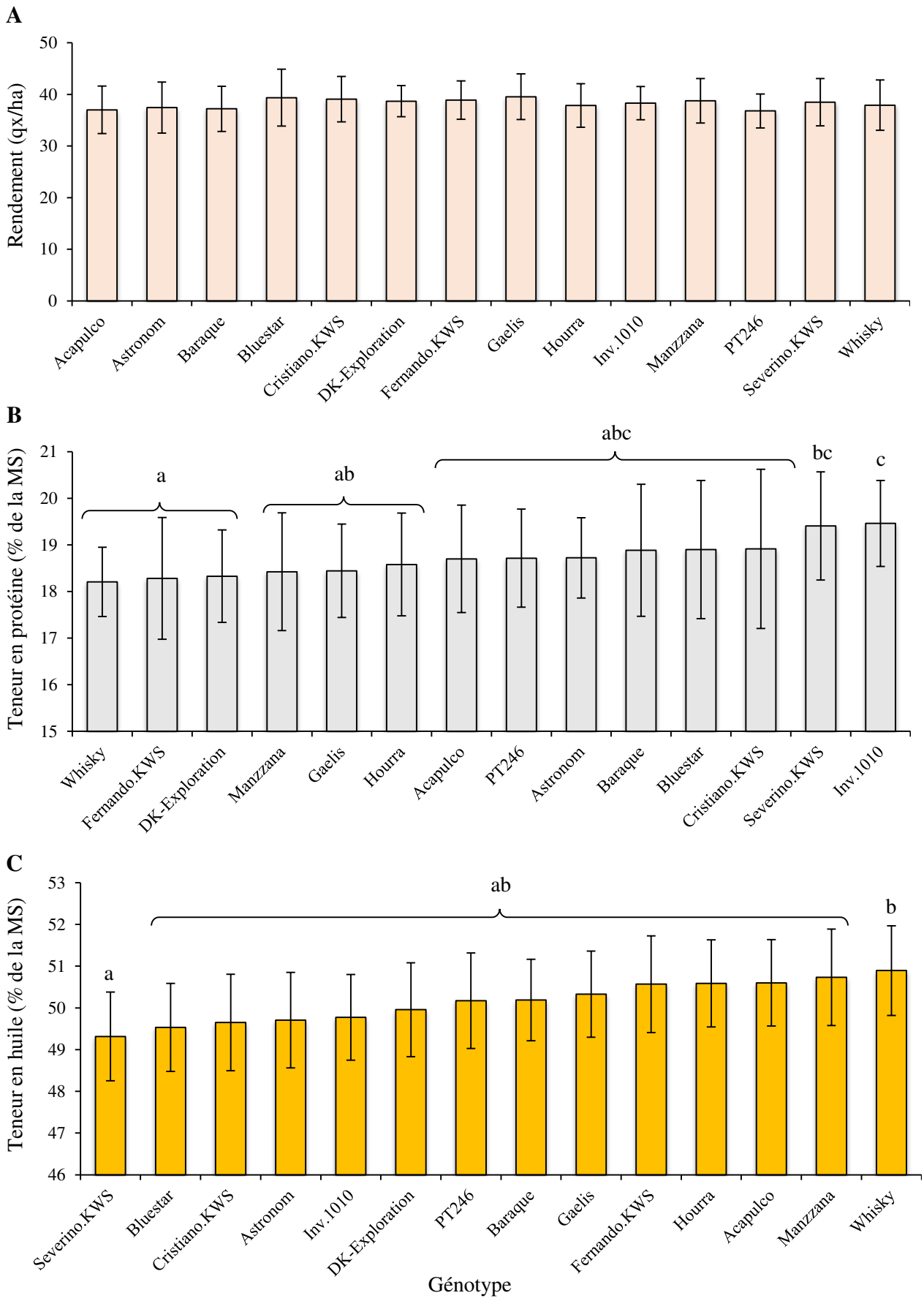
Lors de la culture en conditions contrôlées (**Chapitre IV.A.1**), le ratio [napines:cruciférines 30 kDa] avait été déterminé afin de produire un indice de la qualité protéique des graines de colza intégrant la fertilisation S et N. Lors de la culture en champ, le même niveau de fertilisant N a été apporté pour toutes les conditions (170 U). Cependant, les différentes doses d'apport en S permettent de distinguer différents ratios de fertilisation N:S apportés pour chaque condition. Nous avons alors calculé le ratio [napines:cruciférines 30 kDa] pour chaque condition au champ (**Tableau IV.A.2.2**). Par rapport aux valeurs observées en conditions contrôlées, les ratios au champ sont plus élevés (de 1,6 à 7,8 pour le champ et de 0,5 à 3,3 en serre). Ceci est la conséquence des abondances relatives en cruciférines 30 kDa plus faibles en condition de plein champ (entre 4 et 14 % contre environ 8 et 29 % en conditions contrôlées), probablement dû à l'effet génotype. Au champ, le ratio pour la condition S0 est significativement plus faible que pour les 6 autres conditions (1,6). Le ratio le plus élevé est associé à l'apport fractionné (30P1+30P2). Cependant, pour vérifier la fiabilité de cet indice, il manque dans cet essai au champ des conditions variables d'apport en N afin de positionner un ratio extrême (fertilisations S et N très déséquilibrées). Néanmoins, dans cet essai au champ, une corrélation significative a été établie entre le %S dans les graines et le ratio [napines:cruciférines 30 kDa] ($R^2 = 0,52$; **Figure IV.A.2.5**).

B. Analyses des lots de graines issues des essais Terres Inovia 2015 et 2016

III.B.1 Rendement grainier, teneur en huile, en protéines et en S des graines des essais Terres Inovia 2015

Le rendement grainier ainsi que les teneurs en protéines et en huile obtenues en 2015 par Terres Inovia ont été analysés pour les 6 sites avec 14 génotypes communs (**Figure IV.A.2.6**). Tous génotypes confondus, le rendement grainier varie significativement entre 34,3 $q.ha^{-1}$ et 45,2 $q.ha^{-1}$ respectivement pour les sites de Subdray et Surgères B (**Figure IV.A.2.6-A**), reflétant un effet site marqué. De même, en considérant tous les génotypes, il existe un fort effet site pour les teneurs en protéines et en huile (**Figures IV.A.2.6-B** et **C**).

Ces données ont également été étudiées chez les 14 génotypes tous sites confondus (**Figure IV.A.2.7**). Le rendement grainier n'est pas significativement différent entre les génotypes (**Figure IV.A.2.7-A**) ne montrant pas d'effet génotype sur le rendement grainier. En revanche, tous sites confondus, les teneurs relatives en protéines et en huile présentent des différences significatives



<u>Figure IV.A.2.7</u> : Rendement (A), teneur en protéines (B) et teneur en huile (C) des graines de colza tous sites confondus en fonction du génotype pour la campagne d'essai Terres Inovia 2015. Les teneurs en protéines et en huile ont été obtenues par analyses NIRS. Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'écart-type (n = 6). Les lettres indiquent les différences significatives entre les génotypes ($p < 0,05$).

entre génotypes (**Figure IV.A.2.7-B** et **C**). Par exemple, la variété Inv.1010 présente la teneur protéique la plus élevée (20 %) et la variété Whisky la teneur la plus faible (17 %). La relation inverse est retrouvée pour les teneurs en huile, avec pour le génotype Inv.1010 une diminution de la teneur en huile plus importante que Whisky, confirmant la corrélation négative existant entre la teneur en huile et la teneur en protéines des graines (Rathke *et al*., 2005, 2006).

Tous génotypes confondus, les teneurs en S sont significativement différentes selon le site considéré (**Figure IV.A.2.8**). De plus, on peut remarquer que les sites de En Crambade A (40 U de SO_3) et de En Crambade B (123 U de SO_3) présentent des teneurs en S significativement différentes (**Chapitre III.A** ; **Figure III.A.3**). La plus faible teneur en S est de 0,32 % pour le site de Subdray et la plus élevée de 0,37 % pour le site de En Crambade B (**Figure IV.A.2.8**). Ces résultats traduisent un effet site marqué sur la teneur relative en S des graines.

En considérant l'ensemble des sites, un effet génotype est également observé sur les teneurs en S des graines (**Figure IV.A.2.9**). La plus faible teneur en S est de 0,33 % pour le génotype HOURRA tandis que la plus élevée est de 0,35 % pour le génotype Inv.1010. L'effet génotype semble cependant moins prononcé que l'effet site puisqu'une moins grande amplitude de variation du %S est retrouvée dans les graines.

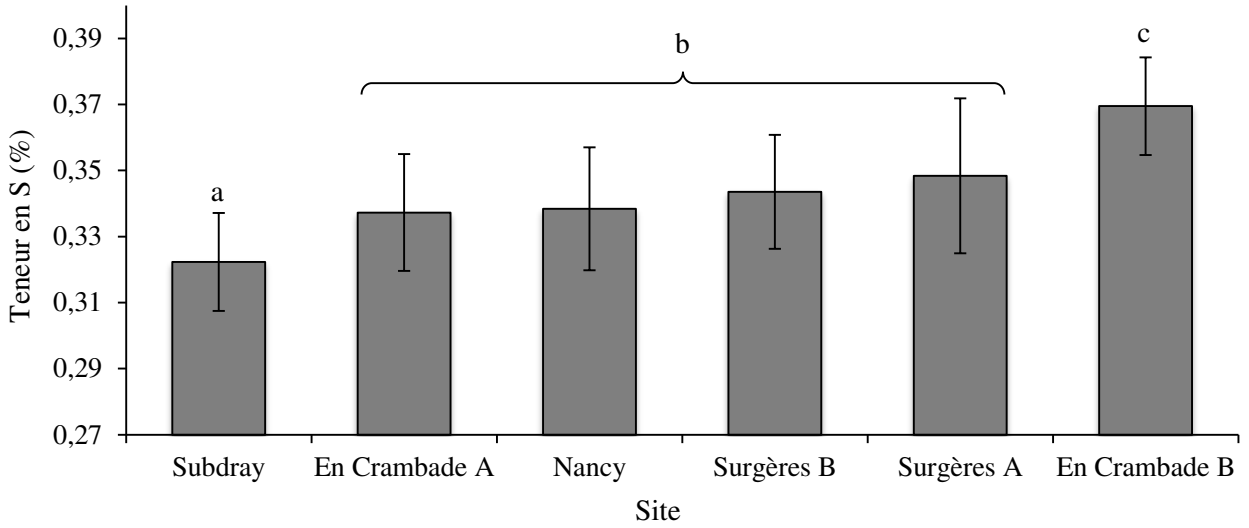
Suite à ces résultats, la même analyse a été reconduite sur les lots de graines des récoltes 2016 afin de vérifier si les effets sites et/ou génotypes sur les teneurs en S des graines sont retrouvés et perceptibles d'une année sur l'autre.

III.B.2 Analyse de la qualité protéique des graines en relation avec la teneur en S des graines de colza sur les essais Terres Inovia 2016

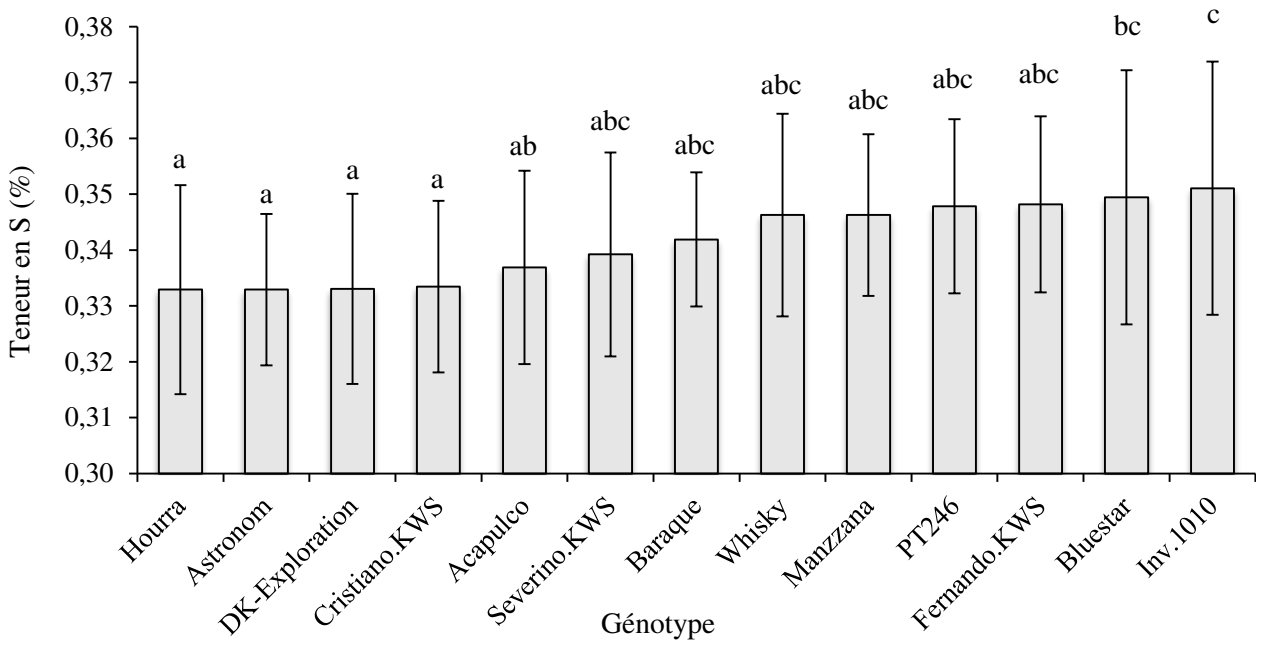
III.B.2.a Teneurs en S dans les graines selon les sites et les génotypes

Les résultats obtenus lors de cette campagne 2016 montrent qu'il existe un effet site sur les teneurs en S (**Figure IV.A.2.10**), plus marqué que pour la campagne 2015 (car plus de sites disponibles). La plus faible teneur en S est associée au site de Subdray B (0,29 %) et la plus élevée au site de Nancy (0,35%). Ces données traduisent une nouvelle fois un effet site marqué. En considérant l'ensemble des sites, un effet génotype est également constaté sur les teneurs en S des graines de colza (**Figure IV.A.2.11**). La teneur en S des graines varie de 0,31 % pour le génotype PT256 à 0,34 % pour le génotype DK-Exstorm. L'effet génotype est moins fort que l'effet site sur le %S dans les graines.

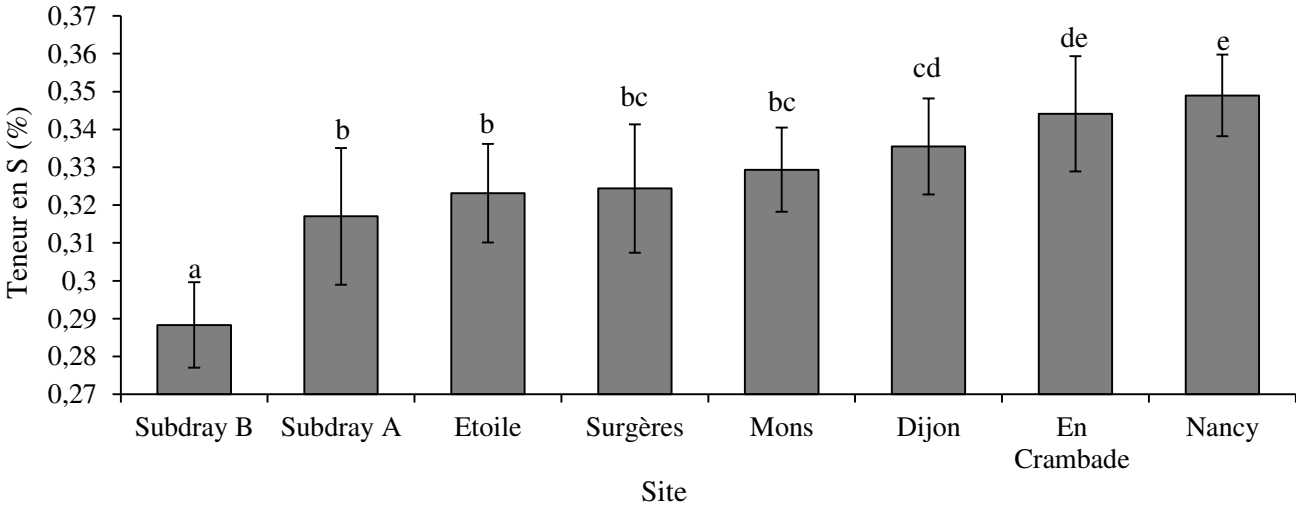
Afin de vérifier l'impact de la teneur en soufre (%S) sur la qualité protéique des graines de colza, des analyses protéomiques ont été réalisées. Nos précédents travaux ayant permis d'observer une diminution de la qualité protéique dans les graines de colza dont la teneur en S était inférieure



<u>Figure IV.A.2.8</u> : Teneur en soufre des graines de colzas tous génotypes confondus en fonction du site de culture pour la campagne d'essai Terres Inovia 2015. Les %S ont été obtenus par mesures XRF. Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'écart-type (n = 14). Les lettres indiquent les différences significatives entre les sites (p < 0,05).



<u>Figure IV.A.2.9</u> : Teneur en soufre des graines de colzas tous sites confondus en fonction du génotype pour la campagne d'essai Terres Inovia 2015. Les %S ont été obtenus par mesures XRF. Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'écart-type (n = 6). Les lettres indiquent les différences significatives entre les génotypes (p < 0,05).



<u>Figure IV.A.2.10</u> : Teneur en soufre des graines de colza tous génotypes confondus en fonction du site de culture pour la campagne d'essai Terres Inovia 2016. Les %S ont été obtenus par mesures XRF. Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'écart-type (n = 8). Les lettres indiquent les différences significatives entre les sites (p < 0,05).

à 0,32 %, nous avons testé l'hypothèse que la qualité protéique des graines des essais au champ de Terres Inovia 2016 pouvait être significativement altérée si la teneur en S des graines était inférieure ou égale à 0,32 %, dû à une variabilité génotypique ou environnementale.

III.B.2.b Qualité protéique des graines sélectionnées

Parmi les lots de graines récoltées en 2016 analysés par XRF, les sites de Subdray B et de Nancy présentent les plus fortes différences de %S : 0,29 % pour Subdray B et 0,35 % pour Nancy, tous génotypes confondus (**Figure IV.A.2.10**). Ces sites ont donc été choisis afin de vérifier notre hypothèse. Associés à ces deux sites, les 2 génotypes PT256 et DK-EXSTORM ont été choisis pour leur différence significative en %S tous sites confondus. Des analyses protéomiques (gels SDS-PAGE) ont été réalisées avec les échantillons correspondants (**Figures IV.A.2.12**)

L'analyse statistique comparative (test-t de Student) des abondances relatives des deux protéines entre les deux génotypes indique qu'il n'existe pas de différence significative en napines et cruciférines 30 kDa entre PT256 et DK-Exstorm pour un site donné (Nancy ou Subdray B). Les deux sites ont été comparés pour les deux génotypes considérés (PT256 et DK-Exstorm). Les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative quant à l'abondance en cruciférines 30 kDa au sein des deux sites pour les deux génotypes (**Figure IV.A.2.13**). En revanche, une différence significative est observée quant à l'abondance en napines (**Figures IV.A.2.13**). En effet, les abondances relatives en napines sont respectivement de 28,5 % (PT256) et 33,8 % (DK-Exstorm) pour le site de Subdray B et de 37,4 % (PT256) et 39,9 % (DK-Exstorm) pour le site de Nancy. L'abondance en napines est donc plus importante dans les graines des deux génotypes cultivés sur le site de Nancy en comparaison de celles observées sur le site de Subdray B soulignant un effet site (**Figure IV.A.2.13**).

III.B.3 Discussion partielle

Pour les deux campagnes d'essais Terres Inovia 2015 et 2016, les mesures de teneurs en S dans les graines reflètent une variabilité significative en fonction du site de culture (tous génotypes confondus) et du génotype cultivé (tous sites confondus) (**Figures IV.A.2.8, 9, 10** et **11**). De plus, des effets site et génotype (effets individuels et non des interactions génotype x site) sont aussi significatifs concernant les teneurs en protéines et en huile pour les lots de graines issus de la campagne de 2015 (les informations relatives à la campagne 2016 n'étant pas disponibles) (**Figures IV.A.2.6** et **7**).

L'effet site observé sur les teneurs en S peut sans doute s'expliquer par différents facteurs : (i) les pratiques culturales qui peuvent impacter les teneurs en S par différents schémas de

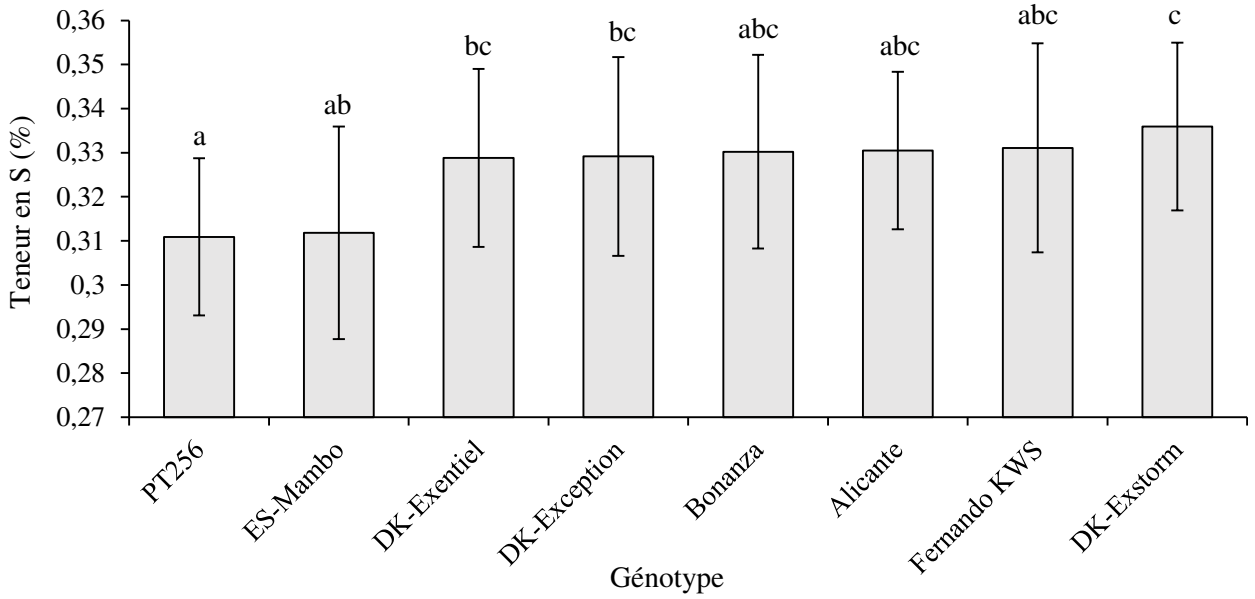


Figure IV.A.2.11 : Teneur en soufre des graines de colza tous sites confondus en fonction du génotype pour la campagne d'essai Terres Inovia 2016. Les %S ont été obtenus par mesures XRF. Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'écart-type (n = 8). Les lettres indiquent les différences significatives entre les génotypes ($p < 0,05$).

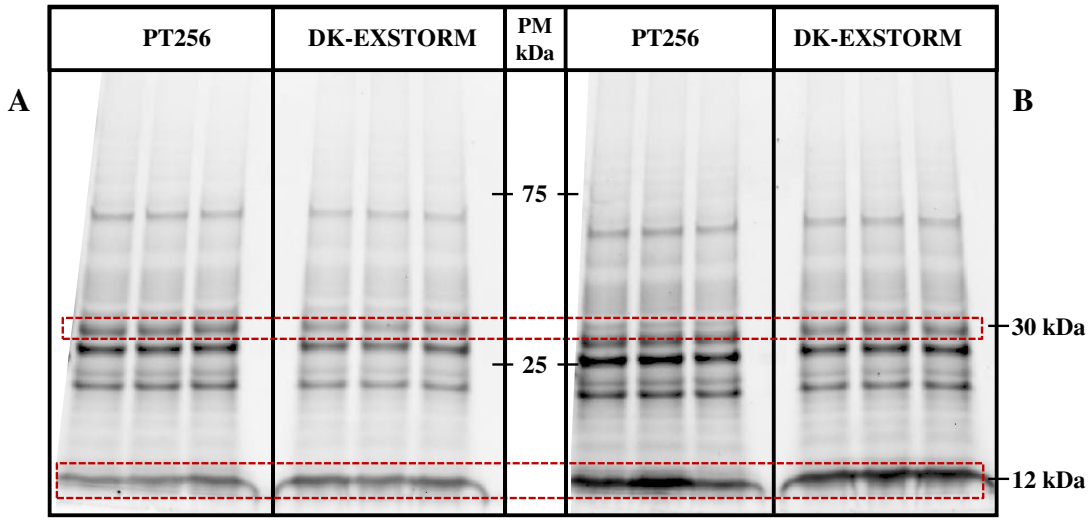


Figure IV.A.2.12 : Gels SDS-PAGE des protéines extraites des graines de colza des génotypes PT256 et DK-EXSTORM du site de Subdray (A) et de Nancy (B) de la campagne d'essais Terres Inovia 2016. Les cadres en pointillés rouges indiquent la localisation des cruciférines à 30 kDa (protéines pauvres en aa soufrés) et des napines à 12 kDa (protéines riches en aa soufrés).

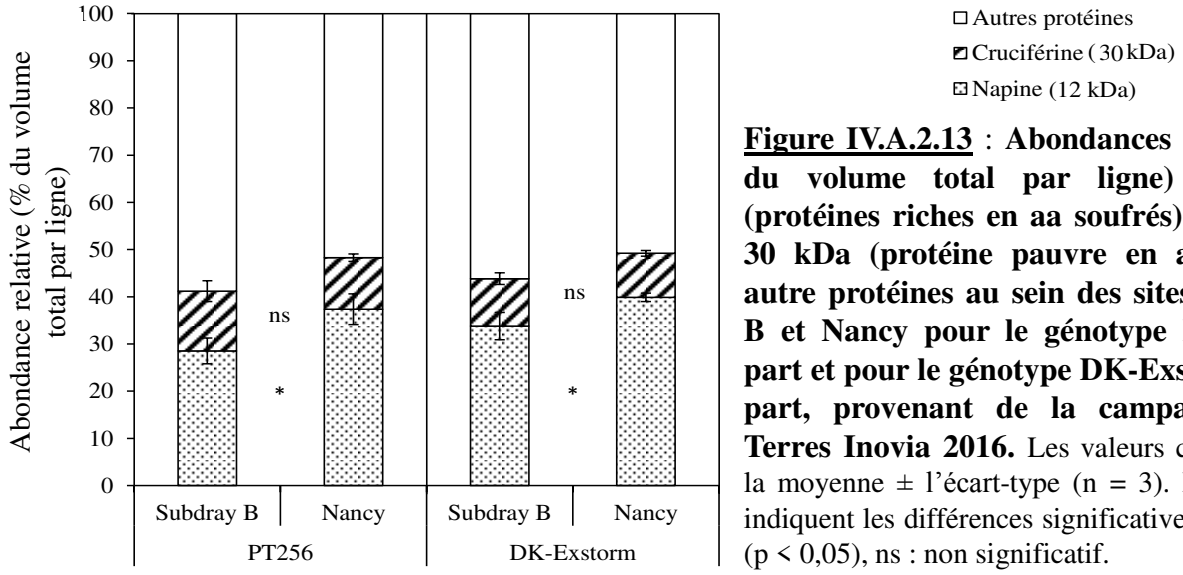


Figure IV.A.2.13 : **Abondances relatives (% du volume total par ligne) en napines (protéines riches en aa soufrés), cruciférines 30 kDa (protéine pauvre en aa soufré) et autre protéines au sein des sites de Subdray B et Nancy pour le génotype PT256 d'une part et pour le génotype DK-Exstorm d'autre part, provenant de la campagne d'essais Terres Inovia 2016.** Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'écart-type (n = 3). Les astérisques indiquent les différences significatives entre les sites ($p < 0,05$), ns : non significatif.

fertilisation soufrée (et même azotée) des parcelles (précédant cultural par exemple), (ii) les conditions et aléas climatiques tels que les intempéries susceptibles de provoquer un lessivage des sols et donc l'appauvrissement de ces derniers en nutriments, (iii) les caractéristiques pédologiques des sites (disponibilité des nutriments différente, variabilité de la minéralisation des sols en lien avec sa microflore bactérienne etc). Pour la campagne 2015, le site ayant reçu l'apport en S le plus important (En Crambade B) correspond au site présentant les plus fortes teneurs en S dans les graines. Même si les informations concernant les conduites pour la campagne 2016 n'étaient pas disponibles, les variations de la teneur en %S dans les graines peuvent tout de même apporter un certain éclairage.

L'effet génotype pourrait s'expliquer par des différences de capacité d'assimilation et d'efficience d'usage du S. En effet, chez le colza, il existe une forte variabilité génotypique de l'efficience d'usage de l'azote (Avice et Etienne, 2014 ; Balint *et al*., 2008 ; Girondé et al., 2015a, 2015b) et du soufre (Balint et Rengel, 2009) pouvant être associées à des différences d'efficiences d'absorption, d'assimilation et/ou de remobilisation de ces éléments vers les graines. **Les teneurs en S des graines de colza présentent donc une variabilité environnementale et génotypique qui peut également se traduire par une altération de la qualité grainière du colza et du rendement.**

Nos précédents travaux conduits sur des lots de graines obtenus en conditions contrôlées et de plein champ (Prenois) nous ont permis de fixer une valeur critique de teneur en S dans les graines à 0,32 %. Si ce seuil n'est pas atteint, la qualité protéique des graines sera affectée. Ce seuil permet aussi de différencier les sites avec un apport de S suffisant afin de produire des graines avec une bonne qualité protéique. Ici, le site de Subdray B de la campagne 2016 semble présenter une carence en S qui ne permet pas d'atteindre le seuil de 0,32 % quel que soit le génotype considéré. A l'inverse, le site de Nancy permet de produire des graines dépassant le seuil de 0,32% (de 0,34 à 0,36 %), montrant une disponibilité suffisante en S. Les analyses protéiques confirment la baisse de la qualité protéique des graines produites sur le site de Subdray B par rapport au site de Nancy ce qui se caractérise par une baisse de l'abondance en napines (**Figure IV.A.2.12** et **13**).

Partie B

Expérimentations numériques *in silico* avec le modèle agro-écophysiologique SuMoToRI

CHAPITRE IV – RÉSULTATS

B. Expérimentations numériques *in silico* avec le modèle écophysiologique SuMoToRI

B.1 Optimisation de la fertilisation soufrée dans un contexte d'augmentation des températures printanières : simulations avec le modèle SuMoToRI sous différents scénarios climatiques

Contexte : L'augmentation des températures projetée par les différents scénarios climatiques d'ici la fin du 21ème siècle pourrait avoir un impact sur les cultures de colza, du fait des interactions entre les facteurs climatiques (température, rayonnement, précipitations, CO_2 atmosphérique, etc) et nutritionnels dont la fertilisation soufrée, indispensable à la culture des Brassicacées. Ces interactions peuvent avoir des répercussions sur le développement du colza et à terme, sur la qualité nutritionnelle des graines. L'utilisation des modèles de culture s'avère dans ce contexte un outil prédictif nécessaire pour anticiper des schémas de fertilisations davantage adaptés aux changements climatiques.

Objectifs : Les objectifs étaient (i) de prédire par une approche de modélisation, les performances des plantes depuis la sortie d'hiver jusqu'au début de formation des siliques (biomasse, quantité de S minéral dans les feuilles, indice de surface foliaire principalement) sous des projections climatiques à l'horizon 2100 (issues des 4 scénarios climatiques RCP du 5e rapport du GIEC) pour 7 localités situées dans l'hémisphère Nord (retenues parmi les principaux pays producteurs de colza d'hiver) et (ii) d'analyser les contraintes induites par les facteurs climatiques considérés dans le modèle SuMoToRI (température et rayonnement) sur les performances de la plante dans des conditions contrastées d'apport en S.

Démarche expérimentale : Dans cette étude, nous avons utilisé le modèle de culture SuMoToRI, qui simule les cinétiques de croissance, d'allocation du S dans les différents compartiments de la plante (feuilles photosynthétiques, feuilles chutées et les autres organes regroupés) et de quantités de S minéral et organique dans ces différents compartiments depuis la fin de la période de repos végétatif (GS30) au début de formation des siliques (GS70). Afin d'estimer l'impact des projections de température et de rayonnement associés à l'horizon 2100, sur la croissance et la gestion du S au sein de la plante, des simulations ont été réalisées pour chaque localité, pour chaque scénario climatique et pour deux niveaux contrastés de disponibilité en S.

Résultats : Les résultats des simulations indiquent une diminution de la biomasse (principalement des feuilles) d'autant plus importante que les températures augmentent et que le rayonnement incident diminue. A l'inverse, les quantités de S minéral des feuilles (principalement du sulfate) tendent à s'accumuler dans les feuilles, en conséquence d'un défaut d'assimilation du fait d'une baisse de production de composés carbonés, et de la réduction de la taille des puits en S (*i.e.* feuilles). Ces simulations ont mis en évidence des risques accrus de surfertilisation en S, pouvant conduire à des problèmes de pollution environnementale telle le lessivage du S (par les pertes de S *via* les feuilles chutées). Cette étude re-questionne les schémas de fertilisation en S et les pratiques agricoles associées pour faire face aux conditions climatiques défavorables attendues.

Article publié dans *European Journal of Agronomy* : **Poisson *et al.*** (2018). SuMoToRI model simulations for optimizing sulphur fertilization in oilseed rape in the context of increased spring temperatures. 97, 28-37. Doi : 10.1016/j.eja.2018.05.001

B.1 SuMoToRI model simulations for optimizing sulphur fertilization in oilseed rape in the context of increased spring temperatures

Poisson E.[1], Mollier A. [2], Trouverie J. [1], Avice J.-C. [1], Brunel-Muguet S.[1]

1. EVA, Normandie Univ, UNICAEN, INRA, 14000, Caen, France

2. ISPA, Bordeaux Sciences Agro, INRA, 33140, Villenave d'Ornon, France

Abstract

For the last few decades, environmental policies have led to drastic reduction in sulphur (S)-containing industrial emissions leading to reduced S inputs into the soil. This is of concern for oilseed rape (*Brassica napus* L.), which like most Brassica species is a high S-demanding crop. In this context, monitoring S fertilization has become a central issue. Moreover, ongoing and projected climate change will affect crop yield and quality worldwide, thus justifying the prediction of climate effects via modelling approaches so that crop management and practices can be adjusted. In this modelling study, the growth and S status of winter oilseed rape (WOSR) were investigated from the end of winter until the onset of pod formation under contrasting S supplies in a range of climatic conditions acquired for seven major WOSR-producing northern countries and under the four Representative Concentration Pathway (RCP) scenarios (i.e. RCP2.6, RCP4.5, RCP6.0, and RCP8.5). Simulations were performed with the process-based model SuMoToRI (*Sulphur Model Towards Rapeseed Improvement*) for past datasets (1948-2005) and projections (2015-2099). Simulation results indicated decreased plant biomass (mainly leaves) as temperatures increased (as expected under the increasingly negative scenarios as the century progresses) and as daily incident radiation decreased in contrast to the mobile S of leaves (mainly sulphate), which tended to accumulate as a consequence of reduced S sink (i.e. leaves) size. These simulations highlighted the increased risks of S over-fertilization, which can lead to environmental issues that mainly comprise S leaching due to high mobile-S in leaves that senesce. Overall, this *in silico* study raises questions about the most suitable S fertilization strategies and associated farming practices for dealing with the expected adverse climatic conditions.

Keywords: crop model, sulphur, oilseed rape, temperature, climate change, simulation.

I. Introduction

Sulphur (S) oligotrophy has become a matter of concern during the last four decades, not only as a consequence of drastic environmental policies aiming to reduce sulphur dioxide in industrial emissions (protocols of Helsinki, 1985; Oslo, 1994; Kyoto, 1997), but also because of the substitution of S-containing nitrogen (N) and phosphorus (P) fertilizers (Scherer, 2001) and of the reduction in S-containing fungicides with alternative compounds that contain no or only small amounts of S (Zhao *et al*., 1999). This has led to reductions in "free" S deposition into the soil, which has negatively impacted arable land (McGrath *et al*., 2002; Scherer, 2001; Schnug *et al*., 1993). This issue has been of concern especially in oilseed rape, the third most important oilseed crop on an oil production basis (FAOSTAT). Like most of the *Brassicaceae*, oilseed rape is a high S-demanding crop whose requirements are up to four times those of wheat (Oenema and Postma, 2003). Oilseed rape is mainly grown for oil (ca. 40% of fatty acids (FAs) on a seed dry matter (DM) basis) used for human consumption and biodiesel® production and for protein-rich meals (ca. 35% of proteins on a seed DM basis) that are the by-products of oil extraction and mainly used for cattle feeding and other industrial derivatives (Von Der Haar *et al.*, 2014). Extended S-limiting periods that occur during early stages were shown to negatively impact yield components (e.g. seed yield, thousand seed weight, pod number), and oil and meal quality characteristics (e.g. fatty acid (FA) content and distribution, protein content and seed storage protein (SSP) composition) (D'Hooghe *et al*., 2014; Dubousset *et al*., 2010). Consequently, S fertilization management has recently gained attention to prevent yield penalties and decreased oil and meal quality. In addition, ongoing and projected climate change will affect crop yield and quality worldwide, thus threatening global food security (Godfray *et al.*, 2010; Sundström *et al*., 2014; Tubiello *et al*., 2007). Interactions between climatic variables such as temperature, radiation, rainfall, elevated CO_2 and fertilization are widely documented, thereby justifying a tight monitoring of fertilization in the context of climate variability (Ross *et al*., 2004; Schneider *et al*., 2004). In oilseed rape, recent work has indicated additional, opposite and interactions effects between increased temperature during the grain filling period and S availability (Brunel-Muguet *et al*., 2015a). This then raises questions about the timing and the amount of S supply that is adequate for optimizing yield and seed quality when the plants are challenged with warmer spring temperatures. For instance, S limitation and heat stress during seed filling have opposite impacts on the total seed FA content (i.e. increase under heat stress vs. decrease under S limitation, respectively) and the S-rich / S-poor protein ratio in seeds (i.e. increase in the ratio under heat stress vs. a decrease in the ratio under S limitation) (Brunel-Muguet *et al*., 2015a). Temperature and S supply interactions were observed for seed yield (total seed biomass), which is

reduced under heat stress and non-limiting S conditions and increased under both stresses. These results underline the importance of considering the effects of S nutrition and increased spring temperatures together.

In the context of increasing climate variability, the impacts of environmental factors and plant nutrition need to be predicted in order to deliver crop fertilization strategies that have a better fit with future climate patterns. Process-based crop models have emerged as relevant tools to simulate plant performance in a wide range of environmental conditions. Most process-based crop models allow quantitative estimation of plant responses to climate related variables (e.g. temperature, radiation, atmospheric CO_2, rainfall) and nutrient availability. The roles of these models have been discussed recently with questions about their efficiency and the need to upgrade their function to better account for climatic variability such as increases in the frequency of extreme events (Challinor *et al*., 2017; Chenu *et al*., 2017; Maiorano *et al*., 2017; Ruane *et al*., 2016; Tubiello *et al*., 2007; Wang *et al*., 2017a).

In this study we used the process-based model SuMoToRI (Sulphur Model Towards Rapeseed Improvement) (Brunel-Muguet *et al*., 2015b), which simulates the dynamics of growth, S allocation among plant compartments (i.e. leaves *in planta*, detached leaves, and the rest of the plant) and S partitioning (i.e. the fraction of mineral vs. organic S) within each plant compartment from the end of the vegetative rest period until the onset of pod formation. Predictions of the mineral S pool (mobile) in the leaves at this stage were used as an indicator of the potential for S remobilization towards pods and seeds. Our objectives were twofold. The first aim was to predict plant performance under two contrasting S supplies i.e. High Sulphur availability (HS) and Low Sulphur availability (LS) under a wide range of environmental conditions across seven locations distributed across the northern hemisphere and under four climatic scenarios that followed assessments by the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (IPCC, 2014). Secondly, we aimed to unravel the impact on plant performance at the onset of the reproductive phase of the three environmental factors captured in the model i.e. temperature, incident radiation (associated with climate change, and thus variable according to location and climatic scenario) and plant S availability. Ultimately, these simulations aimed to give insights into S fertilization strategies and varieties that will be better adapted to climatic change during the course of this century.

<u>Table IV.B.1.1</u> : Climatic characteristics of the seven locations distributed across the northern hemisphere. Minimal (Tmin_year), maximal (Tmax_year) and mean temperature (Tmean_year) correspond to the annual mean daily minimal, maximal and mean temperatures respectively (in °C). Incident PAR (PARi_year) corresponds to the mean daily incident PAR (in $MJ.m^{-2}$). Historical values are given for 1948-2005 and values for the 4 RCPs are given for 2015-2099.

Location		Chillicothe	Lincoln	Crawley	Dijon	Hurva	Ternopil	Xianning
Country/State		USA/Texas	USA/ Nebraska	United Kingdom	France	Sweden	Ukraine	China
GPS coordinates		34°15' N 99°31' W	40°49' N 96°41'W	51°6' N 0°11' W	48°51'N 2°17'E	55°47'N 13°26'W	49°33'N 25°35'E	29°50'N 114°19'W
Tmin_year	Historical	10	4.4	5.7	6.2	4.2	2.8	13.3
	RCP2.6	11.6	6.1	6.2	7.2	5.7	4.4	14.6
	RCP4.5	12.2	6.8	6.6	7.8	6.3	5.8	15.2
	RCP6.0	12.3	6.9	6.5	7.8	6.2	6.2	15.1
	RCP8.5	13.4	8.2	7.0	8.6	6.8	7.6	16.3
Tmax_year	Historical	24.6	17.4	13.5	14.9	11.1	11.9	21.3
	RCP2.6	26.2	18.9	14.2	16.4	12.8	13.6	23.3
	RCP4.5	26.9	19.5	14.6	17.1	13.4	15.3	23.9
	RCP6.0	27.1	19.8	14.5	17.1	13.3	15.7	23.6
	RCP8.5	28.3	21	15.1	18.2	14	17.3	24.8
Tmean_year	Historical	17.3	10.9	9.6	10.5	7.6	7.35	17.6
	RCP2.6	18.9	12.5	10.2	11.8	9.2	9	18.9
	RCP4.5	19.5	13.1	10.6	12.4	9.8	10.5	19.5
	RCP6.0	19.7	13.3	10.5	12.4	9.7	10.9	19.4
	RCP8.5	20.8	14.6	11	13.4	10.4	12.4	20.6
PARi_year	Historical	18.3	15.5	10.7	12.3	9.9	10.8	13.1
	RCP2.6	18.5	15.5	10.5	12.2	9.3	10.3	9.9
	RCP4.5	18.4	15.4	10.6	12.3	9.3	10.5	9.9
	RCP6.0	18.4	15.5	10.5	12.2	9.3	10.5	10
	RCP8.5	18.4	15.4	10.5	12.3	9.2	10.4	10.2

II. Material and methods

II.1 Description of the SuMoToRI crop model

Briefly, the process-based model SuMoToRI (Brunel-Muguet *et al.*, 2015b) predicts the dynamics of the Leaf Area Index (LAI), biomass, and the amounts of organic and mineral S in three plant compartments i.e. leaves *in planta* (described as a single big leaf (BL)), detached leaves and the rest of the plant (i.e. stems, flowers, young pods, the roots and taproot), from the end of the vegetative rest period until the onset of pod formation (GS70, Lancashire *et al.* 1991). Outputs are driven by the three environmental factors considered within the model on a daily time step i.e. temperature, incident radiation and the amount of S taken up.

The original features of the model rely on (i) the determination of the S requirements used for growth (structural and metabolic functions) through critical S dilution curves determined for the leaves *in planta* and the rest of the plant and (ii) the estimation of a mobile pool of S (i.e. the mineral S compounds, mainly sulphates) that is regenerated by daily S uptake and remobilization from senescing leaves before they detach. Because leaves are the main storage organs and sulphate is the main S-storage form during the vegetative phase, the prediction of S mineral content in leaves allows determination of the potential for S remobilization towards growing sinks (i.e. pods and seeds) as a proxy of the plant's ability to satisfy S requirements throughout the reproductive phase. The model is run on a daily time step with a limited number of plant parameters, most with generic values irrespective of the plant S availability. These parameters refer to the potential leaf growth, carbon (C) plant offer and C demand by the leaves, as well as S allocation (among compartments) and partitioning (organic vs. mineral) (Brunel-Muguet *et al.*, 2015b). The two contrasting S supplies refer to values that were used to calibrate the model (Brunel-Muguet *et al.* 2015b). The high and low S supplies account for 120 and 20 units of S, respectively, which were provided at the bolting stage at the end of winter (Terres Inovia, http://www.terresinovia.fr/colza/cultiver-du-colza/fertilisation/soufre/).

II.2 Data Sources and Simulation Analysis Design

II.2.a Selection of locations

Seven locations in oilseed rape-producing countries were selected in the northern hemisphere in order to have a wide range of climatic datasets (mainly temperature and radiation, which are both considered in the model) and the same cultivated oilseed rape type i.e. winter varieties (winter oilseed rape, WOSR, **Table IV.B.1.1**). These localities are the following: Chillicothe and Lincoln

(34°15'N, 99°21'W and 40°49'N, 96°41'W respectively, USA), Crawley (51°6'N, 0°11'W, United Kingdom), Dijon (48°51'N, 2°17'E, France), Hurva (55°79', 5°04'E, Sweden), Ternopil (49°33'N, 25°35'E, Ukraine) and Xianning (29°50'N, 114°19'E, China). These locations are characterized by contrasting annual daily mean temperature (Tmean_year), annual mean daily minimum and daily maximum temperatures (Tmin_year and Tmax_year), and annual mean daily incident photosynthetically active radiation (PARi_year) as reported during the past and predicted under projected climatic scenarios (**Table IV.B.1.1** and **Figures III.B.2** and **3**).

II.2.b Description of the Climatic Scenarios and Simulation Periods

In this study, we aimed to estimate the impacts of the evolution of temperature and radiation on WOSR growth in each selected location and according to projected scenarios. Climatic scenarios for future emissions of major gases and aerosols have been generated for assessments by the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC, 2014). The climatic scenarios represent various development pathways based on well-defined assumptions (van Vuuren *et al*., 2011). The scenarios are used to calculate future changes in climate, and are then archived in the Coupled Model Intercomparison Project (CMIP). In the fifth version of CMIP (CMIP5), four new scenarios, referred to as Representative Concentration Pathways (RCPs) have been developed. The four RCPs (RCP2.6, RCP4.5, RCP6.0, and RCP8.5) (Inman, 2011) are named after an expected range of radiative forcing values in the year 2100 relative to pre-industrial values (+2.6, +4.5, +6.0, and +8.5 W/m2, respectively). RCPs are a set of standards mainly used by climate modellers and provide a common, agreed reference for modelling climate change around the world. These four RCPs were used under one of the general circulation models (GCMs): IPSL-CM5a_mr from CMIP5 (Belda *et al*., 2015; Dufresne *et al*., 2013). Raw climate model outputs were calibrated by the Bias-Correction (with variability) method (BC) (Hawkins *et al*., 2013) using the Princeton observational dataset (Sheffield *et al*., 2006). The BC approach corrects the projected raw daily GCM output using the differences in the mean and variability between the GCM and observations in a reference period. The daily data is shifted by the mean bias in the reference period, taking into account the temporal variability of the model output in accordance with the observations. Princeton is a meteorological forcing dataset constructed by combining a suite of global observation-based datasets with the NCEP/NCAR reanalysis. The dataset is available at 0.25 degree of resolution for 1948-2008. For the purpose of the simulations, we extracted daily average temperature and solar radiation from the CCAFS-Climate portal (http://ccafs-climate.org/data_bias_correction/) for the four scenarios from 2015 to 2099 and for a past period from 1948 to 2005, for each location. Increased annual mean temperatures over the coming decades are generally observed, whatever the location, and are even

<u>Supplemental data Table IV.B.1.A</u> : Plant parameter values and initial state values under HS and LS conditions used for simulations (from Brunel-Muguet *et al*. 2015b).

Symbol	Definition	HS	LS	Unit
PAR interception				
k	PAR extinction coefficient	k=0.75		$m^2\ m^{-2}$
Potential leaf growth				
LA_0	Initial leaf area of photosynthetic leaves	0.016	0.013	mg S plant^{-1}
LA_{max}	Leaf area expansion parameters	LA_{max}=0.20		m² plant^{-1}
K		K=872.96		°Cd^{-1}
n		n=6.31		dimensionless
C acquisition and plant offer				
$PARabs_{ini}$	Initial absorbed PAR	0		MJ m^{-2}
TDW_{ini}	Initial total dry weight	0.652	0.428	g DW plant^{-1}
$DW_{FL\ ini}$	Initial dry weight of fallen leaves	0		g DW plant^{-1}
RUE	Radiation use efficiency	4.59	3.11	g DW MJ^{-1}
$aLDW_{FL}$	Parameters of the function describing the time	0.0092		g DW plant^{-1} °Cd^{-1}
$bLDW_{FL}$	progression of LDW_{FL}	0.0043		dimensionless
C allocation to leaves				
β	Coefficient of DW allocation to the leaves	0.41		dimensionless
C demand of green leaves				
$LDW_{GL\ ini}$	Initial dry weight of green leaves	0.510	0.328	g DW plant^{-1}
SLA	Specific leaf area	0.028		m² g DW^{-1}
Growth S Demand				
α_{GL}	Parameters to estimate critical S content in GL	5.11		mg S plant^{-1}
β_{GL}	as a function of LDW_{GL}	-0.52		dimensionless
		For LS: threshold value $[S]_{GL}crit$ = 3 mg S g DW^{-1} for LDW_{GL}< 3 g plant^{-1}		
α_{rest}	Parameters to estimate critical S content in the	1.83		mg S plant^{-1}
β_{rest}	rest of the plant as a function of DW_{rest}	-0.004		dimensionless
Potential mobile S allocation to leaves				
ε_{pot}	Coefficient of potential repartition of mobile S to the leaves	0.8		dimensionless
S uptake				
$QS_{TOT\ ini}$	Total initial S uptake	8.799	2.865	mg S plant^{-1}
aQS	Parameters of the function describing QS as a	7.540	3.14	mg S plant^{-1}
bQS	function of TT	0.0033	0.0021	°Cd^{-1}
QS_{GLini}	Initial S in the green leaves	7.479	2.4	mg S plant^{-1}
$QS_{rest\ ini}$	Initial S in the rest of the plant	1.319	0.465	mg S plant^{-1}

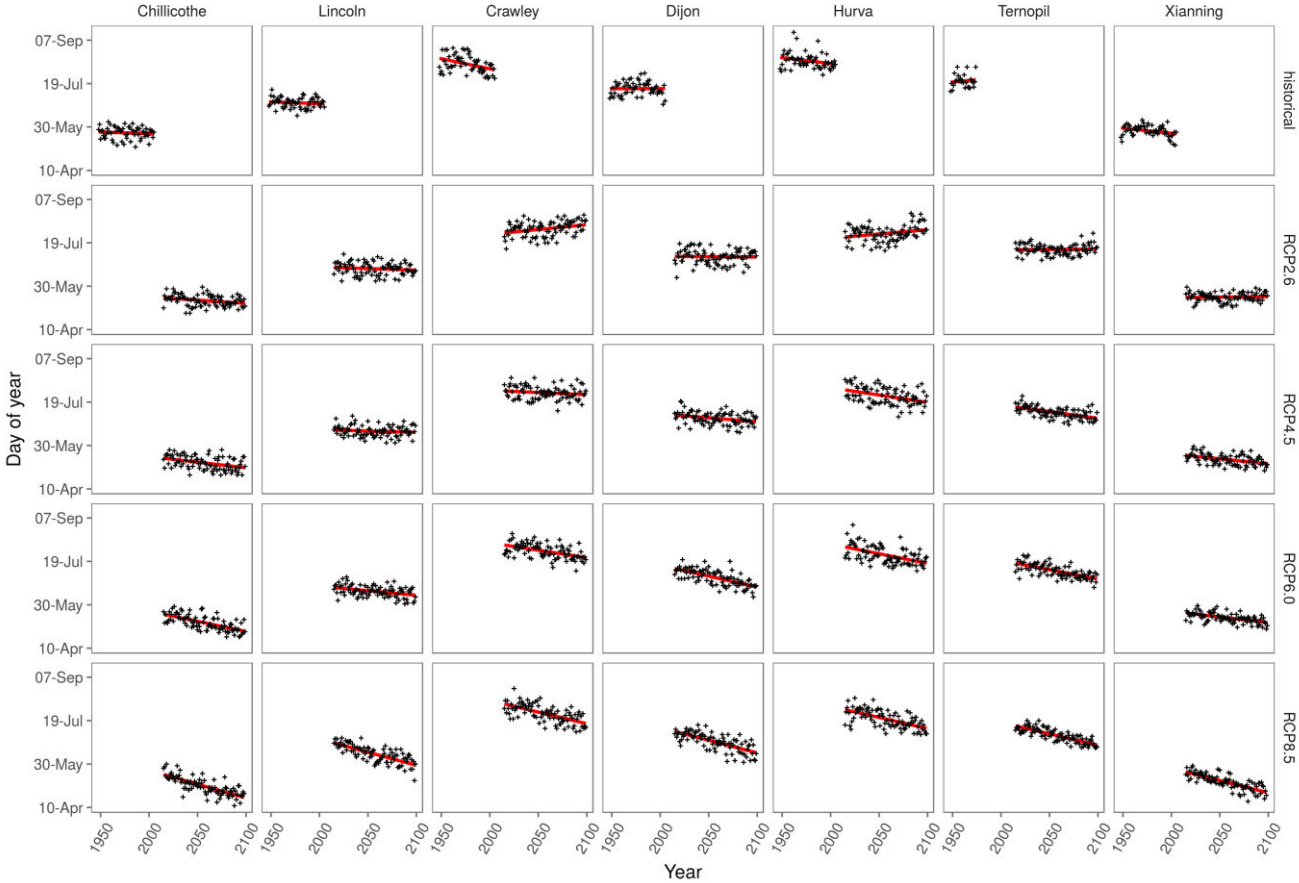
more pronounced under the most pessimistic scenarios (i.e. in gradual ranking: RCP2.6<RCP4.5<RCP6.0< RCP8.5; **Figure II.B.3**). For each location and each S supply condition, we performed simulations with climatic datasets for the past period (named "historical") and with projected climatic datasets under the four RCPs (i.e. 5502 simulations in total).

II.2.c Initialization of the model

In the model, the predictive period encompasses the stem elongation stage (GS30), which occurs at the end of winter until the onset of pod formation (GS70) (Lancashire *et al.*, 1991). In order to initialize the model, prior determination of the date of the end of winter (EndW i.e. date of initialization of the model) was defined based on two criteria that deal with (i) the photoperiod (i.e. minimum daytime of 10.5 hours) and (ii) temperature rules (i.e. at least 7 consecutive days above 8°C). These criteria were determined based on observations of the dates of the EndW in two locations i.e. Saint-Martin-de-Hinx (43°34'N, 1°16'W, France) and Mont-en-Chaussée (49°52'N, 3°00'E, France), from 1950 to 2005 (data collected in the DRIAS portal, http://www.drias-climat.fr/). The criteria were adapted to match the usual period of regrowth, which is the time that S fertilizer is applied to the crop (Terres Inovia, http://www.terresinovia.fr/colza/cultiver-du-colza/fertilisation/soufre/). These EndW dates, expressed as calendar dates, differ for both southern and northern locations in the northern hemisphere, and this supports the importance of generalized criteria for determining the EndW date, regardless of the location. Therefore for each year (1948 to 2005 for the past period and 2015 to 2099 for the projected datasets) and each location, the EndW date was determined according to these criteria. With regard to the other initial state values, namely the leaf area (LA_{ini}), total and leaf dry weight (TDW_{ini}, LDW_{ini}), absorbed PAR ($PARabs_{ini}$), whole plant S taken up ($QStot_{ini}$) and the S amount in the leaves ($QSleaves_{ini}$), we used the respective values of the model parameterization under the HS and LS conditions (Brunel-Muguet *et al*. 2015b, Supplemental data Table A). The simulations were performed with a single set of parameter values for HS and LS conditions obtained after model calibration, except for the Radiation Use Efficiency (RUE) values, which differ according to S availability (Brunel-Muguet *et al*. 2015b, **Supplemental data Table IV.B.1.A**).

II.2.d Model outputs and statistical analyses

The Simulated End Date (SED) refers to the day of the year number when the plant reaches a cumulative thermal time (TT) of 950-970°Cd after the end of winter, which is the TT requirement for the onset of pod formation (GS70) (calibrated according to Brunel-Muguet *et al*. 2015b). The SED indicates to what extent the onset of pod formation (GS70) is early according to the temperature, radiation and the S-related processes within the model. A single factor ANOVA was



<u>Figure IV.B.1.1</u> : Representation of the simulated end dates (SEDs) as a function of year under the historical dataset (1948-2005) and each scenario (RCP2.6, RCP4.5, RCP6.0, and RCP8.5) from 2015 to 2099 for each location (Chillicothe, Lincoln, Crawley, Dijon, Hurva, Ternopil and Xianning). The SEDs are expressed as the day number of the year. Lines represent the linear regressions.

performed to test the effects of location or scenario on the SED for each scenario or for each location, respectively (STATGRAPHICS Centurion XVI.II Software). The difference in slope values of the linear regressions among localities and scenarios was tested with multiple regression analysis with a 95% confidence level (STATGRAPHICS Centurion XVI.II Software). The other main model outputs presented are the total and leaf dry weight (TDW, LDW), the leaf area index (LAI) and the amount of mobile S in the green leaves (QSmobile.GL) at the end of the simulation period (950-970°Cd after the end of winter). A single factor ANOVA was performed to test the location or the scenario effect on the SED, TDW, LDW, LAI and QS.mobile.GL for each scenario or for each location respectively. Multiple comparison tests (LSD, 95% confidence level) were also performed to rank the locations based on the mean variables value for all scenarios gathered. Heat maps were generated with the R package ggplot from the R language environment for statistical computing, version 3.3.2 (R core team, 2013).

III. Results

III.1 Simulated End Dates

Figure IV.B.1.1 displays the SED as a function of the year for each location (Chillicothe, Lincoln, Crawley, Dijon, Hurva, Ternopil and Xianning) and under each scenario (RCP2.6, RCP4.5, RCP6.0, and RCP8.5, from 2015 to 2099) and the historical dataset (from 1948 to 2005). **Table IV.B.1.2** gives the SED (expressed as the day number of the year), and the slopes and coefficients of determination (R^2) of the linear regressions (day number as a function of year), which indicate the earliness trends and the inter-annual variability, respectively. Regarding the SED, a significant location effect was observed with similar rankings under each scenario (**Table IV.B.1.2**). Three location groups can be distinguished (data not shown): Chillicothe and Xianning with early SEDs (mid-spring with day of year ranging between 125 and 146), Lincoln, Dijon and Ternopil with intermediate SEDs (late spring-early summer with day of year ranging between 161 and 203) and Hurva and Crawley with late SEDs (mid-summer with day of year ranging between 202 and 226) according to the scenarios. A significant scenario effect was also observed for each location with a decrease in SED along with a significant increase in the scenario intensity (in a gradual ranking RCP2.6< RCP4.5< RCP6.0< RCP8.5). The slope values were most often negative (except for Crawley, Hurva, Ternopil and Xianning under RCP2.6), which meant that the day number of the year reached 950-970°Cd earlier with the increases in daily mean temperature projected under each scenario and for each location (**Figures III.B.2**). A location effect was observed as expected under RCP8.5, which is the most pessimistic scenario, while a highly significant scenario effect was

<u>Table IV.B.1.2</u> : Mean simulated end date (SED, expressed as the day number of the year), Slope, y-intercept and coefficient of determination of the linear regression between the year and the day number to reach the SED, for each location and scenario (average calculated over years). The mean day number was calculated over 1948-2005 for the historical dataset and over 2015-2099 for RCP2.6, RCP4.5, RCP6.0 and RCP8.5. The significance of the difference between the day number, the slopes and the y-intercepts were tested among locations for a given scenario and among scenarios (excluding the historical dataset) for a given location. Levels of significance: ns non-significant, * *p<0.05*, ***p< 0.01*, *** *p<0.001*.

Location	Chillicothe	Lincoln	Crawley	Dijon	Hurva	Ternopil	Xianning	
Scenario				SED (day number)				Location effect
Historical	143	178	222	194	226	203	146	***
RCP2.6	133	170	216	184	211	192	138	***
RCP4.5	130	166	211	181	207	188	134	***
RCP6.0	129	165	212	181	207	189	135	***
RCP8.5	125	161	208	175	202	183	129	***
Scenario effect	***	***	***	***	***	***	***	
Scenario				Slope *y-intercept*				Location effect
Historical	-0.04 *213*	-0.04 *262*	-0.23 *682*	0.00 *193*	-0.14 *495*	0.11 *-5*	-0.11 *373*	ns ***
RCP2.6	-0.08 *288*	-0.04 *245*	0.11 *-16*	-0.01 *200*	0.10 *3*	0.01 *176*	0.01 *111*	*** ***
RCP4.5	-0.13 *397*	-0.03 *233*	-0.05 *311*	-0.09 *369*	-0.17 *553*	-0.15 *501*	-0.11 *370*	* ***
RCP6.0	-0.23 *609*	-0.11 *382*	-0.17 *566*	-0.25 *702*	-0.22 *606*	-0.21 *630*	-0.13 *407*	** ***
RCP8.5	-0.32 *776*	-0.30 *788*	-0.27 *757*	-0.29 *772*	-0.26 *729*	-0.26 *718*	-0.28 *711*	ns ***
Scenario effect	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***	
Scenario				R^2				
Historical	0.01	0.01	0.15	0.00	0.06	0.01	0.10	
RCP2.6	0.08	0.02	0.10	0.00	0.07	0.00	0.00	
RCP4.5	0.17	0.02	0.02	0.10	0.17	0.33	0.20	
RCP6.0	0.44	0.15	0.25	0.45	0.27	0.45	0.32	
RCP8.5	0.57	0.55	0.40	0.48	0.38	0.64	0.59	

observed for each location (**Table IV.B.1.2**). Whatever the location, the slope value increased when the scenario became more pessimistic. This trend points out the reduction in the number of days required to reach the onset of pod formation according to the scenario's intensity. Complementary to the earliness trends given by the SEDs and slope values, the coefficient of determination indicated the extent of the inter-annual variability in SED i.e. the lower the value, the higher the variability across years. The inter-annual variability tended to decrease (i.e. a higher value in R^2) under the most pessimistic scenarios with the highest R^2 value being under RCP8.5 followed by RCP6.0, RCP4.5 and RCP2.6, for a given location (**Table IV.B.1.2**). When comparing locations, the highest R^2 values were observed for Ternopil, Xianning, and Chillicothe, especially under RCP8.5, RCP6.0 and RCP4.5, meaning that the inter-annual variability in SED in these locations was lower than in the others, which is even more pronounced with pessimistic scenarios.

III.2 Plant performances at the onset of pod formation

The main plant performance outputs are related to growth (i.e. TDW, LDW in g/plant) and the potential for S remobilization using mobile S in the green leaves (QSmobile.GL in mg/plant) as a proxy at the onset of pod formation. In the model we made the assumption that the accumulation of mobile S in the leaves before and throughout the reproductive phase drives the capacity of the plant to further provide S to newly grown sinks i.e. pods. Here, we only report TDW (and not LDW because the results are very close to LAI), LAI and QS.mobile.GL simulated at the SED (which is 950-970°Cd after the end of winter) to illustrate the plant performance in terms of growth and S storage and remobilization capacity at the onset of pod formation.

III.3 Biomass simulations and leaf area expansion

Figure IV.B.2-A and **Tables IV.B.1.3** and **4** present TDW values at the SED under the four scenarios and the past dataset for each location, under HS and LS. As expected higher values were observed in HS than in LS (*ca.* 50% higher), whichever scenario or location was considered. Under both S conditions, TDW tends to decline over the simulated years (**Figure IV.B.2-A**). Under HS, when comparing locations, three groups can be distinguished (data not shown): {Crawley and Dijon} with the highest values ranging from 163.9 to 188.5 mg/plant, Chillicothe, Lincoln, Hurva and Ternopil ranging from 132.3 to 157.2 mg/plant and Xianning ranging from 66.8 to 71.9 mg/plant for all the scenarios (**Tables IV.B.1.3**). The same location ranking was observed under LS with Crawley and Dijon ranging from 81.8 to 85.7 mg/plant, Chillicothe, Lincoln, Hurva and Ternopil ranging from 65.7 to 78.8 mg/plant and Xianning ranging from 34.1 to 36.8 mg/plant for all scenarios (**Tables IV.B.1.4**). For both S conditions, a scenario effect was observed with lower TDW

<u>Table IV.B.1.3</u> : Simulated output values at the SED under HS conditions. Values are the mean of TDW, LAI and $QS_{mobile.GL}$ across the years for a given location and a given scenario. Significance was tested among locations for a given scenario and among scenarios (excluding the historical dataset) for a given location. Levels of significance: ns non-significant, * p<0.05, **p< 0.01, *** p<0.001.

Location Scenario	Chillicothe	Lincoln	Crawley	Dijon	Hurva	Ternopil	Xianning	
				TDW ($g.plant^{-1}$)				Location effect
Historical	162.4	153.5	188.5	180.1	172.9	157.2	98.1	***
RCP2.6	157.2	148.5	171.5	173.2	149.2	140.2	66.8	***
RCP4.5	154.0	146.7	168.3	167.3	146.3	135.5	69.2	***
RCP6.0	151.3	145.8	168.9	169.2	147.0	137.9	71.6	***
RCP8.5	146.9	141.9	165.7	163.9	144.8	132.3	71.9	***
Scenario effect	***	**	***	***	*	***	***	
				LAI ($m^2.m^{-2}$)				Location effect
Historical	7.192	7.194	7.174	7.183	7.177	7.182	7.193	***
RCP2.6	7.192	7.196	7.178	7.187	7.183	7.187	7.196	***
RCP4.5	7.194	7.194	7.179	7.188	7.185	7.189	7.192	***
RCP6.0	7.194	7.195	7.179	7.187	7.184	7.189	7.194	***
RCP8.5	7.196	7.196	7.181	7.191	7.184	7.191	7.195	***
Scenario effect	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	
				$QS_{mobile.GL}$ (mg $S.plant^{-1}$)				Location effect
Historical	5.37	5.67	3.09	3.58	5.76	4.64	18.38	***
RCP2.6	7.05	7.78	5.29	6.45	10.71	10.31	32.68	***
RCP4.5	8.19	9.20	6.58	6.86	11.86	12.65	32.57	***
RCP6.0	7.84	9.22	6.60	6.47	12.27	11.94	29.95	***
RCP8.5	8.48	9.70	6.60	7.60	11.10	13.67	29.19	***
Scenario effect	*	***	***	*	**	***	***	

because the scenario is more pessimistic, mainly in Chillicothe and Dijon under HS and Chillicothe and Ternopil under LS but not for Xianning, which displays higher TDW along with more pessimistic scenarios.

With regards to LAI, a location effect was also observed but with different location rankings compared to TDW (**Figure IV.B.2-B** and **C**, **Tables IV.B.1.3** and **4**). Under HS, LAI ranged from 7.192 to 7.196 m²/m² for Lincoln, Xianning and Chillicothe, from 7.182 to 7.191 m²/m² for Dijon and Ternopil and from 7.174 to 7.184 m²/m² for Hurva and Crawley, for all the scenarios (**Tables IV.B.1.3**). Under LS, values were *ca.* 30% lower than in HS with different location rankings: Chillicothe and Crawley ranging from 5.379 to 5427 m²/m², Lincoln, Hurva, Ternopil and Dijon ranging from 5.366 to 5.415 m²/m² and Xianning ranging from 5.351 to 5.425 m²/m², for all the scenarios (**Tables IV.B.1.4**). The same location trends were observed for LDW with lower values under HS and LS (*ca.* 30% lower) and similar location rankings to those for LDW under HS and LS, respectively (data not shown). LDW and LAI values also decreased over years. However, in contrast to TDW, no significant differences between scenarios were observed for a given location except for Dijon under HS and Chillicothe under LS (**Tables IV.B.1.3** and **4**).

III.4 S allocation and partitioning simulations

The amount of mobile S in the green leaves (QS.mobile.GL) is displayed in **Figure IV.B.2-C** and **Tables IV.B.1.3** and **4**. As expected, highly significant differences were observed between S conditions, with values *ca.* 90% lower in LS than in HS for all the locations and scenarios except for Xianning, which displayed values *ca.* 100% lower in LS than in HS (**Tables IV.B.1.3** and **4**). Similar to biomass performance, QS.mobile.GL values tended to decline over the simulated years (**Figure IV.B.2-C**).

When comparing locations, each location had significantly different values from the others under HS, with Xianning having the highest values (29.19-32.68 mg S-SO_4/plant) while they can be clustered into three groups under LS: Chillicothe, Lincoln and Ternopil ranging from 0.41 to 0.45 mg S-SO_4/plant, Dijon, Hurva and Crawley ranging from 0.37 to 0.40 mg S-SO_4/plant and Xianning ranging from 0.33 to 0.37 mg S-SO_4/plant, for all the scenarios. The scenario effect was only observed under HS, with a significant increase in QS.mobile.GL being observed for all the locations along with a significant increase in the scenario intensity, except for the case of Xianning, which displayed higher values (**Tables IV.B.1.3** and **4**).

<u>Table IV.B.1.4</u> : Simulated output values at the SED under LS conditions. Values are the mean of TDW, LAI and $QS_{mobile.GL}$ across the years for a given location and a given scenario. Significance was tested among locations for a given scenario and among scenarios (excluding the historical dataset) for a given location. Levels of significance: ns non-significant, *: p<0.05, **: p< 0.01, ***: p<0.001.

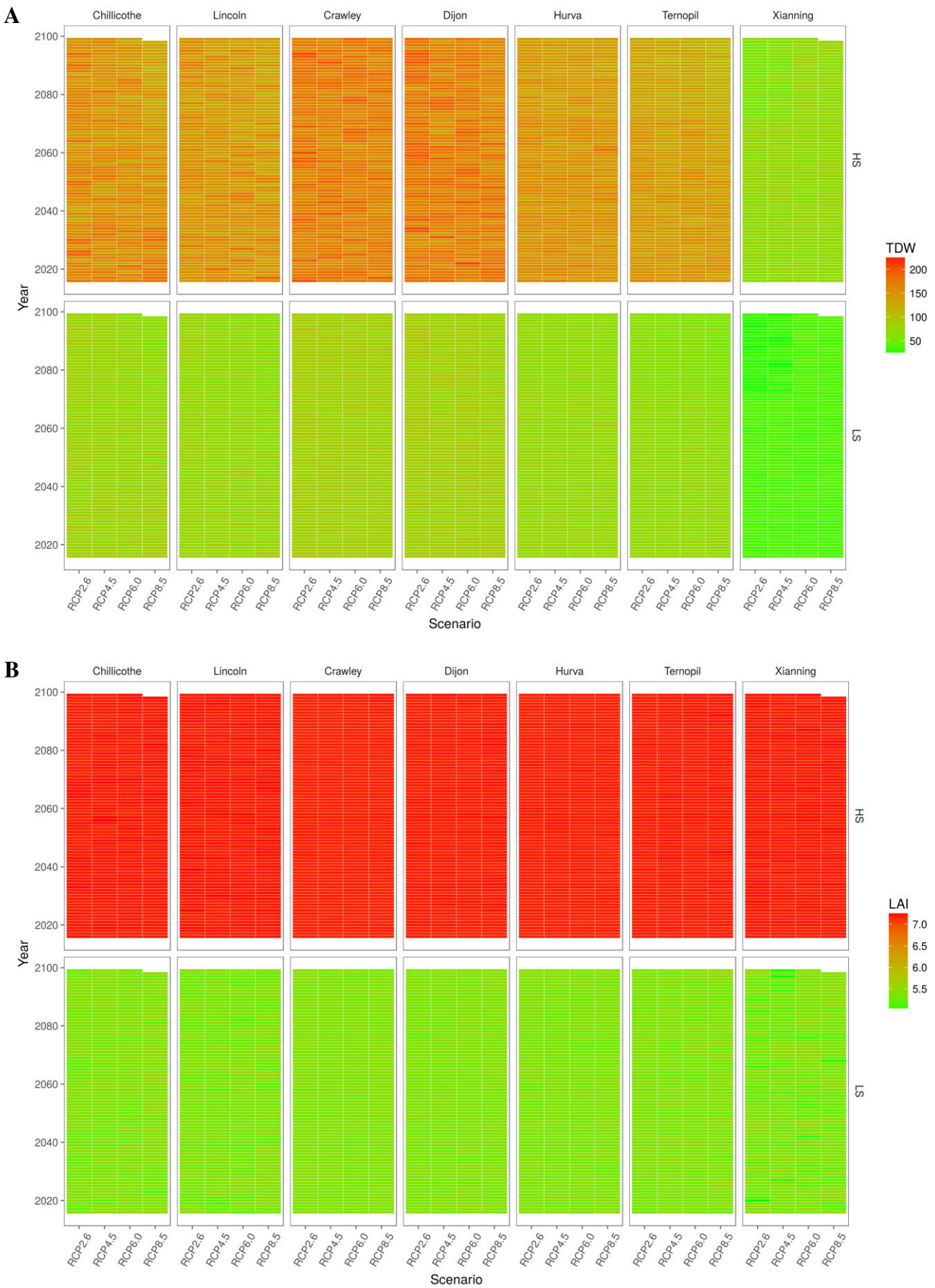
Location Scenario	Chillicothe	Lincoln	Crawley	Dijon	Hurva	Ternopil	Xianning	
				TDW ($g.plant^{-1}$)				Location effect
Historical	81.29	77.18	93.68	90.11	85.83	79.47	49.92	***
RCP2.6	78.85	74.94	85.45	85.73	73.54	69.79	34.09	***
RCP4.5	77.45	73.57	83.28	83.20	71.80	67.35	35.24	***
RCP6.0	76.47	73.13	83.59	84.42	72.16	68.46	36.67	***
RCP8.5	74.54	71.19	82.37	81.77	71.53	65.75	36.82	***
Scenario effect	***	**	**	**	*	***	***	
				LAI ($m^2.m^{-2}$)				Location effect
Historical	5.379	5.378	5.407	5.402	5.407	5.415	5.425	***
RCP2.6	5.380	5.374	5.413	5.386	5.394	5.399	5.347	***
RCP4.5	5.405	5.372	5.399	5.394	5.381	5.396	5.351	***
RCP6.0	5.401	5.366	5.398	5.409	5.382	5.388	5.374	***
RCP8.5	5.427	5.395	5.412	5.402	5.390	5.399	5.372	**
Scenario effect	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
				$QS_{mobile.GL}$ (mg $S.plant^{-1}$)				Location effect
Historical	0.44	0.47	0.42	0.41	0.45	0.45	0.30	***
RCP2.6	0.42	0.43	0.38	0.37	0.40	0.43	0.37	*
RCP4.5	0.45	0.43	0.39	0.37	0.40	0.41	0.37	***
RCP6.0	0.42	0.45	0.40	0.39	0.38	0.41	0.33	***
RCP8.5	0.45	0.42	0.40	0.39	0.37	0.44	0.34	***
Scenario effect	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

IV. Discussion

IV.1 Respective effects of location and scenario on SED, total and leaf biomass

This *in silico* study sampled a broad range of environmental conditions in seven locations distributed across the north hemisphere and four climatic scenario datasets with the aim of simulating biomass and S-related variables at the onset of the reproductive phase WOSR. The increase in temperature across years - as expected under the RCP scenarios - brought forward the SED, which is determined by temperature alone (as calibrated in the model). Three location groups can be distinguished in consistence with location groups based on projected temperatures i.e. early SEDs {Chillicothe, Xianning}, intermediate SEDs {Dijon, Lincoln, Ternopil} and late SEDs {Crawley, Hurva}. The location effect on TDW was similar regardless of the S conditions, with {Crawley, Dijon} and {Xianning} having the highest and lowest TDW, respectively. By contrast, the location effect on LDW and LAI was modified according to S conditions with {Lincoln, Xianning, Chillicothe} and {Hurva and Crawley} having the highest and lowest values under HS, respectively, and {Chillicothe, Crawley} and {Xianning} having the highest and lowest values, respectively. Biomass allocation to the leaves decreased under S limitation as expected under any mineral constraints, which favours the development of the root system (which is included in the rest of the plant, as calibrated in the model). Therefore, distinct location groups were observed for TDW and LAI according to S conditions. However, another impacting factor inherent to increased temperature is water stress which effect could be even higher than the solely effect of S limitation. Because it is also dependant on the soil properties differing amongst location, location ranking might be impacted under water limitation. With regard to the scenario effect, SED and whole plant biomass were more impacted because the scenario is pessimistic (in a gradual ranking RCP2.6< RCP4.5< RCP6.0< RCP8.5). Expectedly, reduced SED and TDW were observed whatever the S conditions. However, no scenario effect was observed in leaves (except for Dijon under HS and Chillicothe under LS) meaning that overall the biomass allocation processes are not impacted by the projected temperature and incident PAR variation magnitude.

Finally, when comparing the scenarios, lower inter-annual variability on SED was observed because the scenario is more pessimistic as a consequence of a lower magnitude of variation in temperature between years during the simulation period. This implies that model outputs are less subjected to inter-annual variability under more pessimistic scenarios (**Figures IV.B.1.2-A, B and C**).



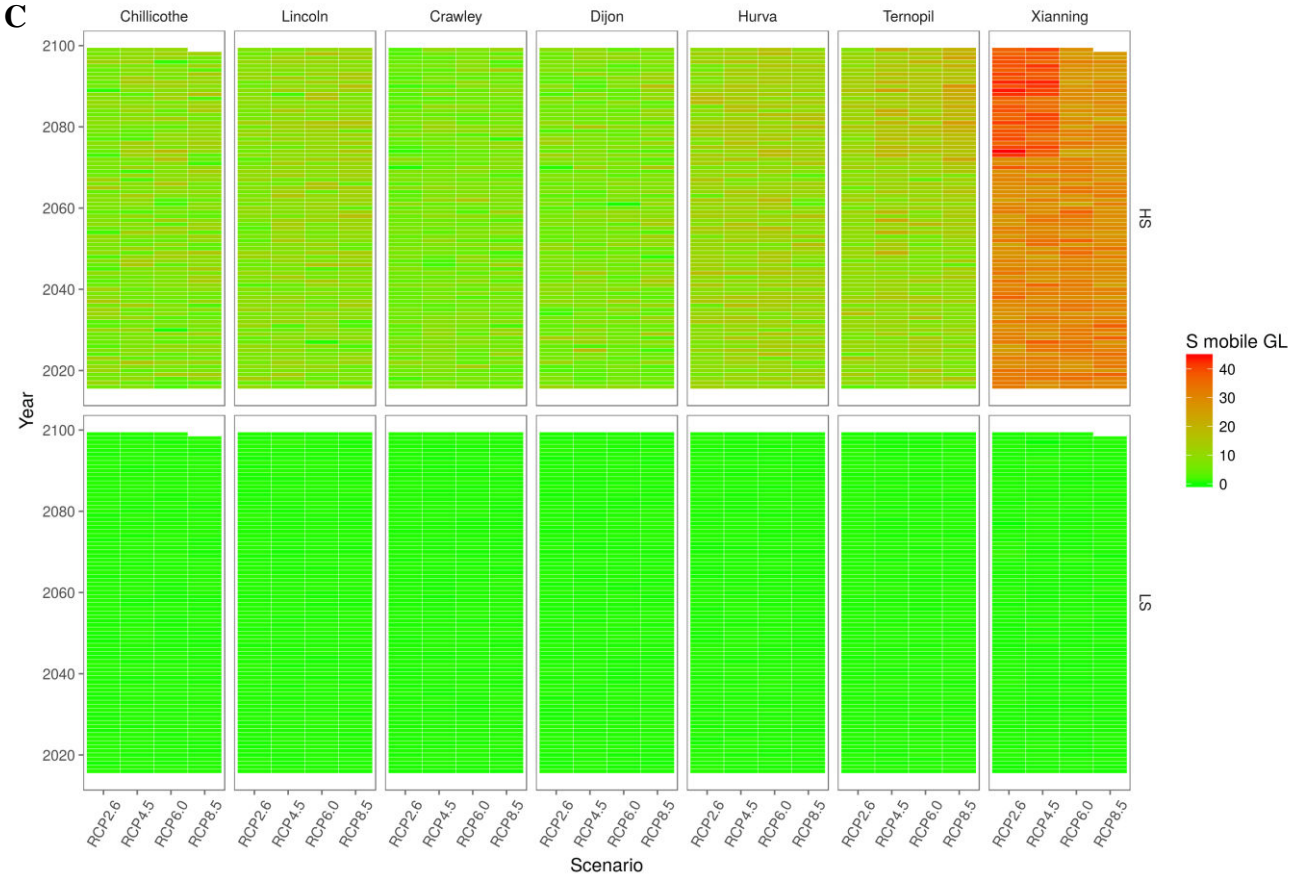
<u>Figure IV.B.1.2</u> : Heatmaps of plant responses to climate and S conditions under the four climatic scenarios for all the locations. Simulated TDW (**A**), LAI (**B**) and $QS_{mobile.GL}$ (**C**) at the SED are presented for the locations (top x-axis), under the four RCPs (down x-axis) over years (y-axis) i.e. 5502 situations in total (including simulations with the historical datasets, which are not displayed due to scaling constraints, data in Table IV.B.1.3 and 4).

IV.2 Impact of warmer temperatures on the shortening of the crop cycle and on plant biomass

In agreement with projected increased temperatures over the coming decades, simulations highlighted an acceleration of the WOSR cycle, with earlier dates for the onset of pod formation (for a cumulative thermal time of 950-970 °Cd as calibrated in the model). This effect was even more pronounced for locations and scenarios under which the predicted temperatures are high and significantly increased over years (for Chillicothe and Xianning especially under the most pessimistic scenarios i.e. RCP8.5). As a consequence, warmer temperatures from the end of winter until the onset of pod formation lead to shortening of the period of light interception, which would thus impact on global carbohydrate production. In line with this theoretical view, simulations confirmed a decrease in total biomass along with increasing temperatures, especially in Chillicothe and Xianning, which have both early SEDs and low total biomass under the most pessimistic scenarios in particular. Because carbohydrate production at the onset formation is determinant for the development of growing sinks such as pods and seeds, the length of time for radiation interception from the end of winter until the beginning of the reproductive phase is a major controlling factor. Previous *in vivo* studies pointed out similar effects of high temperatures when they occurred from flowering until seed maturity, with lower final performances (e.g. seed yield, seed number and pod number per plant and individual seed dry weight, Brunel-Muguet *et al*. 2015a). Modifications of seed quality related criteria (such as oil content) highly depend on whether the plants undergo a single stress (increased temperatures, in Brunel-Muguet *et al*. 2015a) or double stresses (increased temperatures along with higher accumulation of intercepted PAR) (Aguirrezábal *et al.*, 2014; Dosio *et al*., 2000; Izquierdo *et al*., 2008). When combined, total oil content increases significantly while the single increase in temperature leads to its reduction. In our study, although Chillicothe and Xianning have similar projected temperature patterns, the daily incident PAR was contrasting, thus leading to different biomasses at the onset of pod formation. Thus different seed oil content could be expected from these simulated results based on earlier plant behaviours.

IV.3 Impact on S storage within the plant and environmental issues

S storage is highly determined by S conditions, which represent the effective S taken up by the plant (as parameterized in the model). However, our results highlighted a significant discrepancy under non-limiting S conditions between Xianning and the other locations, with the leaves at Xianning having a three times higher mobile S in the leaves and half the total biomass (regardless of the scenarios). As previously discussed, the projected daily incident PAR is very low and led to reduced total biomass at Xianning. Low incident PAR has a direct effect on photosynthesis and



<u>Figure IV.B.1.2</u> ***: (continued)***

consequently on the production of biomass. As a result, the full amount of S taken up by the plant cannot be assimilated into carbohydrates, which led to S accumulation in the leaves in the mineral form (mobile S in the GL). Simulations in Xianning illustrated how lower incident PAR and warmer temperatures can affect biomass production and in turn S accumulation in the plant. This raises the question of the adjustment of S fertilization when the combination of temperature and radiation are not adequate i.e. high temperature and low incident PAR. If not adjusted, risks of over-fertilization can occur leading to environmental issues. S excess in the plant is not toxic, in contrast to N over fertilization (with accumulation of ammonia and urea) (Arkoun *et al*., 2013; Qin *et al*., 2011), but the detachment of leaves with high residual sulphate during both sequential and monocarpic senescence (which occurs during the vegetative and the reproductive phases, respectively), leads to S losses to the soil, which then risks leaching of S if wetter soil conditions occur.

IV.4 Directions for S management and adapted varieties

This simulation study raises questions about S fertilization monitoring and the use of varieties best adapted to the projected higher temperatures that are expected to shift the crop cycle and reduce the length time for radiation interception. First, in light of the contrasting biomass and leaf S storage outputs, S fertilization seems to require adjustments under warm temperatures and low incident radiation, as expected under the four RCP scenarios for the seven tested locations. Beyond economic savings, decreasing the S levels under unfavourable conditions would help to prevent S losses from senescing leaves, and in turn lower the potential leaching of S from the soil. Although S fertilization has gained attention due to observed soil S oligotrophy during recent decades, S fertilization management has adhered to outdates recommendations (i.e. 75 units of SO_3 applied once at the end of winter, Terre Inovia 2017). Fractioning the S inputs could be tested in order to allow better adjustment to actual biomass production from the end of winter until the reproductive phase. Secondly, varieties with shorter developmental stages, especially from stem elongation (at the end of winter) until pod formation could be of interest because they would be better adapted to a shorter length of time for radiation capture. Thus, varieties with high radiation use efficiency and/ or radiation interception efficiency could be targeted. Because spring varieties have a shorter crop cycle and do not have a vernalization requirement, their use under the expected warmer temperatures during spring in the northern hemisphere could be more widely spread, thus delaying sowing to late winter-early spring and harvesting to mid or late summer, which is earlier than winter varieties cultivated in the northern hemisphere. This would also impact on the sowing date of the following crops and hence rotation schemes. In this context, the simulations performed with the model might be used to further adjust farming practices that would be better adapted to the expected climate

change. However, careful framing of this study is required because the current version of the model does not take into account expected trends of other major environmental factors that also impact crop yield such as elevated CO_2 concentration, drought or flooding. Interactions might alleviate negative impacts, as demonstrated in previous modelling studies that have indicated higher crop yields in temperate areas where a *ca.* 1-3°C increase in temperature (i.e. in the first half of the century) would occur alongside CO_2 increases and rainfall pattern modifications (IPCC, 2014; Tubiello *et al.*, 2007). In this context of simultaneous increased CO_2 and temperature, it can be assumed that S storage would be increased as a consequence of higher sink-size (leaf) than under the solely effect of increased temperature (Clausen *et al.*, 2011; Franzaring *et al.*, 2008, 2011).

V. Conclusion

This *in silico* study quantified the impacts of contrasting S supplies along with two crucial environmental factors associated with climate change (i.e. temperature and radiation) on growth and S accumulation at the onset of pod formation in WOSR. Spanning locations across the northern hemisphere and the four RCP scenarios projected during the course of this century, the simulations open avenues for adjustment of S fertilization strategies in terms of amounts, timing and fractioning, according to variety-specific characteristics (ontology and architectural features) and to diverse cropping system designs (e.g. rotation or intercropping) that will be better adapted to ongoing and projected climate change.

CHAPITRE IV – RÉSULTATS

B. Expérimentations numériques *in silico* avec le modèle écophysiologique SuMoToRI

B. 2 Identification d'idéotypes pour optimiser les performances du colza sous différentes stratégies de fertilisation soufrée par simulations avec le modèle SuMoToRI et analyses de sensibilité

Contexte : Les caractéristiques d'un génotype peuvent avoir une grande influence sur les performances de la plante. Dans un modèle de culture, l'étape de calibration des paramètres décrivant les caractéristiques de la plante fixe leurs valeurs qui peuvent néanmoins varier selon le génotype. Les combinaisons de différentes valeurs de ces paramètres peuvent alors définir une multitude de génotypes virtuels ou idéotypes dont on peut tester les performances par modélisation.

Objectifs : Au moyen du modèle SuMoToRI, les objectifs étaient (i) de quantifier les impacts des variations de trois paramètres majeurs associés au métabolisme carboné sur les variables de sortie du modèle, principalement la biomasse de la plante, l'indice de surface foliaire et la fraction de S mobile dans les feuilles qui est un indicateur des quantités de S remobilisables vers les organes reproducteurs en croissance (péricarpes des siliques et graines) et (ii) d'identifier des combinaisons de valeurs des trois paramètres pour définir des idéotypes adaptés aux différentes stratégies de fertilisation S testées.

Démarche expérimentale : Des analyses de sensibilités globales ont été effectuées et deux indices de sensibilité ont été déterminés *i.e.* le coefficient de corrélation partielle (PRCC) et l'indice de Sobol. Les simulations ont été réalisées pour 15 stratégies de fertilisation S, différant en termes de disponibilité en S, de date d'apport (conventionnel, à la sortie d'hiver ou retardé, à la floraison) et de modalité d'apport (en une fois ou en fractionné). Trois paramètres de la plante du modèle SuMoToRI (connus pour leur variabilité en réponse à la disponibilité en S et dans d'autres contextes) ont été ciblés : l'efficience d'utilisation des rayonnements (RUE, g de $MS.MJ^{-1}$), la surface foliaire spécifique (SLA, $m^2.g\ MS^{-1}$) et le coefficient d'allocation du C aux feuilles (β, sans dimension).

Résultats : Les résultats ont montré que la RUE avait le plus grand impact sur la biomasse au début de la formation des siliques, quel que soit le niveau d'apport en S, la date et le fractionnement en S, suivie du coefficient β et du SLA. La RUE a aussi un fort impact sur la quantité de S mobile foliaire, qui est modulé par les conditions d'apport en S (fortes interactions avec les autres paramètres), alors que son impact sur la surface foliaire des feuilles présentes sur la plante est minime. Ces résultats ouvrent des perspectives de conception d'idéotypes variétaux en combinant des caractéristiques de la plante adaptées aux schémas de fertilisation et d'idéotypes culturaux en adaptant les schémas de fertilisation aux contraintes variétales.

Article publié dans *PLOS ONE* : **Poisson *et al.*** (2018). Sensitivity analyses for improving sulfur management strategies in winter oilseed rape. 13 (9), e0204376. Doi : 10.1371/journal.pone.0204376

B.2 Sensitivity analyses for improving sulfur management strategies in Winter Oilseed Rape

Emilie Poisson[1], Sophie Brunel-Muguet [1], François Kauffmann[2], Jacques Trouverie[1], Jean-Christophe Avice[1], Alain Mollier[3].

1. UMR 950 EVA (Ecophysiologie Végétale et Agronomie), Normandie Université, UNICAEN, INRA, SFR Normandie Végétal (FED4277), Esplanade de la Paix, 14032, Caen, France
2. UMR 6139 Laboratoire de Mathématiques Nicolas Oresme, Normandie Université, UNICAEN, CNRS, 14000, Caen, France
3. ISPA, Bordeaux Sciences Agro, INRA, 33140, Villenave d'Ornon, France

Running title: *Sensitivity analyses and sulfur management*

Abstract

Because sulfur (S) depletion in soil results in seed yield losses and grain quality degradation, especially in high S-demanding crops such as oilseed rape (*Brassica napus* L.), monitoring S fertilisation has become a central issue. Crop models can be efficient tools to conduct virtual experiments under different fertilisation management strategies. Using the process-based model SuMoToRI, we aimed to analyse the impact of different S fertilisation strategies coupled with the variablility observed in major plant characteristics in oilseed rape i.e. radiation use efficiency (RUE), carbon (C) allocation to the leaves (β) and specific leaf area (SLA) on plant performance-driven variables encompassing total biomass (TDW), S in the photosynthetic leaves ($QS_{mobile.GL}$) and leaf area index (LAI_{GL}). The contrasting S supply conditions differed in the amount of S (5 levels), and the timing of application (at bolting and/or at flowering, which included a fractioned condition). For this purpose, we performed a global sensitivity analysis (GSA) and calculated two sensitivity indices i.e. the Partial Raw Correlation Coefficient (PRCC) and the Sobol index. The results showed that whatever the timing of S supply, TDW, LAI_{GL} and $QS_{mobile.GL}$ increased as S input increased. For a given S supply, there was no difference in TDW, LAI_{GL} and $QS_{mobile.GL}$ between a single and a fractioned supply. Moreover, delaying the supply until flowering reduced the TDW and LAI_{GL} whereas $QS_{mobile.GL}$ increased. Results showed that RUE had the greatest impact on TDW under all levels of S supply and all application timings, followed by β and SLA. RUE mostly impacted on $QS_{mobile.GL}$, depending on S supply conditions, whereas it was the parameter with the least impact on LAI_{GL}. Ultimately, our results provide strong evidence of optimised S fertilisation timings and plant characteristics that will guide producers in their agricultural practices by using specific varieties under constrained S fertilisation strategies.

I. Introduction

Crop models can be efficient tools to simulate and analyse agricultural practices, such as the impact of fertiliser management strategies on crop performances (Brisson *et al*., 1998; Brunel-Muguet *et al*., 2015b; Jamieson *et al*., 1998; Jeuffroy and Recous, 1999; Mollier *et al*., 2008; Robertson and Lilley, 2016). They provide a framework to untangle interactions between plants and their environment, and often deliver quantitative outputs indicating thresholds to target specific objectives. In the current context of sustainable agriculture, which implies reduction of fertiliser inputs, modelling experiments are less expensive and easier to set up than field or greenhouse experiments but allow fertilisation constraints to be tested. In addition, most crop models have been used extensively to analyse the impacts of on-going global changes and to project crop yields worldwide (Asseng *et a*l., 2014; Challinor *et al*., 2014; Chenu *et al.*, 2017; Kumar, 2016; Nuttall *et al*., 2017).

Modelling approaches to assist crop management in low input systems can target fertilisation strategies (amount, timing and fractioning) or plant characteristics, which in both cases aim to alleviate the negative impact of decreased resources. The advantage of process-based models is that (i) they clarify plant characteristics and central processes such as photosynthesis, nutrient uptake, assimilation or remobilisation by means of equations and parameters, and (ii) they take into account the variability of plant features. Therefore, exploring the effects of the variation in plant parameters on model outputs can be achieved with sensitivity analyses (SAs) (Cariboni *et al*., 2007). SAs are usually carried out to assess the sensitivity of model outputs with respect to the inputs i.e. parameters and/or variables (due to their estimation uncertainty or inherent variability). SAs with process-based models have several objectives: (i) to explored model functioning; (ii) to improve model calibration by adding or deleting processes (i.e. parameters and equations) which define the level of complexity in the model according to their impacts on output variations (Iooss and Lemaître, 2015); (iii) to quantitatively estimate the extent of the impacts of input variables (representing resource allocation for instance) on crop performance; and (iv) to identify the most influential plant parameters (representing plant features) according to their effect on output variations, and thus to help defining ideotypes (or virtual genotypes). Two categories of SAs are usually carried out. First, the local approach (LA) aims to study the variability of outputs induced by the small variation of a single parameter and/or variable (input) to the point when an estimate is chosen while keeping the other parameters fixed (Saltelli *et al*., 2000). Second, a global sensitivity analysis (GSA) considers in contrast the whole variation range or domains of the inputs, which allows outputs to be analysed with regard to the combined variability (Saltelli *et al*., 2000). GSA are commonly used with complex

models where the conventional method (LA) would fail to represent the interactions between the numerous parameters and input variables (Colbach *et al.*, 2004).

In this study, we aimed to analyse the impact of different sulfur (S) fertilisation strategies coupled with the variablility observed in major plant characteristics in oilseed rape. Like most of the Brassica species, oilseed rape is a high-S demanding crop with recommended inputs (RI) (Terres Inovia, http://www.terresinovia.fr/colza/cultiver-ducolza/fertilization/soufre/) of about 30 kg $S.ha^{-1}$ (corresponding to 75 kg $SO_3.ha^{-1}$) (Oenema and Postma, 2003). Sulfur is present in a wide range of metabolites such as methionine (essential amino acids (AA)) and cysteine (non-essential AA), proteins, glutathione and glucosinolates, which makes it an essential element for growth, development and resistance to abiotic and biotic stresses. The importance of tightly monitoring S fertilisation, especially in Brassica species, has emerged over recent decades when drastic environmental policies aimed at lowering industrial sulfur dioxide (SO_2) emissions (Schnug *et al.*, 1993) and *in fine* led to an increased risk of soil S oligotrophy. Several studies in oilseed rape have indicated that low S availability can drastically impact seed yield and corresponding components (e.g. thousand seed weight, pod number, seeds per pod), seed nutritional characteristics (e.g. oil and protein contents, and fatty acid (FA) and seed storage protein (SSP) compositions) as well as physiological quality of seeds (e.g. germination rates, storage capacity) (Brunel-Muguet *et al.*, 2015a; D'Hooghe *et al.*, 2013b; Dubousset *et al.*, 2010). In this context, modelling S requirements and allocation within the plant could be a helpful approach to correct deficiencies occurring during vegetative growth and the transition between vegetative and reproductive stages which are crucial phases for S storage and thus for providing S to growing reproductive sinks (Abdallah *et al.*, 2010; Dubousset *et al.*, 2009; Girondé *et al.*, 2014). The process-based model SuMoToRI (Sulphur Model Towards Rapeseed Improvement ; Brunel-Muguet *et al.*, 2015b) simulates the dynamics of crop growth and S status until the onset of pod formation. Its original feature is based on the prediction of an S-mineral pool that is assumed to remobilise to provide S requirements for growing sinks throughout the reproductive stage. The model is run with a limited number of plant parameters that refer to the potential leaf growth and carbon (C) demand by the leaves driven by climatic variables (temperature and radiation), genetic characteristics, C assimilation and S uptake as well as S allocation (among compartments) and partitioning (S-organic vs. S-mineral compounds).

The objective of this modelling analysis is to highlight the most suitable combinations of plant model parameters under contrasting fertilisation strategies which allowed high plant performances (biomass, leaf area or S content in leaves). For this purpose we performed a global sensitivity analysis (GSA) and determined two sensitivity indices i.e. the Partial Raw Correlation Coefficient

(PRCC) and the Sobol index. Both indices are based on measures of importance (quantitative sensitivity indices) in contrast with coarse screening methods e.g. the Morris method (Morris, 1991), which is usually used to explore the behaviour of model outputs by varying a broad number of parameters, thus helping to detect the least influential ones. Because we aimed to focus on specific plant parameters, we used methods based on linear regression (i.e. PRCC) and on the decomposition of functional variance using Sobol indices. This allowed (i) estimation of the strength of linear associations between outputs and each input parameter after removing the linear effect of the other parameter (PRCC) and (ii) distinguishing and quantifying the principal and interaction effects of the parameter on the output variation using Sobol indices (Iooss, 2011).

In our study, the GSA was performed under contrasting S supply conditions that differed in S availability (5 levels), date (at bolting or at flowering) and fractioning (once or twice during growth from the end of winter) of S inputs. Three plant parameters of the model SuMoToRI were targeted because they were shown to display variability in response to S (Brunel-Muguet *et al*., 2015b) and/or different conditions that have been reported in the literature (Jullien *et al*., 2009). These parameters were the Radiation Use Efficiency (RUE, g DW.MJ^{-1}), the Specific Leaf Area (SLA, m².g DW^{-1}) and the C-leaf allocation coefficient (β, dimensionless). The outcomes for the GSAs are twofold (i) ranking the targeted plant parameters according to their impacts on plant performances, that are the total biomass production, the S in the leaves available for remobilisation towards growing pods (used as a proxy of seed quality) and the leaf area index (the central variable in the model) under different S supply strategies and (ii) identifying the most suitable combinations of plant parameter values (namely ideotypes) under these contrasting S supply strategies. This will eventually help producers to adjust agricultural practices by using specific varieties under constrained S fertilisation strategies.

II. Materials and methods

II.1 Overview of the SuMoToRI model

SuMoToRI was described extensively in Brunel-Muguet *et al*. (2015b). Briefly, this process-based model predicts with daily time increments, the dynamics of the leaf area index (LAI_{GL} which is the leaf area, LA_{GL}, multiplied by plant density), the biomass, the S amounts and the fractions of organic and mineral S for three main plant compartments considered, namely the photosynthetic leaves, which are simplified as a single Big Leaf (BL), the fallen leaves (FL) and the rest of the plant. The model considers the three environmental factors of temperature, Photosynthetically

Table IV.B.2.1 : Model parameters and initial values. Parameters in bold are used for the GSAs (RUE, β and SLA). Values range between minimum and maximum. Parameters in bold are used for the GSAs (RUE, β and SLA). Values range between minimum and *maximum.*

Symbol	Definition	Value	Unit	Source
sd	Sowing density	40	Plant.m²	
PAR interception				
k	PAR extinction coefficient	0.75	$m^2\ m^{-2}$	Bonhomme *et al*. 1982
Potential leaf growth				
LA_0	Initial leaf area of photosynthetic leaves	0.015	$m^2\ plant^{-1}$	
LA_{max}		0.2	$m^2\ plant^{-1}$	Estimated
K	Leaf area expansion parameters	872.96	$°Cd^{-1}$	
N		6.31	dimensionless	
C acquisition and plant offer				
$PARabs_{ini}$	Initial absorbed PAR	0	$MJ\ m^{-2}$	
TDW_{ini}	Initial total dry weight	0.576	$g\ DW\ plant^{-1}$	
$DW_{FL.ini}$	Initial dry weight of fallen leaves	0	$g\ DW\ plant^{-1}$	
RUE	**Radiation use efficiency**	**1.6 – 4.6**	**$g\ DW\ MJ^{-1}$**	Estimated
$aLDW_{FL}$	Parameters of the function	0.0092	$g\ DW\ plant^{-1}\ °Cd^{-1}$	
$bLDW_{FL}$	describing the time progression of LDW_{FL}	0.0043	dimensionless	
C allocation to leaves				
β	**Coefficient of DW allocation to the leaves**	**0.10 – 0.72**	**dimensionless**	Estimated
C demand of green leaves				
$LDW_{GL.ini}$	Initial dry weight of green leaves	0.448	$g\ DW\ plant^{-1}$	Estimated
SLA	**Specific leaf area**	**0.008 – 0.034**	**$m^2\ g\ DW^{-1}$**	
Growth S demand				
αGL	Parameters to estimate critical S	5.11	$mg\ S\ plant^{-1}$	
βGL	content in GL as a function of LDWGL	-0.52	dimensionless	
αrest	Parameters to estimate critical S	1.83	$mg\ S\ plant^{-1}$	Estimated
βrest	content in the rest of the plant as a function of DWrest	-0.004	dimensionless	
Potential mobile S allocation				
εpot	Coefficient of potential repartition of mobile S to the leaves	0.8	dimensionless	Estimated
S uptake				
$QS_{TOT.ini}$	Initial total S uptake	6.78	$mg\ S\ plant^{-1}$	
$QS_{GL.ini}$	Initial S in green leaves	5.76	$mg\ S\ plant^{-1}$	Estimated
$QSrest_{ini}$	Initial S in fallen leaves	1.017	$mg\ S\ plant^{-1}$	

Active Radiation (PAR, MJ m^{-2}) and the amount of S taken up by the plant. The simulation period covers the end of vernalisation until the onset of pod formation. The mineral fraction in the leaves is estimated by the sulfate amount and this is used as an indicator of the potential for S remobilisation towards growing pods. The model is run with 23 plant parameters, most with generic values, which describe potential leaf expansion, C-assimilation, allocation of C and S among the three compartments and S-partitioning (mineral vs. organic).

II.2 Simulations and sensitivity analysis procedures

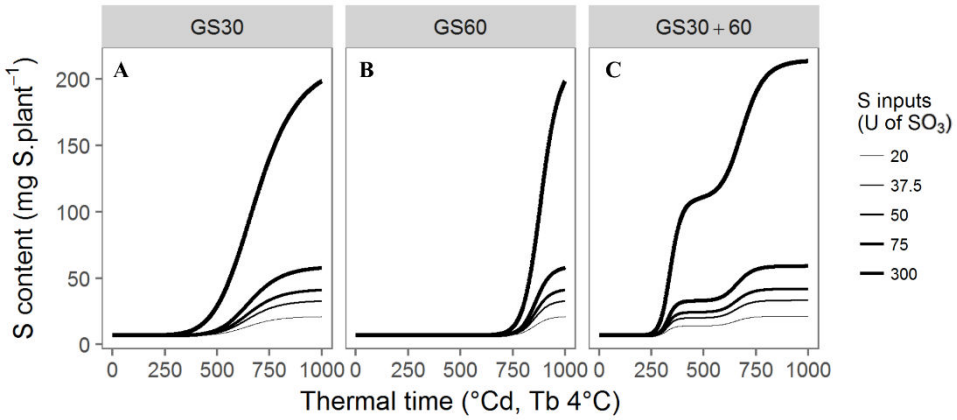
The model was used to predict plant growth and S status under several S supply conditions that were expected to highlight contrasting plant behaviour simulations. Then the GSA was performed (i) to rank three plant parameters according to their respective impact on plant performance and (ii) to determine the most suitable plant parameter value combinations under these special conditions. Our underlying questions were the following: (i) what are the most impacted outputs resulting from the variations in the targeted parameters? (ii) To what extent do S fertilisation conditions modulate the impact of the parameter variations on outputs? The GA procedure consists of the following steps:

II.2.a Step 1: Choice of targeted plant parameters and setting of their variation range

The GSA was performed on three of the 23 parameters in order to assess their impact on biomass and S-content: the Radiation Use Efficiency (RUE), the Specific Leaf Area (SLA), and the β parameter, which indicates the allocation of C-assimilates to the leaves. These parameters were chosen (i) because value variations were observed in response to S availability for RUE (variability observed in the model calibration and evaluation datasets) and for the Specific Leaf Area (SLA), and the β coefficient (with variability for the validation dataset only) (unpublished data and Brunel-Muguet *et al*., 2015b) and (ii) according to the literature and prior experiments including those reported from other species (Jullien *et al*., 2009; Khan *et al*., 2005; Randall *et al*., 1997). Following these observations, the mean, the standard deviation, the distribution profile and the truncation thresholds (minimum and maximum) were determined for each parameter (**Table IV.B.2.1**). All three parameter distributions were assumed to be uniform (not negative). All other model parameters were assumed constant (**Table IV.B.2.1**).

II.2.b Step 2: Calculation of S uptake functions

The model was initially calibrated and evaluated with the cultivar Yudal, under two contrasting S supply conditions (High S, HS and Low S, LS) (Poisson *et al*., 2018b). They corresponded respectively to 300 and 20 units (U) of sulfur trioxide (SO_3: $kg.ha^{-1}$), which were provided



<u>Figure IV.B.2.1</u> : Hills' kinetics of S uptake according to the 15 S-supply conditions. Fitted Hill's model of S amounts as a function of thermal time (°Cd) for (A) the single S supplies at GS30, (B) at GS60 and (C) the fractioned S supplies at GS30 and GS60. Tb: base temperature.

<u>Table IV.B.2.2</u> : Hill's model parameters for the 15 S-supply conditions.

Total S rate supply (Units: kg.ha^{-1})	Definition	Q_{Smax1}	n_1	K_{a1}	Q_{Smax2}	n_2	K_{a2}
Supply at the end of winter							
20	Corresponding to a supply of S at the end of winter (GS30: beginning of simulation).	14.5	9.1	654	/	/	/
37.5		26.6	9.0	656	/	/	/
50		35.2	8.9	658	/	/	/
75		52.4	8.6	661	/	/	/
300		207.5	6.7	686	/	/	/
Supply 20 days delayed							
20	Corresponding to a supply of S 20 days after the end of winter (GS60).	14.5	24.6	854	/	/	/
37.5		26.6	24.4	856	/	/	/
50		35.2	24.2	858	/	/	/
75		52.4	24.0	861	/	/	/
300		207.5	20.8	886	/	/	/
Fractioned S application							
20	Corresponding to a fractioned supply of S at the end of winter and 20 days after the end of winter (GS30+GS60).	7.3	18.3	327	7.3	18.3	654
37.5		13.3	18.0	328	13.3	18.0	656
50		17.6	17.7	329	17.6	17.7	658
75		26.2	17.3	330	26.2	17.3	660
300		103.7	13.3	342	103.7	13.3	685

throughout the crop cycle following the relative addition rate nutrient-dosing system (Ingestad and Lund, 1986; Oscarson *et al.*, 1989). Consequently, measured plant S uptake dynamics for both extreme conditions were fitted to the Hill's model (Eq. 1):

$$QS = \frac{QS_{max} \times TT^n}{K_a + TT^n} + QS_{\text{ini}} \qquad \text{(Eq. 1)}$$

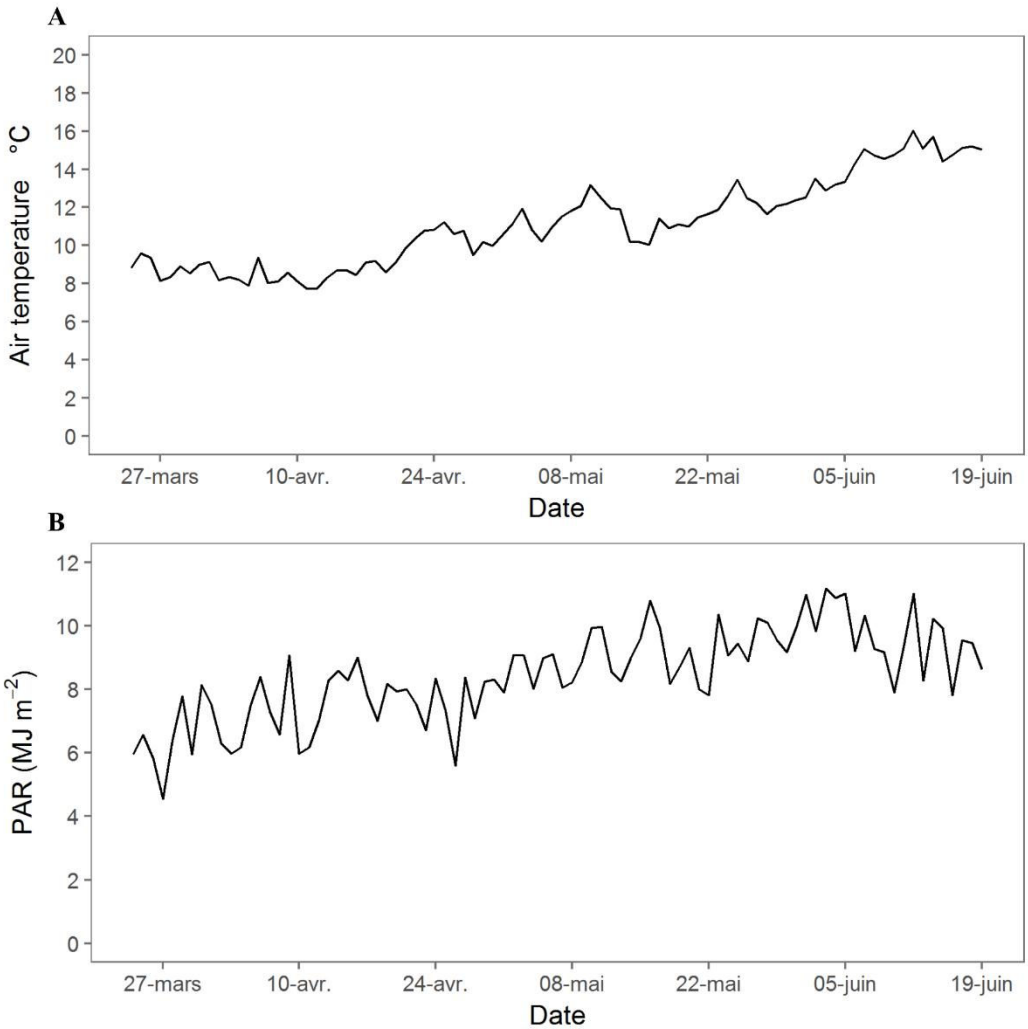
where QS_{max} (mg S.plant^{-1}), K_a (°Cd) and n parameters were the three plant parameters describing the uptake process, QS_{ini} (mg S.plant^{-1}) the initial amount taken up by the plant at the end of vernalisation and TT, the thermal time (in °Cd) (Morrison *et al.,* 1989). Three other intermediate S fertilisation levels were selected as follows (i) the recommended inputs (RI) for the whole crop cycle, matching 75U SO_3, (ii) 50U SO_3 (2/3 of the RI) and (iii) 37.5U SO_3 (half of the RI). These amounts were supplied once at the end of winter (GS30, bolting) and 20 days later (200 °Cd, GS60, flowering) (Lancashire *et al.* 1991) (**Figure IV.B.2.1-A** and **B**), or split at two times in equal amounts at GS30 and GS60 (**Figure IV.B.2.1-C**) according to the following Hill's model (Eq. 2):

$$QS = \frac{QS_{max1} TT^{n1}}{K_{a1} + TT^{n1}} + \frac{QS_{max2} TT^{n2}}{K_{a2} + TT^{n2}} + QS_{ini} \qquad \text{(Eq. 2)}$$

The Hills' model parameters were determined for the 15 S-supply conditions i.e. 5 amounts x 3 timings (once at GS30, once at GS60 and twice at GS30 and GS60 for the fractioned condition) (**Table IV.B.2.2**). Initial values were the same for the 15 conditions, assuming that the plants were previously grown under similar environmental conditions and optimal S nutritional supply (75 U SO_3). Therefore, the initial amount of total S (QS_{ini}) was determined relative to both HS and LS conditions by averaging the values obtained with the respective Hill's adjustments for HS and LS. Then linear regressions were used to calculate the initial total dry weight (TDW_{ini}), the initial leaf dry weight of green leaves (LDW_{GLini}) and the initial amount of S in green leaves (QS_{GLini}) (**Table IV.B.2.1**).

II.2.c Step 3: Simulations of plant performances under contrasting S-supply conditions

Simulations were performed under 15 different S-supply conditions that differed in terms of S-amount and timing of application (including one fractioned condition) (**Table IV.B.2.2**). A single set of parameter values was used except for the three targeted parameters (RUE, SLA and β), which were randomly selected within their respective distribution (**Table IV.B.2.1** and **2**). A single climatic dataset for simulations and the GSAs was used, based on daily average temperature and radiation from 2005 to 2015 in Saint-Martin-de-Hinx (43°34′57″N, 1°16′10″W) (data from the CLIMATIK platform, https://intranet.inra.fr/climatik_v2, **Figure IV.B.2.2**). The dates of



<u>Figure IV.B.2.2</u> : Climatic data used for the simulation with the model and the sensitivity analyses. Daily mean temperature in °C (**A**) and daily mean Photosynthetically Active Radiation (PAR) in MJ.m^{-2} (**B**) in Saint-Martin-de-Hinx averaged over 2005 to 2015 (source: CLIMATIK https://intranet.inra.fr/climatik_v2) for the simulated periods.

initialisation for the simulations were determined with two criteria i.e. temperature (10 consecutive days above 10°C) and day length (threshold of 11.35 hours), so as to closely match the conditions at the end of vernalisation to start running the model (Poisson *et al*., 2018b).

II.2.d Step 4: Computation of the sensitivity indices: partial rank correlation coefficient

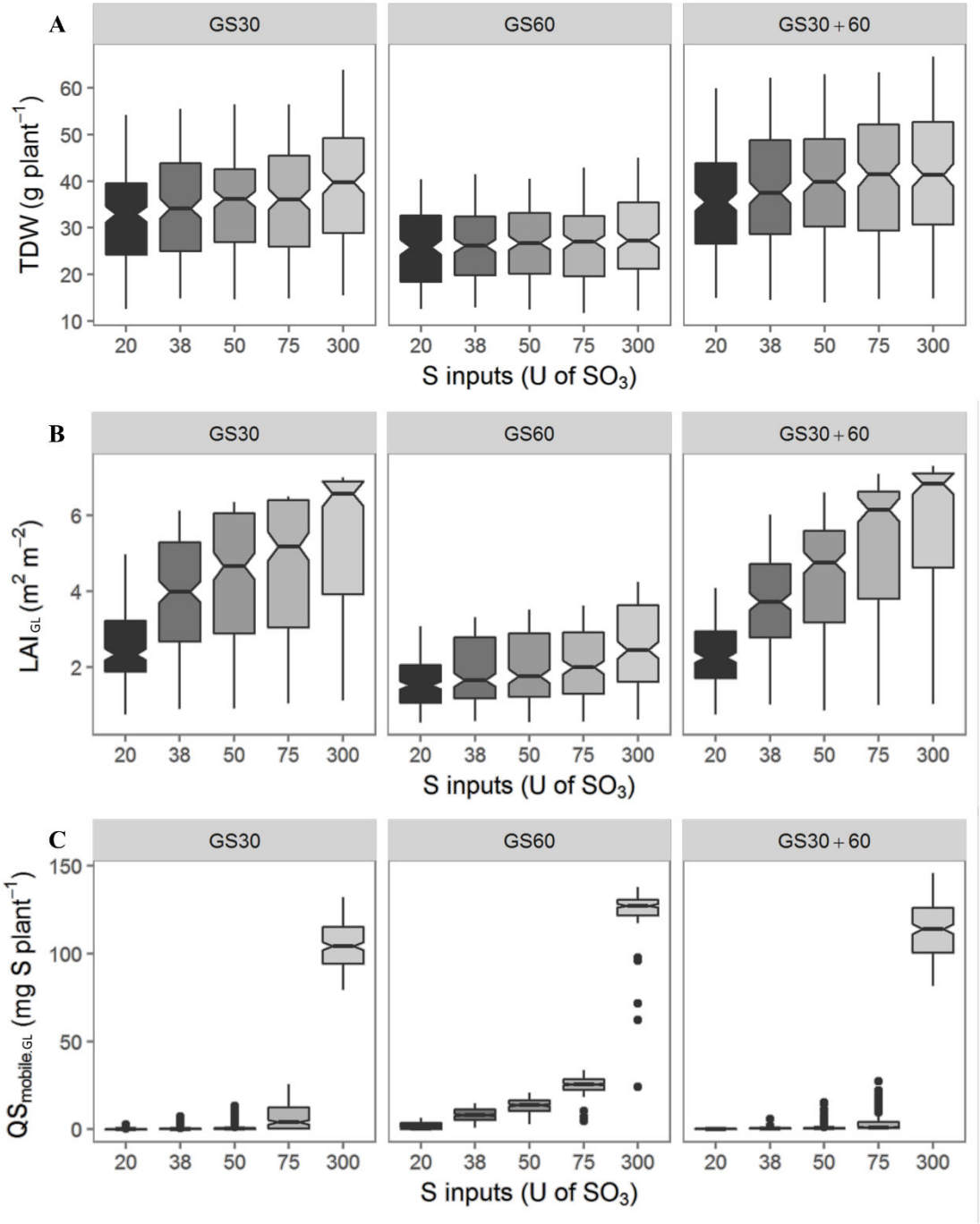
The partial rank correlation coefficient (PRCC) measures the strength of the linear associations between the output and each input parameter, after removing the linear effect of the other parameters. These rank-based measures are part of the so-called sampling-based global sensitivity analysis method. The PRCC varies between −1 and +1 and it quantifies the links between input factors and output variables as well as the direction of the relationship. We used a "Latin Hypercube Sample" (LHS) for generating the sample of parameter combinations (Mckay *et al*., 1979), which allows the precision of the sensitivity indices to be increased. Overall 3,000 simulations (200 repetitions x 15 conditions) for each output were performed, thus allowing 200 combinations of parameters to be tested under the 15 S-supply conditions.

II.2.e Step 5: Computation of the sensitivity indices: functional decomposition of variance with Sobol indices

The Sobol method is a variance-based method that uses a variance ratio to estimate the importance of parameters (Saltelli, 2002; Sobol, 1990). Two main sensitivity indices are defined for each parameter. The first order or main order of sensitivity index measures the average effect of one parameter on one model output, without taking into account the interaction effects with the other parameters. The second order expresses the sensitivity of the model to the interactions between the parameters. The sum of both indices provides the total effect index. Prior to their estimation, we used the Monte Carlo-based sampling method, which implied n (d+2) model evaluations (N) in which n = 2000 is the size of an initial Monte Carlo sample (number of repetitions) and d = 3 is the number of targeted parameters (Iooss and Lemaître, 2015). Therefore, the index estimations required 10^4 model evaluations (N) per S supply condition and for each output. Overall, for each output variable, 10^4 x 15 simulations were performed under the 15 S-supply conditions.

II.3 Software

The model was run with R (version 3.4.1) (R core team, 2013) with additional R packages including *pse* (Latin Hypercubes), *sensitivity* (sensitivity analysis), *ggplot2*, *ggthemes* and *reshape2* (visualisation).



<u>Figure IV.B.2.3</u> : Plant performances and range of variations at the onset of pod formation for the 15 S-supply conditions according to random draws of 200 combinations of the 3 parameters tested. Variation of the TDW (g.plant^{-1}) (**A**), $LAI._{GL}$ (m².m^{-2}) (**B**) and $QS_{mobile.GL}$ (mg S.plant^{-1}) (**C**) for the 15 S-amounts x timing conditions, obtained from simulations with 200 combinations of the 3 parameters tested (RUE, β and SLA). Data are represented by a box plot and through their quartiles; the bottom and top of the box are the first or lower (Q1) and third or upper quartiles (Q3), the band inside the box is the second quartile (the median, Q2) and maximum and minimum values are at the end of the vertical bars. Extreme data are represented by point.

III. Results

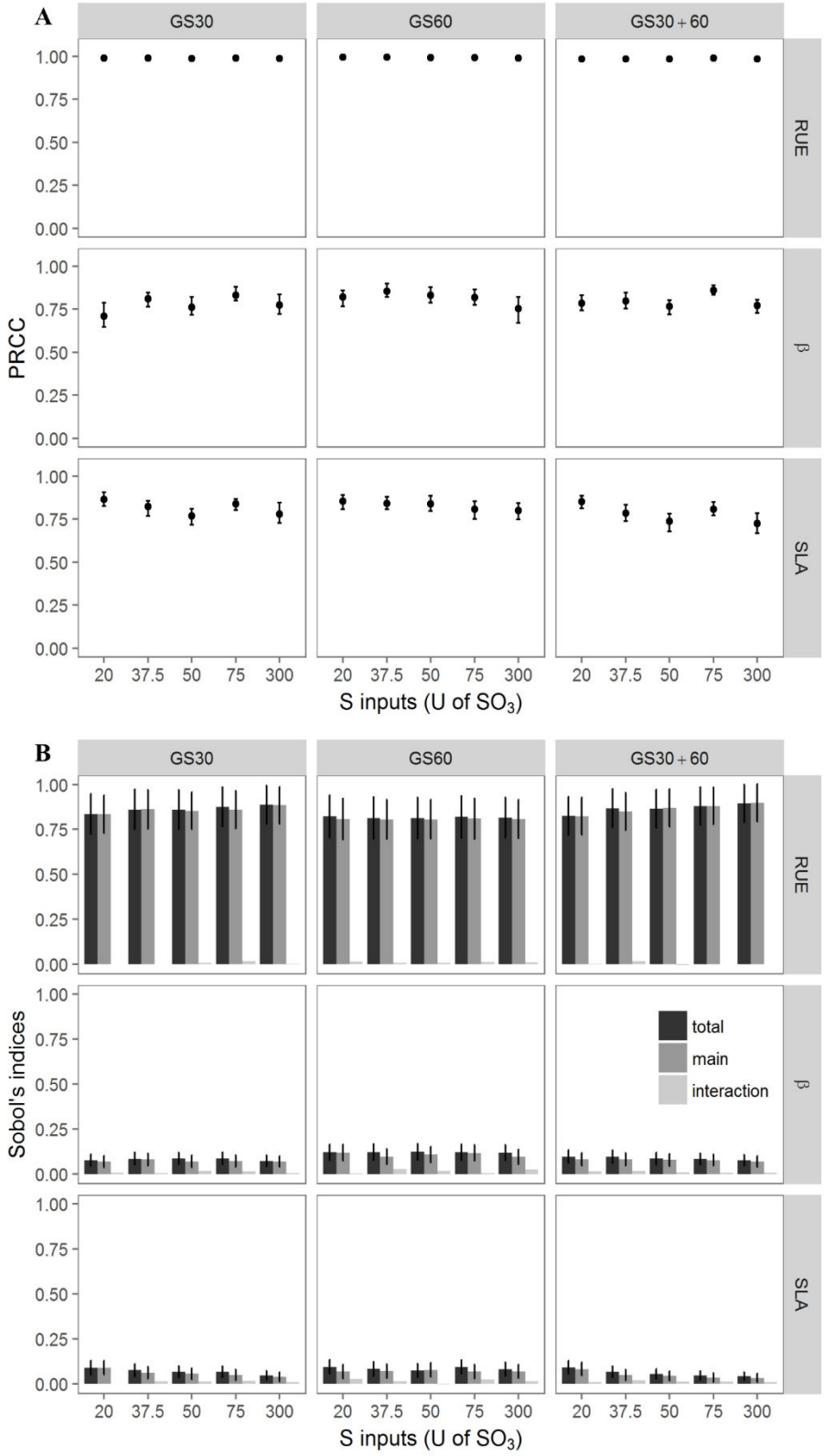
Three representative outputs were selected to illustrate the variations in the model inputs and these comprised the biomass (TDW), the leaf area index (LAI_{GL}) and the S-remobilisation process ($QS_{mobile.GL}$).

III.1 Plant performances and range of variations at the onset of pod formation

Figure IV.B.2.3 represents the extent of variation in the 3 outputs (i.e. TDW, LAI_{GL} and $QS_{mobile.GL}$) at the onset of pod formation for the 15 S supply conditions according to random draws of 200 combinations of the 3 parameters tested (i.e. RUE, SLA and β). Whatever the timing of the S supply (GS30, GS60 and GS30+60, which is the fractioned condition), the three outputs (TDW, LAI_{GL} and $QS_{mobile.GL}$) increased with a higher S supply but for TDW the increase was lower (**Figure IV.B.2.3**). The median TDW ranged from 32.9-39.7 g.plant^{-1} with extreme values observed for 20U and 300U, respectively, when provided at GS30 (bolting, **Figure IV.B.2.3-A**). The S supply rate effect was stronger on LAI_{GL} when provided once at GS30 and twice at GS30+60 (with values being more than twice as high with 300U compared to 20U, **Figure IV.B.2.3-B**) and on $QS_{mobile.GL}$, irrespective of the timing of the S supply (with the expected increase being up to 10^4 times higher with 300U than with 20U, **Figure IV.B.2.3-C**).

For a given S supply rate there was a slight increase in the TDW, LAI_{GL} and $QS_{mobile.GL}$ (**Figures IV.B.2.3-A**, **B** and **C**) when supplying S twice at GS30+60 compared to once at GS30. However, delaying S fertilisation until GS60 noticeably reduced the TDW and LAI_{GL} (**Figures IV.B.2.3-A** and **B**), regardless of the S amount, and contrasted with the increase in $QS_{mobile.GL}$ (**Figure IV.B.2.3-C**). The effect of the S amount when provided at GS60 (flowering) had less of an impact on TDW (25.8 to 27.3 g.plant^{-1}) and LAI_{GL} (1.5 to 2.5 m².m^{-2}) than supplying S at GS30 (32.9 to 39.7 for TDW and 2.3 to 6.6 for LAI_{GL}) or at GS30+60 (35.6 to 41.4 for TDW and 2.3 to 6.8 for LAI_{GL}).

The simultaneous variation in the 3 parameters generated a high range of variation in the three outputs (**Figures IV.B.2.3-A**, **B** and **C**). For TDW and LAI_{GL} the extent of variation resulting from combinations of the three parameters was more pronounced with the GS30 (bolting) and GS30+60 timings than in the GS60 timing (flowering) under all S supply rates, except in the case of LAI_{GL} where lower variation was observed with lower S amounts. For instance, the extent of variation between the minimum (min) and the maximum (max) TDW values were *ca.* 41.7 and 27.8 respectively for 20U at GS30 or GS60 (**Figure IV.B.2.3-A**). For LAI_{GL}, the extent of variation between max and min values was about 4.2 and 5.9 respectively for 20U and 300U at GS30 and about 2.5 and 3.6 respectively for 20U and 300U at GS60 (**Figure IV.B.2.3-B**). In contrast, the



<u>Figure IV.B.2.4</u> : Impact of variation in plant parameters on TDW described by PRCC and Sobol indices. Impact of RUE, β and SLA calculated by PRCC (**A**) and by Sobol indices (**B**) on TDW for the 15 S-amounts x timing conditions. For Sobol indices, total indice ±SE, main indice ±SE and interaction (=total-main) are presented for each parameter and each condition (n=15).

extent of variation for $QS_{mobile.GL}$ was much lower than for the other two parameters, but it was intensified under GS60 timing conditions with a similar trend for each of the five S amounts, whereas under the GS30 and GS30+60 timing conditions, the extent of variation for $QS_{mobile.GL}$ only increased with 75U and 300U (**Figure IV.B.2.3-C**).

III.2 Impact of variation in plant parameters on plant performance and S status

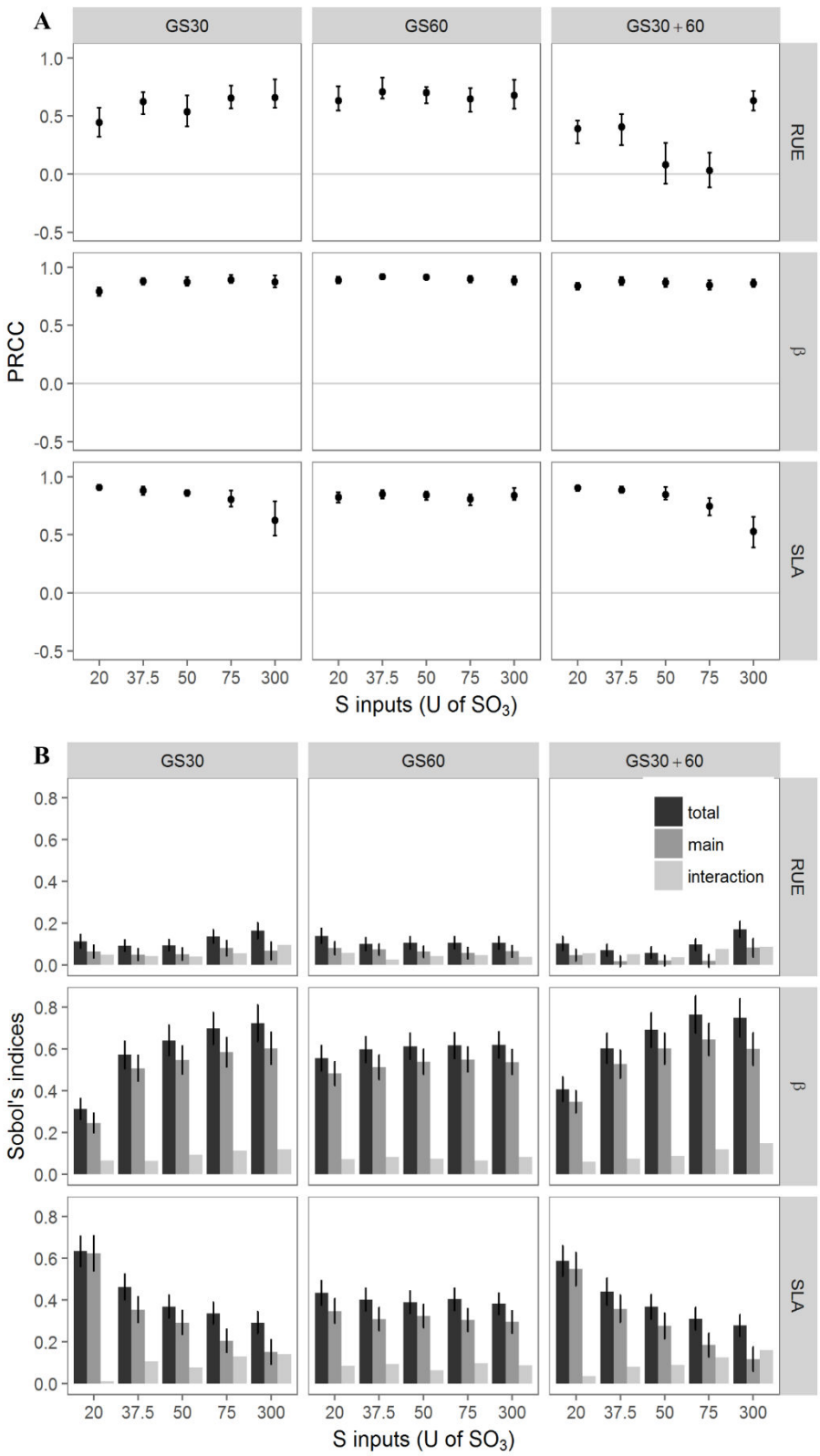
To investigate the specific impact of the 3 parameters (RUE, SLA and β), global sensitivity analyses were performed. They allowed sensitivity indices (PRCC and Sobol indices) to be calculated for the three targeted outputs under the 15 conditions. Furthermore, the Sobol indices indicated and quantified the interactions between the three parameters. By doing so, we sought to rank the plant parameters according to the impact of their variations on plant performance and to see whether the S amounts x timing designs could interfere in this ranking. The results are supported by outputs that illustrate the main processes included in the model.

III.2.a The variation in RUE was the main driver of TDW and displayed high stability across the conditions

Plant biomass at the onset of pod formation was strongly positively impacted by the variation in RUE when PRCC values were close to 1 according to the S amounts and timing conditions (**Figure IV.B.2.4-A**). Furthermore, the increase in β and SLA was positively correlated with the increase in TDW when PRCC values ranged from 0.71 to 0.86 and from 0.72 to 0.86 for β and SLA respectively under all conditions. The small range of variations in the PRCC values of RUE, β and SLA indicated that S-amounts and fertilisation timing conditions did not influence the respective impact of these three parameters on TDW. Similar conclusions could be drawn with the Sobol indices calculated for the three parameters (**Figure IV.B.2.4-B**). Among the parameters, RUE had the most impact with a mean main index of 0.85 across all conditions together, which was in contrast to the much lower main index values for β and SLA. The interaction index values were low for the three parameters indicating no interaction was detected between them (**Figure IV.B.2.4-B**).

III.2.b LAI_{GL} was mainly impacted by the C-allocation to the leaves

Both sensitivity indices indicated that mainly SLA and β highly influenced LAI_{GL} with different patterns depending on the levels of S fertilisation and timing conditions (**Figures IV.B.2.5-A** and **B**). Regarding the PRCC indices, the mean index value of RUE reached 0.52 across all conditions together and decreased in the fractioned condition (GS30+60) with S inputs below 300U. The positive β index was the highest and was unaffected by the S amount or timing conditions. Finally, SLA index values were variable under changing S amounts in the GS30 and GS30+60 conditions,

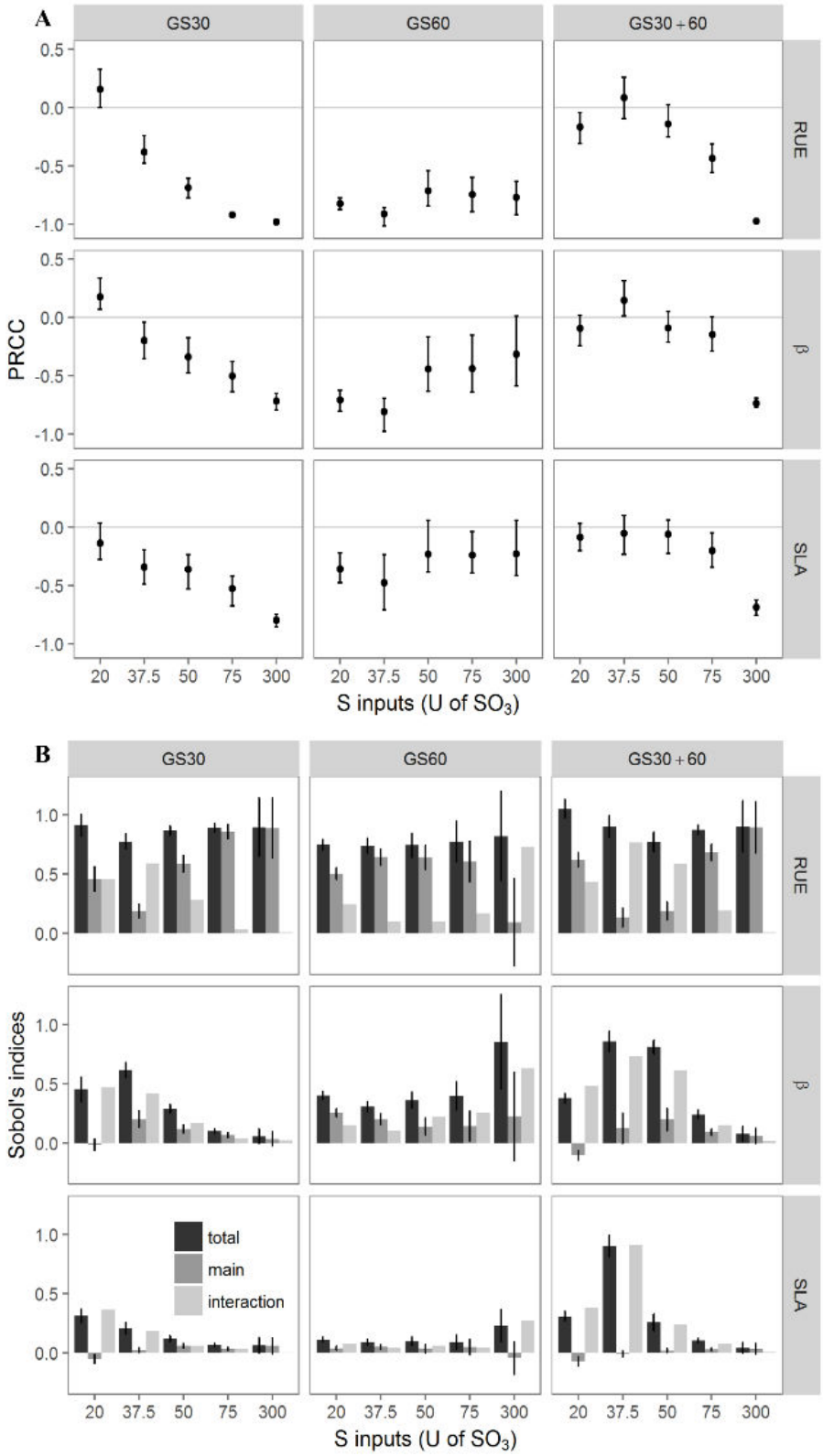


<u>Figure IV.B.2.5</u> : Impact of variation in plant parameters on LAI_{GL} described by PRCC and Sobol indices. Impact of RUE, β and SLA calculated by PRCC (**A**) and by Sobol indices (**B**) on LAI_{GL} for the 15 S-amounts x timing conditions. For Sobol indices, total indice ±SE, main indice ±SE and interaction (=total-main) are presented for each parameter and each condition (n=15).

with a decrease in the index under higher S inputs. The Sobol indices confirmed that the influence of RUE variation on LAI_{GL} was the lowest, irrespective of the S amount and the timing conditions (**Figure IV.B.2.5-B**). In contrast, the variation in β and SLA led to contrasting responses to the S amount and timing conditions. Under GS30 and GS30+60 conditions, the higher the S amount, the higher the impact of the variation in β on LAI_{GL}. For instance, the Sobol total index under the GS30 conditions increased from 0.3 to 0.7 as the amount of S increased. In contrast, under GS30 and GS30+60 conditions, the higher the S amount, the lower the impact of SLA on LAI_{GL} whose Sobol total index decreased from 0.6 to 0.3 under the GS30 conditions. Under GS60 conditions, no effect of increased S amounts was observed on the sensitivity of LAI_{GL} to the variation in β and SLA. Interaction indices were low for the three parameters meaning that there were no tight interactions between them, regardless of the S amounts and timing conditions (**Figure IV.B.2.5-B**).

III.2.c $QS_{mobile.GL}$ was strongly impacted by RUE and the impact of β and SLA were depending on S supply

The impact of the three parameters on $QS_{mobile.GL}$ was very variable according to the S amounts and the timing conditions (**Figures IV.B.2.6-A** and **B**). Both the PRCC and Sobol indices indicated the strong influence of the variation in RUE on $QS_{mobile.GL}$. The PRCC values highlighted similar patterns of sensitivity of $QS_{mobile.GL}$ to variations in RUE, β and SLA depending on the S amounts and timing conditions (**Figure IV.B.2.6-A**). PRCC values were negative and tended to get closer to 0 with low S amounts under the GS30 and the GS30+60 conditions or with high amounts of S under GS60 conditions. Therefore, the higher the S amounts when supplied at GS30 or GS30+60, the higher the negative impact of the variation in RUE, β and SLA on $QS_{mobile.GL}$. In contrast, under GS60 conditions the impacts of the variations in RUE, β and SLA was not so dependent on the S amounts because the PRCC values were more stable, with mean values of *ca*. -0.79, -0.54 and -0.31 for RUE, β and SLA, respectively, with all conditions combined. Regarding the Sobol indices, RUE was the most influential parameter in terms of total and main effects (**Figure IV.B.2.6-B**) for most of the S-amounts and timing conditions, except for the following fertilisation designs: 300U at GS60 (in this case β was the most influential), and 37.5U and 50U at GS30+60 (in these cases RUE and β were equally influential). The total index for β decreased concomitantly with the increase in the S amount at GS30 and GS30+60 (**Figures IV.B.2.6-A** and **B**) as also observed for SLA (**Figure IV.B.2.6-B**), which contradicts the PRCC indices. However, the impact of the variation in the three parameters was less influenced by the S amount when provided at GS60 with its lower Sobol indices, except in the case of 300U. The interaction indices varied for the three parameters across all S amounts and timing conditions. The interaction values decreased as the S amounts increased



<u>Figure IV.B.2.6</u> : Impact of variation in plant parameters on QS_{mobile} described by PRCC and Sobol indices. Impact of RUE, β and SLA calculated by PRCC (**A**) and by Sobol indices (**B**) on $QS_{mobile.GL}$ for the 15 S-amounts x timing conditions. For Sobol indices, total indice ±SE, main indice ±SE and interaction (=total-main) are presented for each parameter and each condition (n=15).

under GS30 and GS30+60 conditions when the S amounts were higher than 20U, but the same trend was not seen at GS60 where lower and stable interaction indices across the S amounts were observed.

III.3 Identification of optimised parameter combinations under different S-fertilisation strategies

The PRCC analyses were conducted from a random draw of 200 combinations of the 3 parameters associated with an output value. Therefore, we could identify the most relevant plant parameter combinations (i.e. optimised parameter combinations) that enabled the best plant performances under the different fertilisation strategies tested. The best plant performances were associated with high biomass (TDW) and green leaf area (LAI_{GL}) to maximise plant development and light interception and high levels of mobile S ($QS_{mobile.GL}$) to allow adequate S storage in pods. The condition where 75U of S was applied at GS30 was used as the S supply reference condition (RC). The best plant performances obtained under RC were associated to optimised parameter combinations (RC_{opt}) which were thus compared to other optimised parameter combinations under the other S supply conditions (**Table IV.B.2.3**).

III.3.a Early and fractioned S supplies allowed the highest biomass production but different optimised plant parameter combinations

When applied once at GS30, lower amounts of S than the reference condition (<75 U) led to small TDW variations even when the parameter combinations were optimised (-4% to -2% of RC_{opt}). A higher S supply rate than in the RC_{opt} (>75 U) resulted in a 13% increase in TDW with optimisation of the parameter combinations (**Table IV.B.2.3**). Whatever the S supply rate (sub and supra), the RUE values remained almost unchanged to those under RC_{opt} with a maximum threshold value of 4.58 $MJ.m^{-2}$ under RC_{opt}. In contrast, the SLA and β values were drivers of TDW variation because their variations were significant, ranging from +53% to +91% for SLA, irrespective of the amount of S and from -19% to +26% for β with increases only observed when S amount were above the RC_{opt}. Under 50 U, the TDW remained unchanged if the SLA increased by 53% to RC_{opt} and β increased by 25% compared to RC_{opt} (75 U at GS30). When applied at GS60, there was a decrease in TDW from -20% to -28% compared to RC_{opt} under all levels of S supply. When S was fractioned (GS30+60), the TDW increased from 6% to 18% under the extreme S supplies (20 and 300 U respectively) compared to RC_{opt} (75U at GS30). The fractioned condition led to the highest TDW increase even under sub amounts (50U) if SLA increased by 69% and β values were almost two times lower than under RC_{opt} (**Table IV.B.2.3**).

<u>Table IV.B.2.3</u> : Highest values of the three outputs (TDW, LAI_{GL} and $QS_{mobile.GL}$) for each of 15 S-supply conditions with optimized parameters combinations. Figures in bold give the values of the outputs and parameters under the reference condition (RC) with optimized combinations (RC_{opt}) which corresponds to 75 U of SO_3 at GS30. The other figures are given as the proportion of increase or decrease compared to the values under RC_{opt}. The equal symbol (=) means there was no difference in values with RC_{opt}.

	TDW				LAI_{GL}				$QS_{mobile.GL}$			
Total S rate supply ($kg.ha^{-1}$)	**Δ TDW**	**RUE**	**SLA**	**β**	**Δ LAI_{GL}**	**RUE**	**SLA**	**β**	**Δ $QS_{mobile.GL}$**	**RUE**	**SLA**	**β**
RC_{opt} *(75 U of SO_3 at GS30)*	**56.4**	**4.58**	**0.016**	**0.54**	**6.49**	**2.59**	**0.018**	**0.65**	**25.68**	**1.61**	**0.022**	**0.11**
Supply at GS30 (bolting)												
20	- 4 %	0 %	+ 83 %	- 19 %	- 24 %	- 35 %	+ 79 %	- 26 %	- 89 %	=	- 61 %	+ 17 %
37.5	- 2 %	- 3 %	+ 91 %	- 15 %	- 6 %	- 33 %	+ 79 %	- 3 %	- 71 %	+ 13 %	- 53 %	+ 49 %
50	=	- 1 %	+ 53 %	+ 26 %	- 2 %	- 20 %	+ 8 %	- 1 %	- 48 %	=	- 45 %	+ 83 %
300	+ 13 %	- 1 %	+ 83 %	+ 5 %	+ 8 %	+ 55 %	- 43 %	+ 3 %	+ 413 %	+ 2 %	- 49 %	+ 60 %
Supply at GS60 (flowering)												
20	- 28 %	- 4%	+ 110 %	+ 25 %	- 53 %	- 31 %	+ 87 %	- 14 %	- 75 %	+ 8%	- 19 %	+ 127 %
37.5	- 27 %	0 %	+ 65 %	- 33 %	- 50 %	- 21 %	+ 27 %	+ 8 %	- 42 %	+ 5 %	- 51 %	+ 107 %
50	- 28 %	- 2 %	+ 2 %	- 10 %	- 46 %	- 31 %	+ 79 %	+ 4 %	- 19 %	+ 7 %	+ 19 %	+ 95 %
75	- 24 %	0 %	+ 97 %	+ 11 %	- 44 %	- 33 %	+ 71 %	- 16 %	+ 31 %	+ 3 %	- 58 %	+ 181 %
300	- 20 %	- 1 %	+ 97 %	+ 3 %	- 35 %	- 27 %	+ 81 %	- 21 %	+ 436 %	+ 4 %	- 61 %	+ 130 %
Fractioned S supply GS30+60												
20	+ 6 %	- 2 %	+ 97 %	+ 4 %	- 37 %	- 1 %	+ 90 %	+ 4 %	- 98 %	+ 97 %	- 63 %	+ 178 %
37.5	+ 10 %	0 %	+ 41 %	+ 20 %	- 7 %	- 35 %	+ 42 %	+ 5 %	- 77 %	+ 5 %	- 63 %	+ 46 %
50	+ 12 %	- 2 %	+ 69 %	- 44 %	+ 2 %	- 33 %	- 2 %	- 5 %	- 41 %	+ 6 %	- 60 %	+ 9 %
75	+ 12 %	- 1 %	- 17 %	+ 7 %	+ 9 %	- 13 %	+ 2 %	+ 1 %	+ 7 %	+ 2 %	- 43 %	+ 17 %
300	+ 18 %	0 %	+ 10 %	+24 %	+ 13 %	+ 51 %	- 53 %	+ 4 %	+ 468 %	+ 6 %	- 60 %	+ 32 %

III.3.b The fractioned S supply allowed substantial increases in LAI_{GL} with moderate changes in the plant parameters

When S was supplied at GS30, LAI_{GL} decreased by 24% to 2% compared to RC_{opt} for S amounts below RC (<75 U) and increased by 8% with 300 U. The SLA values were higher whereas the RUE and β values were lower than under the RC_{opt}, except under 300 U where SLA decreased by 43%, unlike RUE and β, which increased by 55% and 3%, respectively. Whatever the S amount, β was the least impacting driver with the smallest variations (-26% to 3%) while the ranges of values for RUE and SLA were much wider, with -35% to 55% for RUE and -43% to 79% for SLA (**Table IV.B.2.3**). For S supplies at GS60, despite optimised parameter combinations, LAI_{GL} decreased regardless of the S amount, but as shown in **Figure IV.B.2.3-B** the higher the S amount, the lower the decrease. The RUE values also decreased at GS60 and the SLA values increased compared to their values under RC_{opt} (from -33% to -21% for RUE and from 27% to 87% for SLA, **Table IV.B.2.3**).

Under the fractioned supply (GS30+60), LAI_{GL} increased with 50U, 75U and 300U by 2%, 9% and 13%, respectively, with optimised parameters combinations. For S amounts lower than RC (<75U), the optimised parameter combinations led to a reduction in LAI_{GL} (or an insignificant increase, as observed under 50U).

III.3.c High $QS_{mobile.GL}$ was driven by the S amount, whatever the timing of supply, with little impact on optimised parameter combinations

Whatever the timing of supply (at GS30, GS60 or GS30+60), $QS_{mobile.GL}$ decreased for S amounts lower than the RC (<75 U) and increased when the S supply was higher than RC. As expected, the increase was significant for the 300 U supplies at GS30+60 (up to 468% higher than under RC_{opt}). The RUE and β values increased regardless of the S supply and timing compared to RC, while the SLA values decreased, except at GS60 with 50U. However, RUE values displayed the lowest increases compared to SLA and β for a given S condition. Interestingly, for amounts lower than RC (<75U), the increase in $QS_{mobile.GL}$ was higher when S was supplied once at GS60 (+31%) than twice under GS30+60 (+7%).

<u>Table IV.B.2.4</u> : Ranking of the 3 parameters according to their respective impact on TDW, LAI_{GL} and $QS_{mobile.GL}$ according to S-supply condition. This synthesis including results of the Sobol (main indices) and PRCC analyses.

Output variable	Parameter ranking according to its impact	S-fertilization strategy	Correlation	Dynamics
TDW	RUE > β ≈ SLA	whatever S amount and timing of application	RUE, SLA and β positively correlated	• Stable impact of increased RUE whatever S amount and timing • More stable impact of increased SLA and β for supplies at GS60
LAI_{GL}	SLA > β > RUE	with 20U at GS30 and at GS30+60	RUE, SLA and β positively correlated	• Stable impact of increased β whatever S amount and timing • Lower impact of increased SLA with higher S rate at GS30 and GS30+60 • Slightly higher impact of increased RUE with S rate at GS30 and lower impact of increased RUE with S rate up to 75U at GS30+60
	β > SLA > RUE	other conditions		
$QS_{mobile.GL}$	β > RUE > SLA	with 37.5U at GS30 with 300U at GS60	RUE, SLA and β negatively correlated *except RUE and β with 20U at GS30 and with 50U at GS30+60*	• Higher impact of increased RUE, SLA and β with S rates especially at GS30 and GS30+60
	RUE > SLA > β	with 20U and 300U at GS30		
	RUE > β > SLA	other conditions		

IV. Discussion

IV.1 Plant parameter rankings according to their impacts on plant performance under different S-fertilisation strategies

The three parameters (RUE, SLA and β) selected for the SAs are associated with C-metabolism and functioning. They were shown to be impacted by S supply (Brunel-Muguet *et al*., 2015b), thus leading to conclude to interactions between the C and S-related processes within the model. Our analysis highlighted that impacts on the variations (range and direction) of the outputs (TDW, LAI_{GL} and $QS_{mobile.GL}$) were parameter-specific. These impacts have been summarised in **Table IV.B.2.4**, which combines conclusions from both the PRCC and Sobol indices.

The RUE was an important driver of the variation in TDW and $QS_{mobile.GL}$. It was the most impacting parameter for TDW with a positive trend that was stable across all S supply conditions (amounts and timing), meaning that increasing its value leads to higher biomass at the onset of pod formation. There is a direct correlation between RUE and TDW from Monteith's model (Monteith and Moss, 1977), which is used in the SuMoToRI model (Brunel-Muguet *et al*., 2015b). In contrast, the two other parameters, β and SLA, had very little impact on TDW, which made sense because they directly relate to the leaves. According to the total Sobol indices, the allocation of carbohydrates to the leaves (β) was slightly more influential than the SLA (with values ranges of 0.072- 0.12 for β and 0.041 to 0.094 for SLA). Because no interactions were observed, the effective impact of a given parameter's variation was not influenced by the other parameters, which confirms that they each described distinct processes (i.e. biomass production vs. biomass allocation).

The SAs also revealed that the most impacting parameters on LAI_{GL} were β, and to a lesser extent, SLA and RUE. As expected, increased C-allocation to the leaves (β) and SLA favoured greater leaf area expansion while higher RUE had little impact. While the effect of β was stable with increasing S-amounts when S was provided at bolting alone or at bolting and flowering, the effects of SLA and RUE were influenced by the S amounts in these timing conditions. This was consistent with prior observations during the model calibration and evaluation steps that (i) led to different RUE values according to the S-supply conditions (Brunel-Muguet *et al*., 2015b) and (ii) pointed out that the SLA decreased under S-limiting conditions, meaning that the leaf thickness was greater (Brunel-Muguet, unpublished). This leaf plasticity was showed to increase the photosynthetic activity, thus setting a compensatory mechanism against drastic S limitation, which is known to impair photosynthesis and C metabolism (D'Hooghe *et al.*, 2014).

Regarding the amount of mobile S within the leaves ($QS_{mobile.GL}$), the respective impact of the parameters varied according to S supply conditions. The Sobol indices indicated that RUE was the main driver followed by β and SLA. Increasing RUE, β and SLA led to lower $QS_{mobile.GL}$, which was amplified by increases in S fertilisation when supplied either once at bolting or twice under the fractioned condition. In contrast, the impact of the three parameters was much lower under all levels of S supply at flowering. As observed, increasing the RUE favoured biomass production and consequently leaf expansion. This in turn increased the leaf S-structural requirements and thus depleted the mobile S amounts stored within the leaves. Another reason that could account for these effects is the dilution of S within the plant. As the size of the source organs increases, the concentration of S is diluted, leading to depletion of S mobile reserves. This effect of increased RUE was observed for optimal timing i.e. at bolting and in the fractioned condition. It was also lower as the S supplies decreased.

IV.2 A preliminary approach to design ideotypes adapted to specific S-fertilising strategies

In our study, we made the assumption that ideal parameter combinations combined with adequate S-fertilisation strategies should offer the most efficient plant status for achieving the reproductive phase and then high yield. Our analyses revealed that the optimised combinations for the best performance at the onset of pod formation (i.e. high biomass and green leaf area to maximise plant development and light interception and high mobile S to allow adequate S storage for growing pods) were specific to each output, thus meaning that there will be trade-offs to attain them in combination (**Table IV.B.2.3**). For instance, the optimal RUE value for the highest TDW (for the RC_{opt}) is 4.58, whereas it is 2.59 to attain the highest LAI_{GL}. Moreover, in some cases, it is crucial to consider several parameters together because of their strong interactions, as illustrated for $QS_{mobile.GL}$ (**Figure IV.B.2.6-B**).

Table IV.B.2.4 synthesises the parameter rankings for a given output (i.e. plant biomass, leaf expansion, S storage) according to the S supply strategies. It indicated that the most beneficial parameter for targeting would differ depending on whether we intended to improve plant biomass, leaf expansion or S storage within the leaves with respect to the S-fertilisation designs. Indeed, RUE was the driver of plant biomass and its impact was stable regardless of amount and timing of S-fertilisation (stage and fractioning). Leaf expansion was mainly boosted by increased C allocation to the leaves (β) and to a lesser extent by increased specific leaf area and RUE, in all S-fertilisation designs apart from low S amounts (20U) when supplied at bolting (GS30) or in the fractioned condition (GS360+690). Impacts of increased RUE and SLA differed depending on the S-

fertilisation designs. While the impact of SLA was higher with increasing rates of S-fertilisers at flowering (GS60), the impact of RUE was more pronounced in the fractioned condition with extreme amounts (20 and 300U).

These SAs revealed that the association between high biomass or leaf area, and S storage for growing was not trivial because the plant parameter drivers were distinct and the intensity of their impact was also dependent on the S fertilisation designs. Genotypes with high radiation efficiency, large light interception surfaces (per biomass unit) or high leaf biomass allocation would benefit from early and fractioned S-fertilisation strategies.

IV.3 Towards new S management strategies

These results confirm the need to think about new designs or cultural practices for S fertilisation. First, they highlighted the negative impact of delayed fertilisation (i.e. at flowering). When applied at this stage (GS60), a higher S supply could not compensate for the earlier reductions in vegetative growth. In addition, our results indicated the relevance of fractioning S supply compared to the conventional single supply at bolting, and thus broadened fertilisation schemes. In our conditions, S-fractioning led to similar plant performances at the onset of pod formation. This strategy also prevented excessive sulfate being stored in the leaves and then its potential loss when leaves detached. From an ecological and economic perspective, fractioning would allow better nutrient adjustment rather than the conventional single supply and thus help in preventing over fertilisation. Nevertheless, our results showed that even under the most optimised plant parameter combination, the increase in TDW of around 13% under the fractioned condition was obtained with the highest S supply, which ultimately moderates the sustainable effect of fractioning.

In addition, it is known that S nutrition is closely related to N nutrition in many species like oilseed rape (Abdallah *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2007; Dubousset *et al.*, 2009), wheat (Salvagiotti *et al.*, 2009; Salvagiotti and Miralles, 2008) and maize (Dawar *et al.*, 2016). Fismes *et al.* (2000) reported that in oilseed rape, the balance between the S and N rate determines their use efficiencies, which are synergistic at optimum rates and antagonistic at excessive levels of a single element. S fertilisation is known to improve N use efficiency and to maintain high seeds quality (Anjum *et al.*, 2012), thus highlighting the importance of balanced N:S ratio. In our study, the fifteen S fertilisation conditions were provided with non-limiting N supply. For the lowest S supply conditions, the N:S ratio was not as well balanced as for the conditions with the conventional S supply, which could impact crop performances. N inputs are drivers of this ratio meaning they can modulate crop responses to S supply. In this context, implementing S:N ratio thresholds in the model could help

monitor S fertilisation to better monitor effective S assimilation, which is partly determined by N availability.

V. Conclusion

A better understanding of the relationship between specific model parameters and crops at the onset of pod formation is essential to adjust cultural practices under contrasting S fertilisation management. For this purpose, we used GSAs to rank driver model parameters including RUE, β and SLA according to their impact on main output variables related to growth, leaf expansion and S remobilisation. In our study, we compared these plant parameters combinations to distinguish S-fertilisation designs. This enabled the best S-fertilisation designs to be determined under specific plant parameters combinations. This approach underscores the advantages of using adapted varieties for a specific fertilisation context. Our study also highlighted the importance of S fertilisation management in terms of the amount supplied or the timing of the application (stage and fractioning). We showed that supplying more than the recommended inputs did not lead to proportional improvements in plant biomass or leaf expansion and that delaying supply until flowering had a strong negative impact. If fractioning designs seem to be competitive with the conventional single supply (75U SO_3 at the end of winter), significant increased performance would require higher S rates. These findings reinforce the need to develop tools to measure plant S status and soil S availability *in situ*, which would help in adjusting fractioned S supplies throughout the crop cycle.

CHAPITRE IV – RÉSULTATS

B. Expérimentations numériques *in silico* avec le modèle écophysiologique SuMoToRI

B.3 Perspectives d'évolution du modèle SuMoToRI pour intégrer l'effet des interactions SxN sur la qualité des graines : synthèse des comparaisons de simulations et des données observées

Contexte : Les quantités de S dans les feuilles présentes sur la plante au début de formation des siliques constituent un pool de réserve en S potentiellement remobilisable pour les siliques et les graines en développement. De fait, la teneur en S dans les feuilles présentes sur la plante ($\%S_{GL}$) au début de formation des siliques pourrait être un proxy précoce de la qualité grainière. Sa prévision pourrait être un indicateur pertinent si les conditions de fertilisation sont bien simulées par le modèle. Étant donné les fortes interactions existant entre les métabolismes S et N, le niveau de fertilisation en N et l'apport fractionné ou retardé de S peuvent moduler les simulations avec le modèle SuMoToRI (qui ne prend pas en compte les réponses à la disponibilité en N). Ainsi, pour simuler correctement les variables de sortie, la disponibilité en N et l'effet des apports fractionné ou retardé en fertilisants S doivent être pris en compte dans les formalismes du modèle.

Objectifs : Les objectifs sont de (i) vérifier que les performances sous les modalités d'apports de fertilisants S uniques, fractionnés ou décalés sont bien simulées par le modèle, (ii) vérifier dans quelles conditions d'apports en S et N, la teneur en S dans les feuilles au début de formation des siliques est bien simulée et peut donc être un indicateur précoce et fiable de la qualité grainière, notamment de la teneur en S dans les graines, et (iii) mettre en évidence la nécessité d'intégrer les interactions SxN pour prédire les performances du colza dans des conditions limitantes en N.

Démarche expérimentale : Nous avons cherché à comparer les observations issues des différentes cultures réalisées en conditions contrôlées (Chapitre IV. A1) aux simulations réalisées dans les mêmes conditions climatiques (température et rayonnement) et d'alimentation en S. Notre démarche s'est déclinée en trois étapes (i) vérification de la pertinence de la teneur en S foliaire prédite comme indice précoce de la qualité de la graine, (ii) vérification de la précision des simulations en conditions d'apport fractionné ou retardé et (iii) estimation de la fiabilité des prévisions dans des conditions non optimales d'apport en N en vue de démontrer la nécessité d'intégrer les interactions SxN dans le modèle pour améliorer les simulations.

Résultats : Les résultats montrent que la dose de S ainsi associée à la dose de N impacte la précision des résultats des simulations du $\%S_{GL}$. Le $\%S_{GL}$ prédit par le modèle est un bon proxy de la qualité protéique des graines (% de S dans les graines) uniquement en conditions non limitantes en N. Pour que la valeur simulée de la teneur en S des feuilles au début de formation des siliques soit un proxy fiable de la qualité protéique des graines quel que soit le schéma de fertilisation S et N utilisé, il est nécessaire d'intégrer au modèle de nouveaux formalismes prenant en compte la disponibilité en N et les interactions SxN. Il serait par ailleurs intéressant de mieux prendre en compte les effets associés à des apports fractionnés ou retardés en S lors de la phase d'extension du modèle (jusqu'à maturité des graines), en raison d'une gestion des réserves en S par la plante différente de celle lors d'un apport unique, ce qui peut impacter *in fine* la qualité protéique des graines

B.3 Perspectives d'évolution du modèle SuMoToRI pour intégrer l'effet des interactions SxN sur la qualité des graines : synthèse des comparaisons de simulations et des données observées

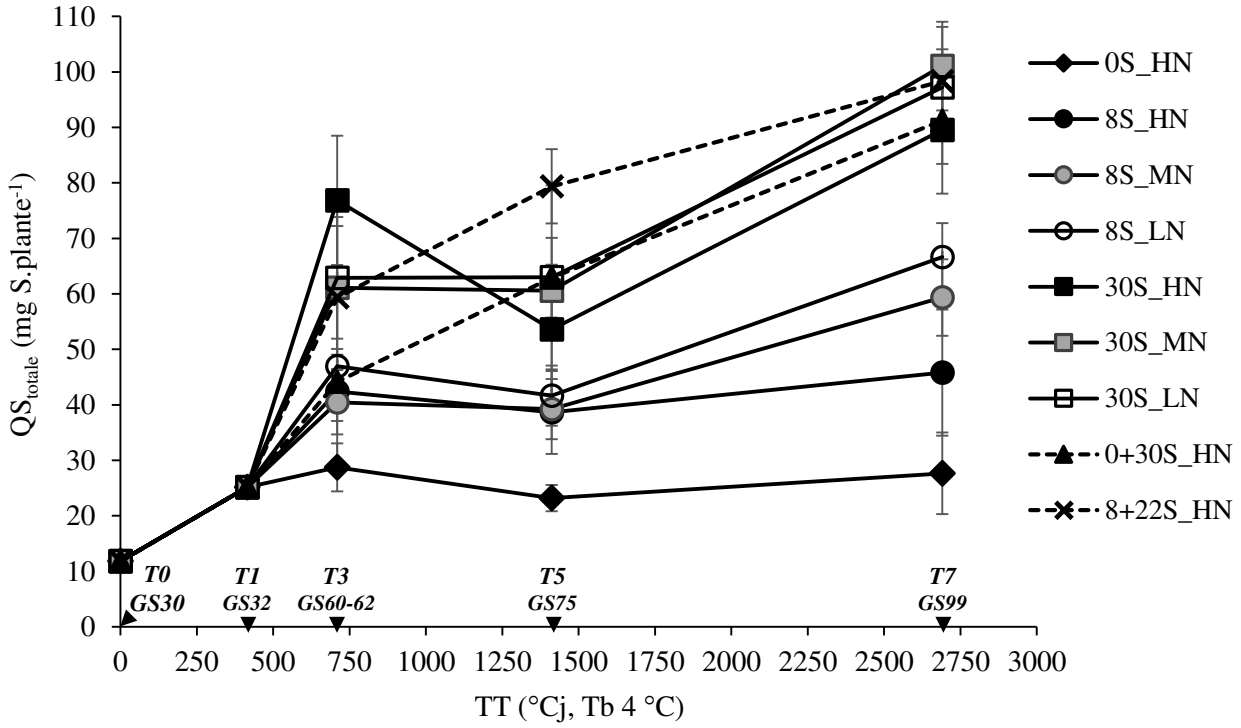
I. Introduction et objectifs

La culture en serre réalisée au cours de cette thèse comprend plusieurs traitements différant par la dose et la date des apports en fertilisants S et en N (voir les **Chapitres III.A.I.1** et **IV.A.1**). Elle a permis d'apporter des nouveaux jeux de données conséquents, intégrant les effets des interactions SxN et du fractionnement ou du retard de l'apport en S. Il semblait donc intéressant d'utiliser ces données pour réaliser des simulations avec le modèle SuMoToRI afin (i) de comparer les observations issues des différents traitements réalisés en conditions contrôlées aux simulations effectuées dans les mêmes conditions climatiques (température et rayonnement) et d'alimentation en S, (ii) de vérifier si les performances sous les modalités d'apports fractionnés ou décalés sont bien simulées par le modèle et (iii) de mettre en évidence la nécessité d'intégrer les interactions SxN pour prédire les performances du colza dans des conditions limitantes en N.

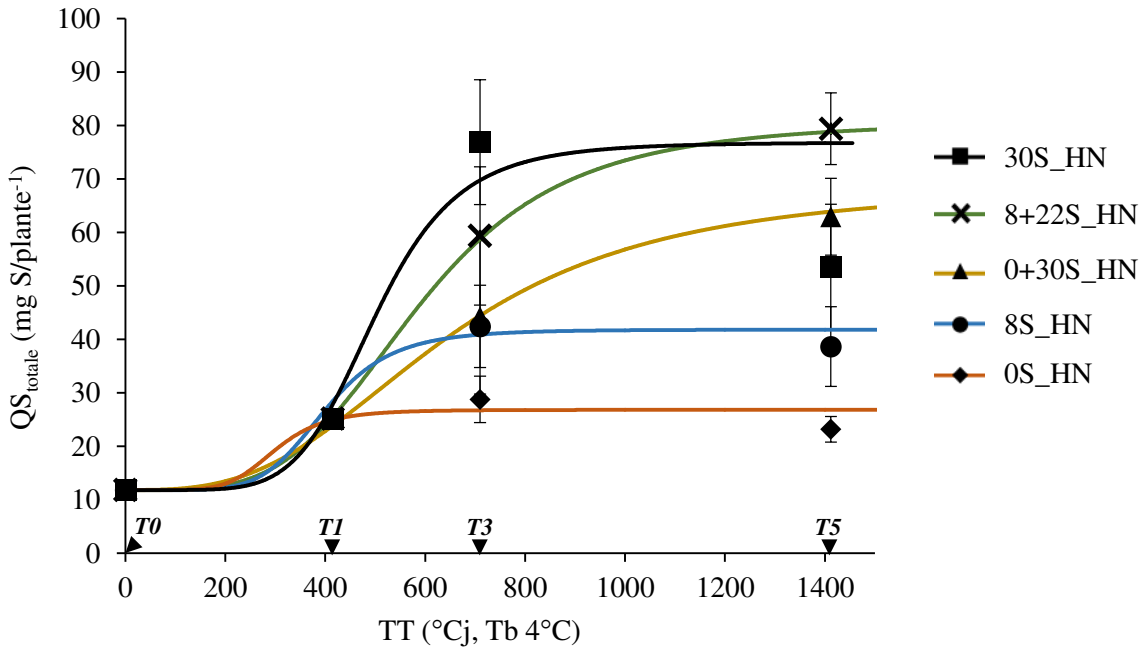
Une autre perspective du modèle SuMoToRI est son utilisation en tant qu'outil de prédiction de la qualité des graines. Dans l'hypothèse que la teneur en S dans les feuilles au début de la formation des siliques est un indicateur précoce fiable de la qualité grainière, notre démarche a cherché à :

i. Identifier les conditions nutritionnelles pour lesquelles le modèle simule bien la teneur en S dans les feuilles (qui a été la seule variable associée au S pour laquelle nous avons disposé des données observées contrairement à la teneur en sulfate)
ii. Corréler les teneurs en S simulées dans les feuilles avec les teneurs en S observées ou simulées dans les graines à maturité.

Dans un premier temps, nous avons comparé les observations issues des conditions non limitantes en N et pour lesquelles l'apport en S a été réalisé en une fois au stade GS32 (0S_HN, 8S_HN, 30S_HN) avec les simulations réalisées avec les fonctions de prélèvements correspondantes. Puis, nous avons confronté les observations issues des conditions non limitantes en N et pour lesquelles les apports en S ont été retardés (GS53) ou fractionnés (GS32 et GS53) (0+30S_HN et 8+22S_HN) avec les simulations réalisées avec les fonctions de prélèvements correspondantes dans l'objectif de vérifier si les performances sous les modalités d'apport retardé ou fractionné en S étaient bien simulées. Enfin, nous avons confronté les observations issues des conditions limitantes en N (0S_LN, 8S_LN, 30S_LN, 8S_MN et 30S_MN) avec les simulations



<u>Figure IV.B.3.1</u> : Quantités de S total dans la plante sans les feuilles chutées (QS_{totale}) observées aux dates de récolte T0 (0 °Cj, degré jour), T1 (415 °Cj), T3 (709 °Cj), T5 (1412 °Cj) et T7 (2690 °Cj) pour les 9 traitements de l'expérimentation en conditions contrôlées (0S_HN, 8S_HN, 8S_MN, 8S_LN, 30S_HN, 30S_MN, 30S_LN, 0+30S_HN et 8+22S_HN). Les valeurs correspondent à la moyenne ± ET (n = 5, sauf à T1, à T3 pour 30S_LN, à T5 pour 8S_MN, 30S_MN, 8S_LN et 30S_LN et à T7 pour 8S_HN où n = 4). Les symboles ont été reliés afin de mieux visualiser la cinétique de prélèvement du S. Le stade de développement du colza est indiqué pour chaque date de récolte (Lancashire *et al.*, 1991). Le TT correspond à TT °Cj après vernalisation. Tb : température de base ; (Morrisson *et al.*, 1989).



<u>Figure IV.B.3.2</u> : Ajustements des cinétiques de prélèvement en S (traits) d'après les données observées (marqueurs) pour les conditions non limitantes en N (0S_HN, 8S_HN, 30S_HN, 0+30S_HN et 8+22S_HN). Les valeurs observées (Figure IV.1, quantité de S dans la plante sans les feuilles chutée) correspondent à la moyenne ± ET (n = 5, sauf à T1, à T3 pour 30S_LN et à T5 pour 8S_MN, 30S_MN, 8S_LN et 30S_LN où n = 4). L'ajustement et le paramétrage suit une fonction de Hill dont les paramètres sont présentés dans le Tableau IV.B.3.1. Le TT correspond à TT °Cj après vernalisation. Tb : température de base, Morrisson *et al.*, (1989).

réalisées avec les fonctions de prélèvement en S correspondantes (même dose en S) en condition non limitante en N pour confirmer l'importance d'intégrer les interactions SxN dans le modèle afin d'améliorer les simulations. Ces résultats nous ont également permis de discuter plus largement de la pertinence d'utiliser la teneur en S dans les feuilles, simulée ou observée, comme « proxy » de la qualité protéique des graines.

II. Matériels et méthodes

II.1 Données climatiques, initialisation du modèle et paramétrage

II.1.a Acquisition des variables d'entrées : données climatiques et fonctions de prélèvement en S

Les données climatiques nécessaires pour les simulations sont la température et le rayonnement. Ces données ont été mesurées et enregistrées par des capteurs, à raison d'une mesure toutes les 10 minutes tout au long de la culture. Les données enregistrées chaque jour ont été utilisées pour calculer la température moyenne dans la serre (en °C) et le rayonnement global (Rg) moyen journalier dû aux radiations solaires extérieures (Rg, $W.m^{-2}.jour^{-1}$). Le Rg a été convertit en PAR ($MJ.m^{-2}.jour^{-1}$) selon la formule suivante (Gosse *et al.*, 1986; Varlet-Grancher *et al.*, 1982) :

$$PAR = 0{,}48 \times Rg \times 10^{-6} \times 3600 \times 24$$

Les plantes ont été récoltées régulièrement (voir méthodologie de récolte dans le **Chapitre III.A section I.1.c**) à des dates recouvrant la phase de prédiction du modèle (T0 à T7). Les simulations avec le modèle SuMoToRI débutent à la sortie de l'hiver, c'est-à-dire à la sortie de la période de vernalisation pour notre culture en serre ce qui correspond au temps T0 (08/03/2016), et se terminent 970 °C jours après la sortie d'hiver (température de base Tb = 4°C, (Morrison *et al.*, 1989), soit au temps T4 (28/04/2016).

Le S prélevé de façon journalière par la plante est une variable d'entrée du modèle. Ainsi, pour que les cinétiques de prélèvement en S correspondent aux différentes conditions de fertilisation S utilisées lors de l'expérimentation en serre, il a été nécessaire de réaliser des courbes d'ajustement des quantités prélevées observées. Ces quantités en S dans la plante ont été mesurées pour plusieurs dates de récolte (T1, T3, T5 et T7) par EA-IRMS et/ou fluorescence à rayons-X (XRF) pour les 9 traitements (n = 5, sauf à T1, à T3 pour 30S_LN, à T5 pour 8S_MN, 30S_MN, 8S_LN et 30S_LN et à T7 pour 8S_HN où n = 4) (**Figure IV.B.3.1**). Les quantités de S dans la plante au temps T0 ont été estimées à partir de la matière fraîche à T0 et des teneurs en S dans la matière sèche des échantillons à la date suivante (échantillons perdus pour cause technique, panne de congélateur

Tableau IV.B.3.1 : Valeurs des paramètres des fonctions de prélèvement pour les traitements non limitants en N (fonction de Hill).

Condition de fertilisation S	QS_{max}	n	K_a
0S_HN	15	6	300
8S_HN	30	6	400
30S_HN	65	6	500
0+30_HN	57	3	644
8+22S_HN	69	4	588

Tableau IV.B.3.2 : Valeurs initiales des variables et des paramètres utilisées pour les simulations.

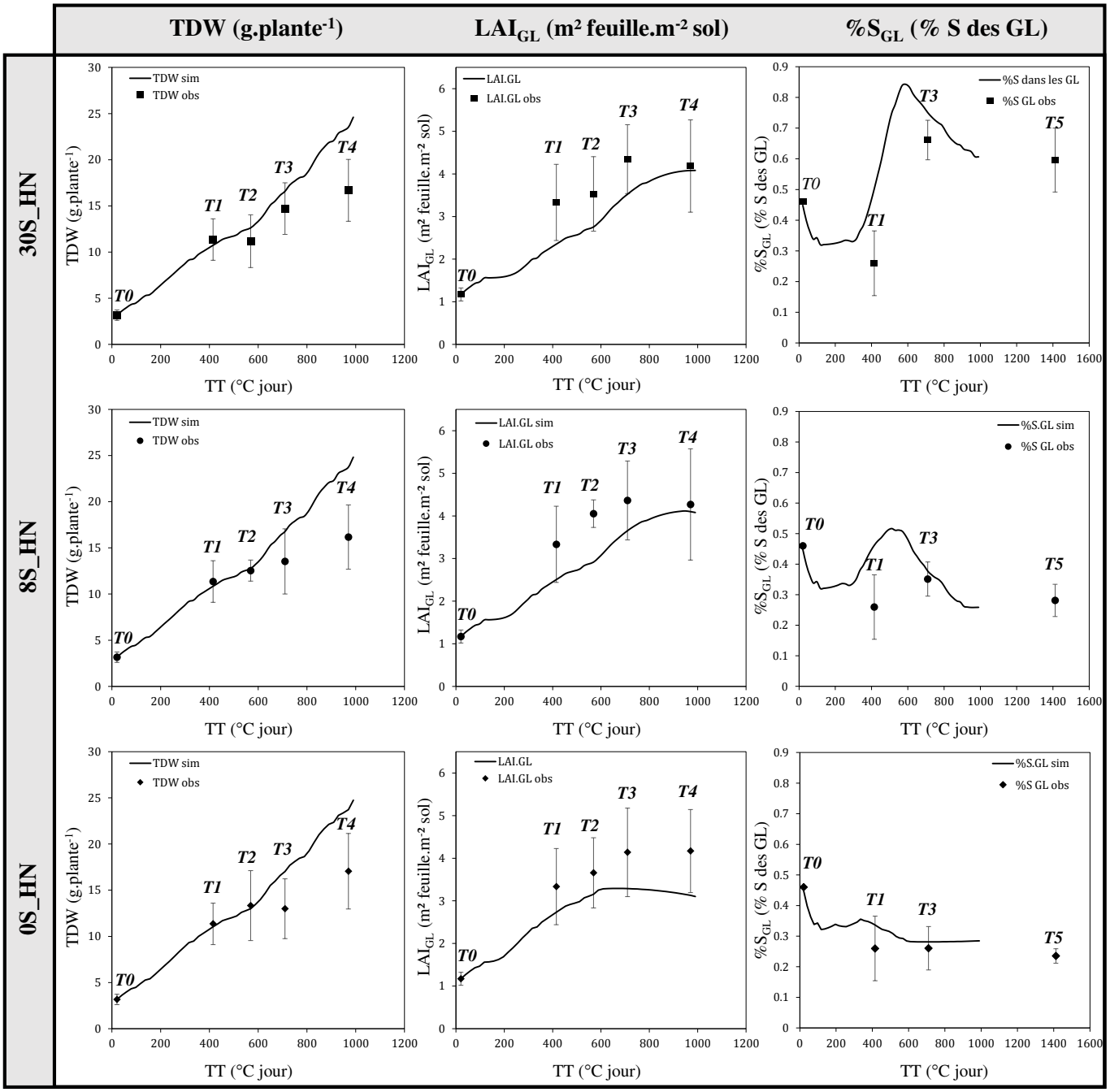
Symbol	Definition	Value	Unit	Source
sd	Sowing density	18	Plant.m²	
PAR interception				
k	PAR extinction coefficient	0.75	m² m^{-2}	Bonhomme *et al*. 1982
Potential leaf growth				
LA_0	Initial leaf area of photosynthetic leaves	0.065	m² $plant^{-1}$	Estimated
LA_{max}	Leaf area expansion parameters	0.2	m² $plant^{-1}$	
K		872.96	°Cd^{-1}	
N		6.31	dimensionless	
C acquisition and plant offer				
$PARabs_{ini}$	Initial absorbed PAR	0	MJ m^{-2}	Estimated
TDW_{ini}	Initial total dry weight	3.16	g DW $plant^{-1}$	
$DW_{FL.ini}$	Initial dry weight of fallen leaves	0	g DW $plant^{-1}$	
RUE	**Radiation use efficiency**	**1.5**	**g DW MJ^{-1}**	
$aLDW_{FL}$	Parameters of the function describing the time progression of LDW_{FL}	0.0092	g DW $plant^{-1}$ °Cd^{-1}	
$bLDW_{FL}$		0.0043	dimensionless	
C allocation to leaves				
β	**Coefficient of DW allocation to the leaves**	**0.45**	**dimensionless**	Estimated
C demand of green leaves				
$LDW_{GL.ini}$	Initial dry weight of green leaves	2.004	g DW $plant^{-1}$	Estimated
SLA	**Specific leaf area**	**0.028**	**m² g DW^{-1}**	
Growth S demand				
αGL	Parameters to estimate critical S content in GL as a function of LDWGL	5.11	mg S $plant^{-1}$	Estimated
βGL		-0.52	dimensionless	
αrest	Parameters to estimate critical S content in the rest of the plant as a function of DWrest	1.83	mg S $plant^{-1}$	
βrest		-0.004	dimensionless	
Potential mobile S allocation				
εpot	Coefficient of potential repartition of mobile S to the leaves	0.8	dimensionless	Estimated
S uptake				
$QS_{TOT.ini}$	Initial total S uptake	11.812	mg S $plant^{-1}$	Estimated
$QS_{GL.ini}$	Initial S in green leaves	9.22	mg S $plant^{-1}$	
$QSrest_{ini}$	Initial S in fallen leaves	2.59	mg S $plant^{-1}$	

– 80 °C). Ces mesures ont permis d'acquérir des cinétiques de prélèvement depuis la date de sortie d'hiver (T0) jusqu'à la date de récolte T5 (au-delà de la phase de prédiction du modèle, approchée par la date de récolte T4) par des fonctions de Hill (comme détaillé dans les **Chapitres III.B.I.2** et **IV.B.2**) ceci pour les cinq conditions non-limitantes en N (0S_HN, 8S_HN, 30S_HN, 0+30S_HN et 8+22S_HN, **Figure IV.B.3.2**). À chaque condition est associée une fonction de Hill ayant des valeurs de paramètres spécifiques (QS_{max}, K_a et n, **Tableau IV.B.3.1**).

II.1.b Valeurs initiales et paramétrage

Les simulations commencent à la sortie de l'hiver (T0) où les plantes sont sous forme de rosette et possèdent entre 6 et 8 feuilles. Les différentes valeurs initiales correspondent aux valeurs moyennes observées (LA_0) ou estimées (TDW_{ini}, $LDW_{GL.ini}$, $QS_{TOT.ini}$, $QS_{GL.ini}$ et $QS_{rest.ini}$) à partir des matières fraîches (n = 5) de la culture en serre pour le temps T0 (**Tableau IV.B.3.2**). Toutes les valeurs initiales sont les mêmes quel que soit le traitement puisque le protocole de culture a été identique avant la sortie d'hiver pour tous les traitements. En effet, les différents traitements nutritionnels sont appliqués à partir du temps T1 (415°Cj après la vernalisation) qui marque ainsi la date à laquelle les plantes peuvent être différenciées entre les traitements. Le $PARabs_{ini}$ et le $DW_{FL.ini}$ ont été initialisés à 0 comme pour la version originale du modèle. Le paramétrage du modèle reprend celui utilisé pour la calibration du modèle (Brunel-Muguet *et al.*, 2015b) à l'exception de la valeur de la RUE. Dans le paramétrage du modèle, il est attribué deux valeurs de RUE différentes selon le niveau de disponibilité en S. Les plantes ayant les mêmes valeurs initiales tous traitements confondus, nous avons retenu une seule valeur générique plus faible que les valeurs de calibration (1,5 au lieu de 4,59 et 3,11 pour les conditions non limitantes et limitantes en S, respectivement) comme souvent retrouvée dans d'autres études (Gabrielle *et al.*, 1998b; Gosse *et al.*, 1986). La valeur de la RUE est très dépendante de la période du cycle pendant laquelle elle a été mesurée. En effet, Kuai *et al*. (2015) ont montré que la RUE mesurée était positivement corrélée avec la biomasse et était donc plus faible entre le semis et le début de floraison puis augmentait entre le début de floraison jusqu'à la fin de floraison et la maturité des graines. Cette valeur a permis d'obtenir de meilleures simulations (limitant les écarts aux observations). Enfin, la densité de la culture en serre est de 18 plantes.m^{-2}.

Les variables observées disponibles qui ont été retenues pour être comparées aux valeurs simulées sont : la biomasse totale (TDW, g.$plante^{-1}$), l'indice de surface foliaire des feuilles vertes (ou GL pour « green leaves ») (LAI_{GL}, m² feuilles.m^{-2} sol) et la teneur en soufre dans les feuilles vertes ($\%S_{GL}$, teneur exprimée en % de S dans la matière sèche des GL), étant donné que les quantités de sulfate dans les GL n'ont pas été mesurées. Les variables TDW et LAI_{GL} sont



<u>Figure IV.B.3.3</u> : Observations (symboles) et simulations obtenues avec le modèle SuMoToRI (lignes continues) de la biomasse totale (incluant les FC, TDW, g.plante^{-1}), de l'indice de surface foliaire des feuilles vertes (LAI_{GL}, sans dimension, m² feuille.m^{-2} sol) et de la teneur en S des feuilles vertes ($\%S_{GL}$, % de S des GL) pour les 3 conditions d'apport en S en une fois à GS32 (415 °C jour après vernalisation) et non limitantes en N (HN). 0S_HN : 0 U S à GS32, 8S_HN : 8 U S à GS32 et 30S_HN : 30 U S à GS32. Les feuilles vertes (GL) correspondent au pool des feuilles sénescentes, matures et jeunes. Les valeurs observées correspondent à la moyenne ± ET (n = 5, sauf pour 30S_LN où n = 4). T0 : 0 °Cj, T1 : 415 °Cj, T2 : 569 °Cj, T3 : 709 °Cj, T4 : 970 °Cj, T5 : 1412 °Cj. Les valeurs observées des temps T2 et T4 n'étant pas disponibles pour les $\%S_{GL}$, il a été ajouté la valeur observée au temps T5 (1412°Cj) afin de visualiser son évolution future.

disponibles pour toutes les dates d'observation, alors que la teneur $\%S_{GL}$ est uniquement disponible pour les temps T0, T1, et T3 (ainsi que les temps T5 et T7 qui dépassent la période de prédiction du modèle).

Les simulations ont été réalisées avec la version du modèle intégrant les fonctions de prélèvement de Hill, utilisée également pour les analyses de sensibilité (**Chapitre IV.B.2**).

III. Résultats

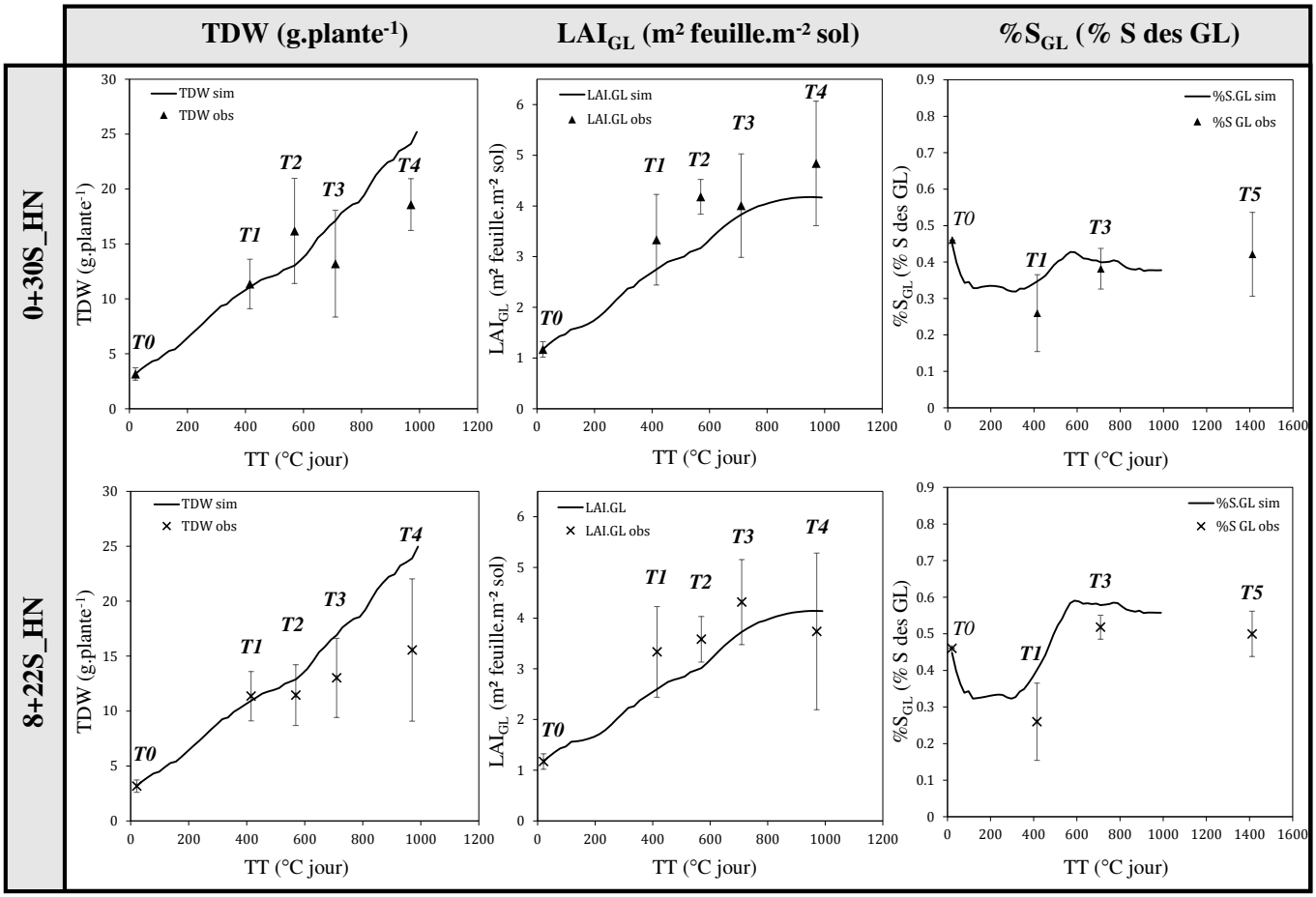
III.1 Comparaison des observations et des simulations en condition non limitante en N

III.1.a Apport unique de S à GS32

La **Figure IV.B.3.3** présente pour les conditions 30S_HN, 8S_HN et 0S_HN les valeurs observées (symboles) et les simulations (lignes continues) de la biomasse totale (incluant les feuilles chutées ; TDW, g.plante^{-1}), de l'indice de surface foliaire des feuilles vertes (LAI_{GL}, m² feuille.m^{-2} sol) et de la teneur en S dans les feuilles vertes ($\%S_{GL}$, % de S des GL) de la fin de la vernalisation jusqu'au début de formation des siliques. Les biomasses observées pour ces trois conditions ne sont pas significativement différentes, quel que soit le stade de développement entre T0 et T4, atteignant en moyenne 16,5 g.plante^{-1} à T4 (970 °Cj). Les biomasses sont bien simulées de T0 à T3 mais surestimées à partir de T4. Par exemple, la biomasse observée à T4 pour 30S_HN est de 16,6 g.plante^{-1} alors que la biomasse simulée est de 23,5 g.plante^{-1} (+ 40 %). On peut souligner que le niveau d'apport de S n'impacte pas la biomasse entre le temps T0 et T4, ce que l'on observe également par les simulations.

La cinétique de l'indice de surface foliaire (LAI_{GL}) est bien simulée mais les valeurs sont légèrement sous-estimées par le modèle. Contrairement à la condition 0S_HN où le LAIGL est sous-estimé à T4 (3,1 simulé pour 4,1 observé), pour les conditions 30S_HN et 8S_HN, les simulations du LAI_{GL} à T4 sont très satisfaisantes (par exemple pour la condition 30S_HN, la sous-estimation n'est que de – 2,1 %). Cependant, il peut être noté que les écart-types sont assez importants, montrant une forte variabilité entre les plantes d'une même date de récolte pour une même modalité. Comme pour la biomasse totale, le LAI_{GL} n'est pas significativement différent entre les 3 conditions (bien que légèrement plus faible en 0S_HN) et atteint à T4 une valeur de 4,2 ; 4,3 et 4,1 m².m^{-2} pour les conditions 30S_HN, 8S_HN et 0S_HN respectivement. Les simulations rendent également compte de ces effets.

La teneur en S dans les feuilles vertes est dans l'ensemble surestimée pour les trois conditions, de façon plus importante au temps T1 (+ 92 %, + 78 % et + 30 % respectivement pour 30S, 8S et



<u>Figure IV.B.3.4</u> : Observations (marqueurs) et simulations obtenues avec le modèle SuMoToRI (lignes continues) de la biomasse totale (incluant les FC, TDW, g.plante^{-1}), de l'indice de surface foliaire des feuilles vertes (LAI_{GL}, sans dimension, m² feuille.m^{-2} sol) et de la teneur en S des feuilles vertes ($\%S_{GL}$, % de S des GL) pour les conditions d'apport en S fractionnée (8+22S_HN) ou retardée (0+30S_HN) et non limitantes en N (HN). 8+22S_HN : 8 U S à GS32 (415 °C jour) + 22 U S à GS53 (569 °C jour), 0+30S_HN : 30 U S à GS53 (569 °C jour). Les feuilles vertes correspondent au pool des feuilles sénescentes, matures et jeunes. Les valeurs observées correspondent à la moyenne ± ET (n = 5, n = 4 pour 30S_LN). T0 : 0 °Cj, T1 : 415 °Cj, T2 : 569 °Cj, T3 : 709 °Cj, T4 : 970 °Cj, T5 : 1412 °Cj. Les valeurs observées des temps T2 et T4 n'étant pas disponibles pour les $\%S_{GL}$, il a été ajouté la valeur observée au temps T5 (1412 °C jour) afin de visualiser son évolution future.

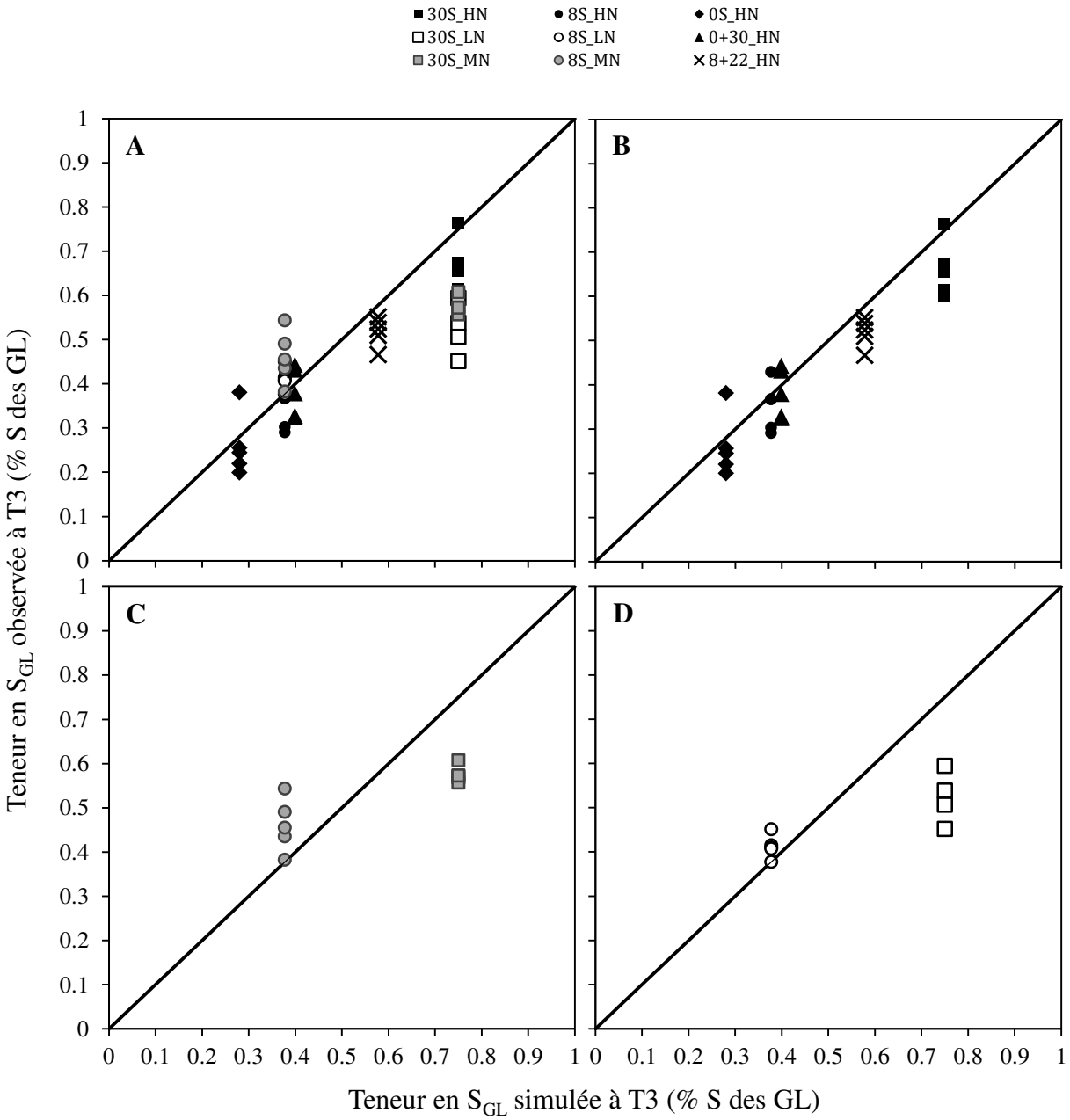
0S_HN) et moins importante au temps T3 (+ 14 % pour 30S_HN et + 8 % pour 8S et 0S_HN). Comme attendu et observé, plus l'apport en S est important, plus le $\%S_{GL}$ augmente, atteignant son maximum vers 600°Cj pour la condition 30S (0,84 % de S en moyenne), vers 550°Cj pour la condition 8S (0,5 % en moyenne) et encore plus tôt vers 350°Cj pour la condition 0S (0,35 % en moyenne). Les valeurs observées au temps T4 n'étant pas disponibles, les valeurs observées à T5 ont été ajoutées afin d'avoir un point de comparaison de cinétique supplémentaire pour suivre la tendance. Les valeurs observées indiquent une chute du $\%S_{GL}$ entre les temps T3 et T5 pour les conditions 30S, 8S et 0S_HN respectivement de – 9,3 ; − 20,3 et – 7,8 %. Les simulations semblent prendre en compte certaines de ces variations où le $\%S_{GL}$ diminue de – 20 %, de – 30 % et stagne à une valeur de 0,28 % de S dans les GL entre T3 et T4 pour les conditions 30S, 8S et 0S_HN respectivement.

III.1.b Apport de S retardé ou fractionné

La **Figure IV.B.3.4** présente pour les conditions 0+30S_HN et 8+22S_HN les valeurs observées (symboles) et les simulations (lignes continues) des trois variables de sorties illustrant les performances (*i.e.* TDW, LAI_{GL} et $\%S_{GL}$) depuis la fin de la vernalisation jusqu'au début de formation des siliques. Les biomasses totales observées et simulées des conditions 0+30S_HN et 8+22S_HN sont semblables aux conditions 0S, 8S et 30S_HN. À partir du temps T4, on observe une surestimation de la biomasse (+ 36 %) d'autant plus prononcée pour la condition 8+22S_HN (+ 60 %). Quelle que soit la condition d'apport en S (dose, fractionnement ou retard), la cinétique de la biomasse n'est pas affectée entre les temps T0 et T4 et est relativement bien simulée jusqu'au temps T3.

La cinétique de LAI_{GL} est bien simulée pour les deux conditions 0+30S et 8+22S_HN. Comparé aux observations, le LAI_{GL} simulé à T4 est légèrement sous-estimé pour la condition 0+30S_HN (4,8 observé contre 4,2 simulé soit – 12,5 %) et légèrement surestimé pour la condition 8+22S_HN (3,7 observé contre 4,1 simulé soit + 10,8 %).

La cinétique du $\%S_{GL}$ est assez bien simulée pour les conditions fractionnée et retardée d'apport en S et dans les valeurs sont surestimées surtout à T1 (+ 34 % et + 54 % respectivement pour 0+30S et 8+22S_HN). Pour les conditions 0+30S_HN et 8+22S_HN respectivement, les valeurs observées au temps T3 sont de 0,38 et 0,52 % et les valeurs simulées de 0,4 et 0,58 % de S dans les GL (soit respectivement + 5 % et + 11 %). Le $\%S_{GL}$ entre T3 et T5 augmente (+ 10 %) pour la condition 0+30S_HN et diminue très légèrement pour la condition 8+22S_HN (− 3,6 %). Cependant, les $\%S_{GL}$ simulés représentent bien les observations et restent stables ou diminuent très légèrement entre T3 et T4 pour les deux conditions (− 1 % et – 3,6 % respectivement pour 0+30S et 8+22S_HN).



<u>Figure IV.B.3.5</u> : Comparaison entre les teneurs de S simulées et observées dans les feuilles vertes (%S_{GL}, % de S des GL) au temps T3 (709 °C jour) toutes conditions d'apport en S et N confondues (A), pour les conditions non limitantes en N (HN, B), pour les conditions d'apport moyen en N (MN, C) et pour les conditions limitantes en N (LN, D). Les valeurs simulées en conditions 8S_HN et 30S_HN ont été associées respectivement aux valeurs observées en conditions 8S_MN et 8S_LN et en conditions 30S_MN et 30S_LN (n = 5, sauf pour 30S_LN où n = 4). La droite d'équation x = y indique un rapport entre la valeur simulée et observée égal à 1, correspondant à une simulation correspondant exactement à l'observation.

III.2 Comparaison entre les observations issues des conditions limitantes en N et les simulations réalisées avec les fonctions de prélèvement en S correspondantes

Afin de déterminer avec quelle ampleur des conditions d'alimentation différentes en N pour un même apport de S modifiaient les simulations avec le modèle SuMoToRI, nous avons comparé les simulations réalisées en conditions HN (97,2 U de N) avec les observations correspondant aux conditions LN (Low Nitrogen ; 28,4 U de N) et MN (Mid Nitrogen ; 72,7 U de N) pour un même apport de S (8 ou 30 U S) à GS32. Nous avons donc fait l'hypothèse que des écarts entre les observations en conditions LN et MN et les simulations (en conditions HN) démontreraient les limites du modèle à rendre compte des performances en conditions limitantes en N.

Au temps T3, pour une teneur moyenne en S dans les feuilles vertes (%S_{GL}) observée à 0,26 % ± 0,07 pour 0S_HN ; 0,35 % ± 0,06 pour 8S_HN et 0,66 % ± 0,06 pour 30S_HN, le modèle simule respectivement une valeur de 0,28 (+ 7,7 %) ; 0,38 (+ 8,6 %) et 0,75 % (+ 13,6 %) de S dans les GL (**Figure IV.B.3.5-B**). Les simulations surestiment légèrement le %S_{GL} pour les 3 conditions, plus fortement pour la condition 30S. En condition MN (75 % de HN), les observations sont plus variables pour la modalité 8S (en moyenne 0,46 % ± 0,06 de S dans les GL) que pour la modalité 30S (en moyenne 0,57 % ± 0,02 de S dans les GL). Les simulations sous-estiment le %SGL en condition 8S (− 17,4 %) et la surestiment en condition 30S (+ 31,6 %). En condition LN (30 % de HN), les observations sont, à l'inverse de la condition MN, plus variables pour la modalité 30S (en moyenne 0,52 % ± 0,06) que pour la modalité 8S (en moyenne 0,41 % ± 0,03). Les simulations sous-estiment légèrement le %SGL en condition 8S (− 7,3 %) et la surestiment en condition 30S (+ 44,2 %). Globalement, la teneur en S des GL est sous-estimée pour un apport de 8 U de S sous les conditions LN et MN (valeurs observées comprises entre 0,38 et 0,54 % pour une valeur simulée de 0,38 % de S dans les GL) alors qu'elle est surestimée pour un apport de 30 U de S (valeurs observées comprises entre 0,45 et 0,60 % de S dans les GL pour une valeur simulée de 0,75 % de S dans les GL). **Ces observations montrent que la condition d'alimentation en N impacte les flux de S dans la plante et par conséquent module la teneur en S dans les feuilles vertes. Ces résultats justifient l'usage du modèle dans des conditions non limitantes en N et la nécessité d'apporter de nouveaux formalismes rendant compte des interactions SxN.**

Concernant les conditions d'apport fractionné ou retardé en S, à T3, pour une teneur moyenne en S dans les feuilles vertes observée à 0,38 % ± 0,06 pour 0+30S_HN et 0,52 % ± 0,03 pour 8+22S_HN, le modèle simule respectivement une valeur de 0,39 et 0,58 % de S dans les GL (**Figure IV.B.3.5-B**). Le %S_{GL} est donc très légèrement surestimé pour la condition 0+30S_HN (+ 2,6 %) et un peu plus pour la condition 8+22S_HN (+ 11 %).

IV. Discussion

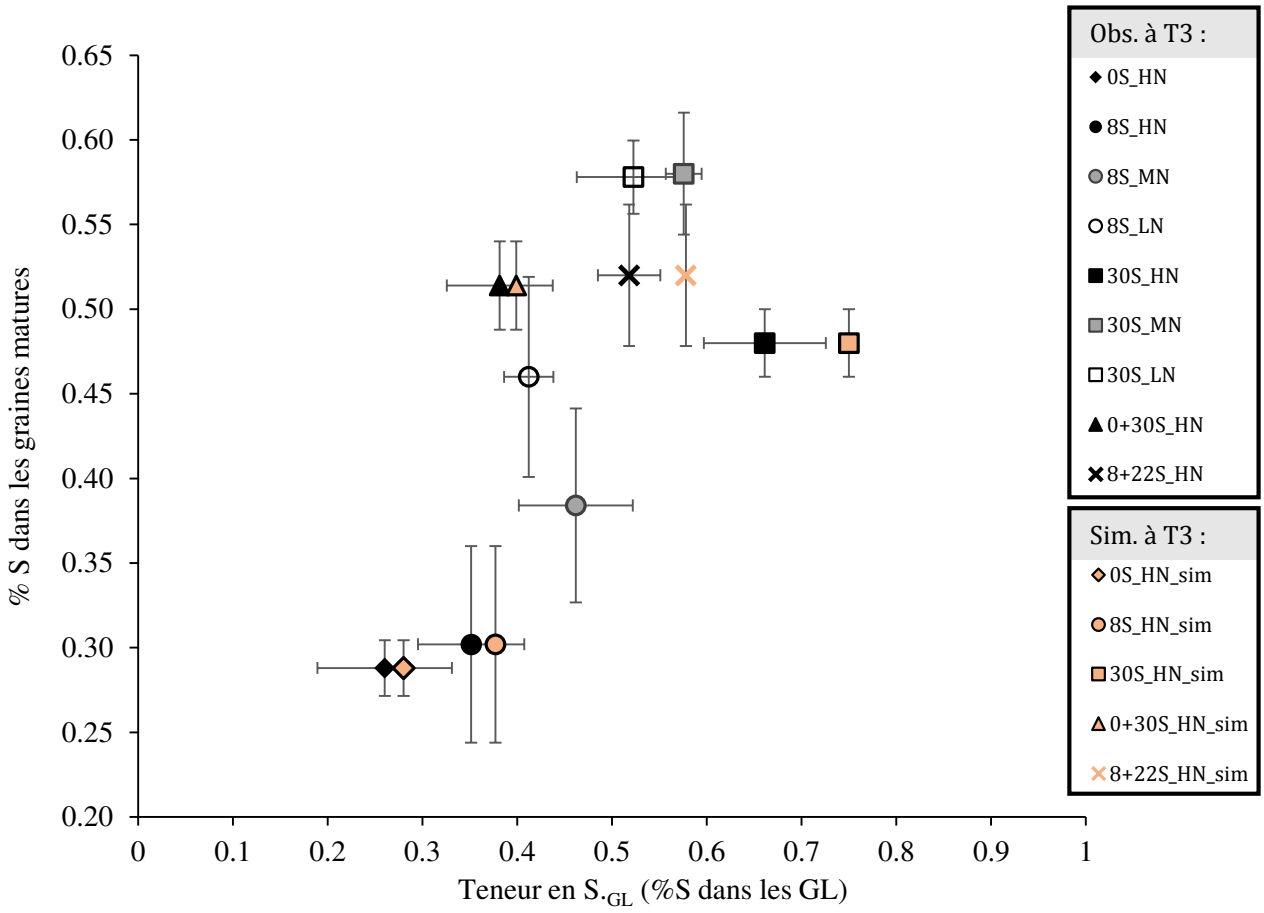
IV.1 Des pistes pour l'amélioration des simulations avec le modèle SuMoToRI

Au regard des observations et des simulations sous les cinq conditions de fertilisation S (différant par la quantité et les modalités d'apports *i.e.* retard ou fractionnement), on constate que la biomasse totale ainsi que le LAI_{GL} sont très peu variables entre les différentes conditions à l'inverse de la teneur en soufre dans les feuilles vertes ($\%S_{GL}$). Les simulations réalisées sous ces conditions de fertilisation montrent que le $\%S_{GL}$ au début de la floraison (temps T3 correspondant au stade GS60-62) est correctement simulé pour l'apport retardé à GS53 (0+30S_HN). Le $\%S_{GL}$ est légèrement surestimé pour l'apport fractionné à GS32 et GS53 (8+22S_HN) et pour les traitements caractérisés par un apport unique de S au stade GS32 (0S_HN, 8S_HN et 30S_HN). Cette surestimation est plus importante lorsque l'apport en S augmente. Un point ici pouvant avoir un impact sur la surestimation générale du $\%S_{GL}$ est le fait que cette teneur relative en S est calculée avec la biomasse sèche des GL simulée qui elle-même est sous-estimée par rapport aux observations (semblables aux simulations pour le LAI_{GL}). Le LAI_{GL} est en effet mieux simulé dans son ensemble pour la condition 0+30S_HN, d'où une meilleure simulation du $\%S_{GL}$. Lorsque les simulations en condition 30S sont comparées aux observations correspondant à un apport en N intermédiaire (30S_MN) ou faible (30S_LN), le $\%S_{GL}$ est surestimé (pour le temps T3 soit 709°Cj après vernalisation). À l'inverse, lorsque les simulations en condition 8S_HN sont comparées aux observations MN ou LN, le $\%S_{GL}$ est sous-estimé. **Ces résultats montrent que la dose de S (8S ou 30S) ainsi que la dose de N (LN, MN ou HN) impactent la précision des résultats des simulations du $\%S_{GL}$.**

L'effet de la quantité d'apport en S peut être dû en partie au paramétrage retenu ici qui est identique pour les simulations en conditions 8S et 30S. En effet, dans la version originale du modèle (Brunel-Muguet *et al.*, 2015b), la calibration est partiellement différente selon le niveau de disponibilité en S : deux valeurs différentes de la RUE ont été attribuées selon des conditions d'apports pléthoriques (HS) ou considérés comme limitants (LS). Le but du travail ici présenté n'étant pas de re-calibrer le modèle, nous n'avons utilisé qu'un seul jeu de valeurs de paramétrage, afin d'être représentatif de l'ensemble des conditions. En préambule aux simulations présentées, nous avons toutefois testé différentes valeurs des trois paramètres utilisés lors des analyses de sensibilité (SLA, coefficient β et RUE) étant donné leur variabilité observée dans la littérature et leur sensibilité à la disponibilité en S (Brunel-Muguet *et al.* 2015b ; résultats non publiés). La RUE étant le paramètre le plus impactant, comme démontré dans le **Chapitre IV.B.2** (Poisson *et al.*, 2018a), il a été choisi une seule valeur de RUE plus faible (1,5 g. $MS.MJ^{-1}$) que les valeurs de la

version originale du modèle (HS : 4,59 g. MS.MJ^{-1} ; LS : 3,11 g. MS.MJ^{-1}), permettant d'améliorer la prédiction du modèle. Par ailleurs, ce changement de valeur est d'autant plus justifié qu'il a été démontré que la RUE évolue (i) au cours du cycle de développement du colza (Kuai *et al*., 2015, 2016), (ii) en fonction de la phénologie (RUE plus faible pour certains organes autotrophes comme les siliques (Gabrielle *et al*., 1998a, 1998b) mais aussi (iii) en fonction de la fertilisation soufrée et azotée, chez le colza (Kuai *et al*., 2015, 2016) et chez le blé (Salvagiotti et Miralles, 2008 ; Zulfi-Qar *et al.*, 2018). Nos simulations comprenaient cinq conditions d'apport en S, variables en termes de quantité et de date d'application (retard ou fractionnement) et nous avons fait le choix d'une unique valeur de RUE bien que cette valeur soit très probablement dépendante indirectement du niveau de S qui impacte la précocité de la phénologie et donc de l'apparition des organes photosynthétiques (siliques autotrophes) et leur senescence (feuilles). Ainsi, les simulations pourraient être améliorées, par exemple en choisissant des valeurs de RUE spécifiques aux modalités d'apport en S ou/et en calibrant plus précisément la valeur des autres paramètres à chaque conditions d'apport en S comme le SLA ou le coefficient β. Néanmoins cette démarche ne s'inscrit pas dans des objectifs de généricité des modèles de culture dont l'utilisation cherche à s'affranchir de calibrations spécifiques. Une autre option possible serait de déterminer des lois de réponse de la RUE à la disponibilité en S et au temps thermique, deux facteurs qui semblent impacter les valeurs de RUE (Gabrielle *et al.*, 1998a, 1998b ; Kuai *et al*., 2015, 2016 ; Salvagiotti et Miralles, 2008 ; Zulfi-Qar *et al*., 2018).

Ces simulations mettent en évidence l'importance d'intégrer la disponibilité en N afin d'améliorer les simulations avec le modèle SuMoToRI dans des conditions variables en N. En effet, en se plaçant en condition 30S_LN, les simulations surestiment la teneur en S dans les feuilles par rapport à la condition HN. Pour un même apport de S, la disponibilité en N va impacter les teneurs en S dans les feuilles. Bien que les $\%S_{GL}$ observés dans différentes conditions d'apport en N puissent se chevaucher légèrement, c'est-à-dire que les plus faibles $\%S_{GL}$ en condition 30S_HN peuvent être similaires aux plus hauts $\%S_{GL}$ en condition 30S_LN, ces deux groupes sont bien significativement différents avec en moyenne respectivement 0,66 % et 0,52 % de S dans les GL à T3 ($p = 0,001$; ANOVA). Le $\%S_{GL}$ moyen en condition 30S_MN à T3 est intermédiaire avec 0,58 % de S dans les GL (significativement différent de la condition 30S_HN ; $p = 0,015$). En intégrant les effets de la disponibilité en N pour les formalismes de remobilisation du S foliaire et en apportant de nouvelles équations de besoins critiques en N et de remobilisation du N foliaire, le modèle pourrait rendre compte d'une part des effets directs du N et d'autre part des effets indirects du statut N sur les flux de S et l'efficience d'usage du S comme préalablement démontrée dans cette thèse



<u>Figure IV.B.3.6</u> : Association entre le % de S dans les graines matures et la teneur en S dans les feuilles vertes (%S_{GL}) observée au temps T3 ou simulée au temps T3 (marqueurs rouges pâles) pour les 9 différents traitements. Pour chaque traitement, la moyenne du % de S dans les graines observée au temps T7 a été associée à la moyenne de la quantité de S dans les feuilles vertes (feuilles sénescentes + matures + jeunes) soit observée au temps T3, soit simulée au temps T3. Les valeurs observées correspondent à la moyenne ± ET ($ET_{horizontal}$ pour le %S_{GL} et $ET_{vertical}$ pour le % S dans les graines matures) (n = 5, sauf pour 30S_LN où n = 4).

(**Chapitre IV.A**) et dans de nombreuses publications (Ahmad *et al*., 2007 ; Anjum *et al*., 2012 ; Kopriva et Rennenberg, 2004 ; McGrath et Zhao, 1996 ; Salvagiotti et Miralles, 2008 ; Wang *et al*., 2017b). Le modèle SuMoToRI pourrait aider à optimiser conjointement les modalités de fertilisation en S et en N.

La version actuelle du modèle permet une prédiction des performances depuis la sortie d'hiver jusqu'à la formation des premières siliques. Bien qu'une extension de la phase de prédiction du modèle jusqu'à la maturité des graines (GS99) permettrait de prédire le rendement et les composantes du rendement (en cours d'évolution), cette version actuelle peut fournir des indicateurs précoces de la qualité des graines en développement et maturation, avec l'hypothèse que la teneur en S dans les feuilles (%S_{GL}) est un « proxy » de la qualité protéique grainière.

IV.2 La teneur en S foliaire : un indicateur précoce de la qualité de la graine ?

Dans le **Chapitre IV.A**, nous avons déterminé un seuil critique de S dans les graines (teneur exprimée en % de S dans la matière sèche) de 0,32 % pour garantir une qualité protéique grainière (teneur satisfaisante en protéines riches en S). Par ailleurs, le travail de simulation précédent nous a permis d'indiquer pour quelles conditions d'apports en S et N la prévision de la teneur en S dans les feuilles au temps T3 (correspondant au stade début de floraison, GS60-62) était correcte (0+30S_HN), sous-estimée (8S_MN et 8S_LN) ou surestimée (0S_HN, 8S_HN et 30S_HN, MN et LN) et ainsi d'indiquer la pertinence de cette variable comme indicateur précoce de la teneur en S des graines.

Pour les conditions 0S_HN et 8S_HN, le seuil de 0,32 % n'est pas atteint avec respectivement des teneurs moyennes de 0,28 et 0,3 %, correspondant à une forte altération de la qualité protéique des graines (**Figure IV.B.3.6**). Les %S_{GL} observés au temps T3 (709 °Cj après vernalisation, début de floraison) sont de 0,26 ± 0,07 % en condition 0S_HN et de 0,35 ± 0,06 % en condition 8S_HN. Les simulations correspondantes sont respectivement de 0,28 % et 0,38 % de S dans les GL. Les résultats tendent à montrer que plus le %S_{GL} est important (à T3), meilleure est la qualité protéique des graines. Cette relation se confirme en condition HN où plus le %S_{GL} est important (0,26 ; 0,35 et 0,66 % de S dans les GL observé respectivement pour les conditions 0S, 8S et 30S_HN), plus le %S dans les graines augmente (respectivement 0,28 ; 0,3 et 0,48 %), indiquant un accroissement de la qualité protéique des graines avec l'augmentation de la disponibilité en S. Les %S_{GL} simulés (0,28 ; 0,377 et 0,75 % de S dans les GL respectivement pour les conditions 0S, 8S et 30S_HN), bien que légèrement surestimés, rendent compte de cette augmentation du %S_{GL} associée à une

meilleure qualité protéique des graines. **Le %S_{GL} prédit par le modèle est donc un bon proxy de la qualité protéique des graines en condition HN et quel que soit la quantité de S apporté.**

Cependant, lorsque la disponibilité en N diminue ou lorsque l'apport de S est retardé, la précision de ce proxy est fortement réduite. De fortes interactions existant entre les métabolismes S et N vont avoir un impact sur la gestion de la remobilisation des réserves S et N, notamment en modulant la SUE et la NUE (Fismes *et al*., 2000 ; McGrath et Zhao, 1996 ; Salvagiotti et Miralles, 2008 ; Wang *et al*., 2017b). En effet, les %S des graines issues des plantes cultivées en conditions 8S_LN et 30S_HN ne sont pas significativement différentes, atteignant respectivement 0,46 et 0,48 %, alors que le %S_{GL} à T3 pour la condition 8S_LN est significativement plus faible que pour la condition 30S_HN, atteignant en moyenne 0,41 et 0,66 % de S dans les GL. De même, pour un %S_{GL} à T3 de 0,35 et 0,41 % de S dans les GL respectivement pour les conditions 8S_HN et 8S_LN (non différents significativement), les %S dans les graines sont significativement différents et augmentent avec la diminution de l'apport en N (0,3 % en condition HN et 0,46 % en condition LN). Des tendances similaires sont également observées en condition 30S. Ces interactions entre la fertilisation S et N ont déjà été soulignées notamment lors de recherche d'un seuil de concentration critique en S chez le colza (Pinkerton, 1998). Une valeur critique (entre 0,20 et 0,25 %) de teneur en S total avait été déterminée pour indiquer une déficience en S, correspondant ici au %S_{GL} des plantes soumises au traitement 0S_HN d'une valeur de 0,26 ± 0,07 % (soit déficientes en S). **Pour que la valeur simulée de la teneur en S des feuilles au début de formation des siliques soit un proxy fiable de la qualité protéique des graines quel que soit le schéma de fertilisation S et N utilisé, il est nécessaire d'intégrer au modèle des formalismes prenant en compte la disponibilité en N et les interactions SxN.**

La période du cycle entre 970 °Cj après vernalisation (T4, fin des simulations) et 2690 °Cj après vernalisation (T7, fin de la culture, maturité des graines) semble être cruciale pour la mise en place des réserves de la graine (notamment des protéines de réserves riches en S) au moyen d'une remobilisation plus ou moins efficace du S des organes végétatifs (principalement les feuilles) vers les graines, sous la dépendance de la disponibilité en N. Le fractionnement et le retard de l'apport en S peuvent être des éléments influençant aussi la gestion du S par la plante et *in fine* la qualité des graines. En effet, des teneurs significativement non différentes en S foliaire à T3 sont retrouvées pour les conditions 0+30S_HN et 8S_HN (respectivement 0,38 et 0,35 % de S dans les GL), ce qui n'affecte pourtant pas la qualité protéique des graines en condition 0+30S_HN (%S de 0,5 supérieur à la teneur critique de 0,32 %). On peut ainsi émettre l'hypothèse qu'en condition d'apport retardé (à GS53, 0+30S), les quantités de S prélevées sont directement allouées vers les siliques contenant

les graines en développement et ne sont pas ou peu stockées dans les vacuoles des cellules du mésophylle des feuilles (correspondant au pool mobile conceptualisé dans le modèle). Comme les teneurs en S dans les feuilles sont bien simulées pour les apports fractionné et retardé (de T0 à T4), il s'agirait ici **d'ajouter des formalismes intégrant les apports fractionné ou retardé en S lors de la phase d'extension du modèle (jusqu'à maturité des graines). En effet, la plante gère ses réserves en S différemment selon un apport en S unique, fractionné ou retardé, ce qui peut impacter *in fine* la qualité protéique des graines.**

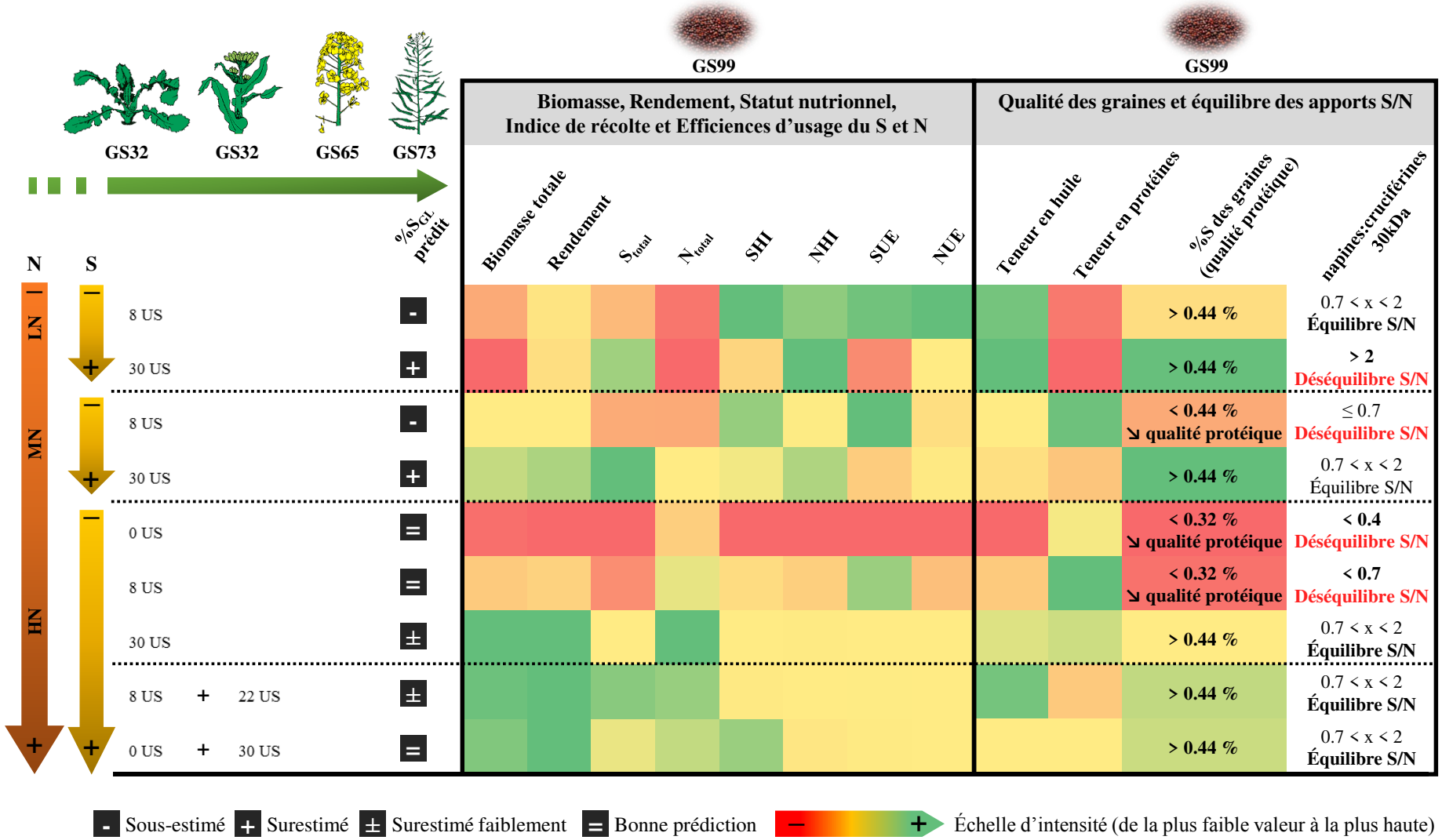
CHAPITRE V

Discussion générale et perspectives

CHAPITRE V – DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Le colza (*Brassica napus* L.), cultivé pour ses graines riches en huile et en protéines, est la troisième culture d'oléoprotéagineux dans le monde après le soja et le palmier à huile. Comme la plupart des Brassicacées, ses besoins en soufre (S) sont très importants comparés à ceux d'autres grandes cultures comme le blé (Oenema et Postma, 2003). L'importance de la fertilisation soufrée a émergé suite à l'apparition de carences en S, conséquence des réglementations internationales qui ont réduit la pollution atmosphérique et les retombées de S au sol, pouvant conduire à une altération considérable des rendements et de la qualité des graines de colza. L'existence de fortes interactions entre les métabolismes soufrés et azotés peuvent de plus impacter l'efficience d'utilisation de ces éléments ainsi que le rendement ou la qualité des graines si les apports en S et en N ne sont pas équilibrés (Fismes *et al.*, 2000 ; Malhi et Gill, 2007). **Dans ce contexte, étudier l'impact de différentes stratégies de fertilisation en S et en N sur les composantes du rendement et la qualité des graines de colza est un prérequis à l'amélioration de la gestion de la fertilisation S et N et/ou à l'identification de nouveaux indices de qualité de la graine.** D'autres facteurs environnementaux pouvant avoir des incidences sur le rendement des cultures et la qualité des graines récoltées sont associés au dérèglement climatique et concernent notamment la hausse des températures prédites au cours des prochaines décennies (DaMatta *et al.*, 2010 ; Hampton *et al.*, 2013 ; Madan *et al.*, 2012 ; Namazkar *et al.*, 2016 ; Regitano Neto *et al.*, 2016). Par ailleurs, des interactions (effets compensatoires ou additionnels) entre la hausse des températures et la nutrition soufrée ont déjà été mises en évidence (Brunel-Muguet *et al.*, 2015a). **De ce fait, pour développer des systèmes à faibles intrants, il est nécessaire de prendre en compte conjointement les effets de la température et de la nutrition S, spécialement chez le colza qui est une culture particulièrement exigeante en S.**

Nous avons ainsi conduit (i) **des expérimentations *in planta*** en conditions contrôlées et de plein champ (**Partie A**) et (ii) des **expérimentations numériques *in silico*** (**Partie B**) en utilisant un modèle écophysiologique simulant la croissance en réponse à la disponibilité en S (SuMoToRI "Sulphur Model Towards Rapeseed Improvement", Brunel-Muguet *et al.*, 2015b), réalisées dans différents contextes de fertilisation S et conditions climatiques. Les **principaux objectifs** de cette thèse ont été d'étudier, au moyen de ces deux approches, **les impacts (i) de différentes stratégies de fertilisation S en interaction avec la fertilisation N**, **(ii) du changement climatique** en se focalisant sur l'augmentation des températures et **(iii) de la variabilité des paramètres « plante » du modèle** (relatifs à l'efficience d'usage du rayonnement et à l'allocation du C aux feuilles) **sur la**



<u>Figure V.1</u> : Schéma récapitulatif des impacts de schémas de fertilisation soufrée et azotée différant par les doses en S et en N, les stades d'apport en S (conventionnel, GS32 : montaison ou retardé, GS53 : boutons accolés) et la fréquence (apport unique à GS32 ou GS53 ou apport fractionné à GS32 et à GS53) sur (i) les composantes du rendement (production de biomasse, rendement grainier, statut nutritionnel S et N, indices de récolte et efficience d'usage du S et du N), (ii) la qualité nutritionnelle des graines de colza (teneurs en huile et protéines, % de S dans les graines) et (iii) l'équilibre des apports S/N évalué au moyen du ratio napines:cruciférines 30kDa. La précision de l'estimation de la teneur en S des feuilles vertes (présentes sur la plante) par simulation avec le modèle SuMoToRI, pouvant être un « proxy » de la qualité protéique des graines, est également donnée.

croissance ainsi que sur les composantes du rendement et la qualité principalement protéique des graines de colza.

I. Optimisation des performances agronomiques du colza *via* l'adaptation des schémas de fertilisation S en interactions avec la fertilisation N et l'élévation de la température

I.1 Ajuster conjointement la fertilisation S et N est primordiale afin d'optimiser les performances et la qualité des graines du colza

Les résultats obtenus lors des expérimentations en conditions contrôlées (*in planta*) confirment l'impact négatif d'une déficience en S sur les composantes du rendement (baisse du rendement grainier, des efficiences d'usage et des indices de récoltes en S et N) et sur la qualité des graines de colza (diminution de la teneur en huile et de la qualité protéique des graines ; **Figure V.1**). De plus, les différents traitements combinant deux niveaux d'apport en S (8 U et 30 U) et trois niveaux d'apport en N (28 U, 73 U et 97 U de N) apportés au stade GS32 (début de montaison) ont permis de souligner les interactions existant entre les métabolismes S et N et l'intérêt d'ajuster conjointement la fertilisation S et N afin d'optimiser les performances et la qualité des graines du colza. **L'augmentation de l'apport en S permet d'améliorer le rendement en graines seulement dans des conditions non limitantes en N (effet synergique). De plus, la disponibilité en N va moduler la réponse à une limitation en S dont l'impact est plus négatif dans des conditions non limitantes en N.** Des réponses physiologiques favorables et des performances satisfaisantes sont observées dans le cas d'une double limitation en S et en N (8S_LN), contrairement aux conditions d'apports déséquilibrés en l'un des deux éléments. En effet, de précédents résultats ont mis en évidence qu'une restriction en S associée à une faible disponibilité en N induisait une remobilisation efficace du sulfate foliaire grâce à l'augmentation de l'expression de *BnSULTR4;2* (transporteur vacuolaire de sulfate) ainsi qu'une augmentation de la remobilisation apparente des protéines liée à une accélération de la sénescence qui est la conséquence directe d'une limitation en N (Dubousset *et al.*, 2009). Cependant, ces observations peuvent être nuancées car lors d'une limitation en N, la biomasse peut également être réduite ce qui peut impacter le rendement grainier. De plus, malgré une plus forte teneur en huile dans les graines provenant de plantes soumises à une limitation en N, la teneur en protéines chute, celle-ci ayant déjà été corrélée positivement avec la dose en fertilisants N apportée (Malhi et Gill, 2007).

Il existe de fortes interactions entre la fertilisation S et N qui vont avoir des impacts sur la qualité des graines (**Figure V.1**). Nos résultats ont montré que pour une même dose de fertilisants S, la dose de N apportée va avoir un impact sur l'abondance en napines de 12 kDa (protéines riches en acides aminés soufrés) et en cruciférines de 30 kDa (protéines pauvres en acides aminés soufrés) en modifiant le ratio entre ces deux types de protéines de réserves des graines. On observe un effet S significatif entre les traitements ayant reçu 8 ou 30 U de S, avec des abondances en napines plus faibles pour un apport de 8 U de S. Un effet N significatif est également observé entre les différents traitements. Un apport plus important de N augmente l'abondance relative en cruciférines, surtout en condition d'apport de 8 U de S, mais il a aussi tendance à faire chuter l'abondance relative en napines, surtout lorsque 30 U de S sont apportées. La modalité limitante en S et non limitante en N (8S_HN) présente les plus faibles performances et la plus faible qualité protéique des graines après le traitement déficient en S (0S_HN) en raison d'une baisse significative de la NUE et du NHI ainsi qu'une diminution du S total dans la plante, conséquence d'une moins bonne absorption du sulfate.

Cependant, nos résultats mettent également en évidence que la qualité protéique des graines de plantes soumises à une double limitation en S et en N n'est pas affectée et reste identique à celle des graines produites dans des conditions non limitantes en S et N (**Figure V.1**). Pour une même condition d'alimentation en N, un apport plus élevé de S permet d'augmenter la qualité protéique des graines en augmentant l'abondance relative en napines. **Afin d'optimiser les performances du colza tout en raisonnant la fertilisation S et N, nos résultats confirment l'importance de prendre en compte les interactions SxN** (Fismes *et al.*, 2000) afin d'éviter :

i. **une surfertilisation en N** par rapport aux apports en fertilisants S, entraînant une chute du rendement et de la qualité protéique des graines ainsi qu'une baisse de l'efficience d'usage et de l'indice de récolte en N. De plus, diminuer les apports en N permettrait de réduire les risques environnementaux de contamination en nitrate des eaux superficielles (rivières, etc) et profondes (nappes phréatiques), ainsi que le rejet atmosphérique d'oxydes d'azote, GES qui contribuent au réchauffement climatique.
ii. **une surfertilisation en S**, entraînant des pertes en S non négligeables dans l'environnement *via* la chute des feuilles riches en S, conséquence d'une mauvaise remobilisation du sulfate foliaire et de fait, une faible valorisation du S apporté à la culture vers les graines.
iii. **une fertilisation en S insuffisante**, conduisant systématiquement à une chute du rendement et de la qualité des graines.

Un compromis est donc à trouver pour apporter de façon raisonnée des fertilisants N et S et pour obtenir des performances agronomiques satisfaisantes (rendement optimisé) et une qualité nutritionnelle maximisée (teneur et qualité élevées pour l'huile et les protéines).

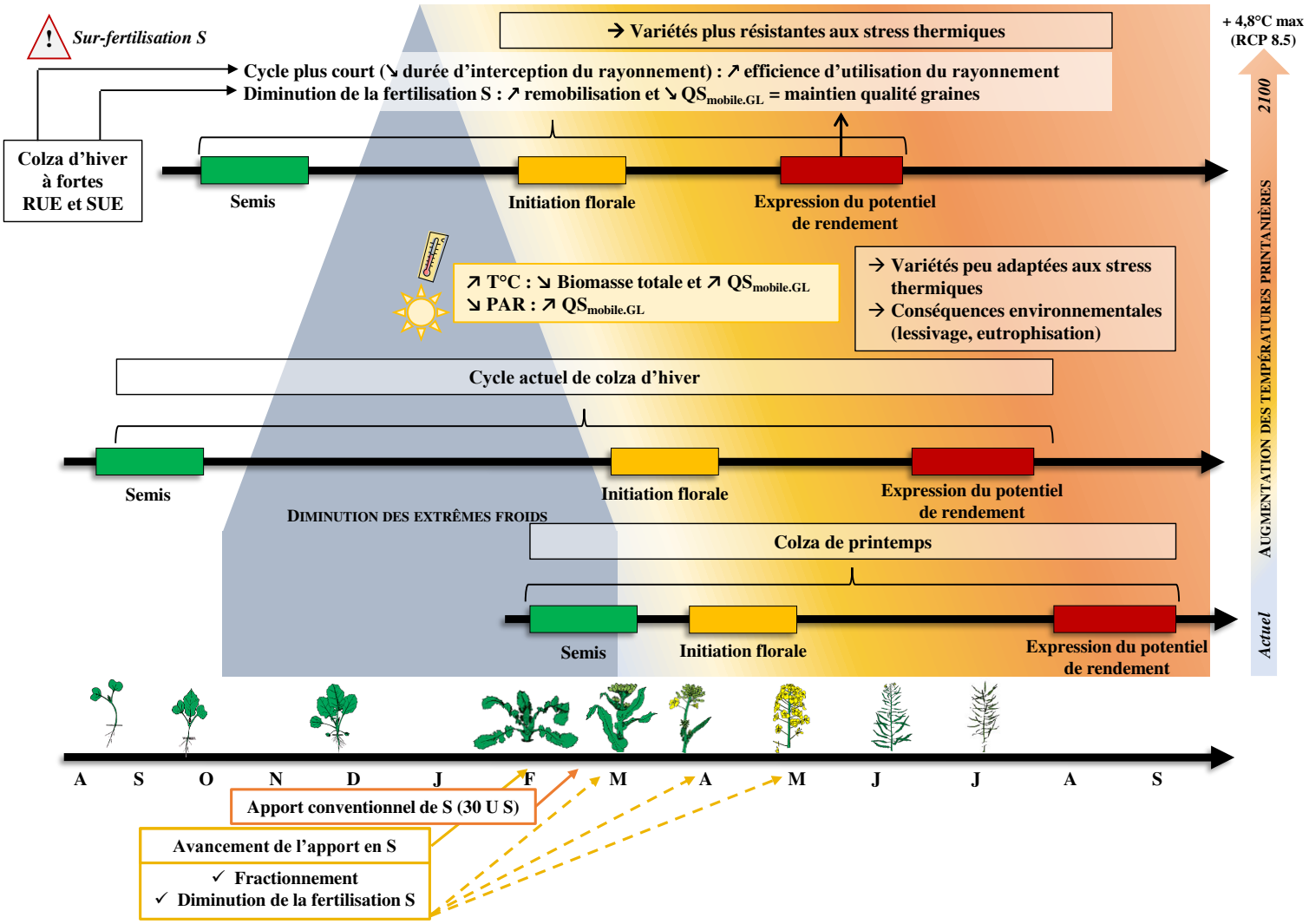
I.2 Fractionner et retarder les apports en S : de nouvelles modalités de fertilisation à explorer

L'expérimentation *in planta* conduite en conditions contrôlées comprenait deux modalités supplémentaires d'apport en S : (i) un apport fractionné (8 U à GS32 ; montaison et 22 U à GS53 ; boutons accolés, inflorescence principale dégagée) et (ii) un apport retardé (30 U à GS53), ceci dans des conditions non limitantes en N. Les résultats obtenus ne montrent aucune différence concernant les composantes du rendement par rapport à un apport unique de 30 U de S à GS32 (montaison) mais montrent une **augmentation de la qualité protéique des graines de colza lors d'un apport de 30 U de S à GS53, se traduisant par une augmentation significative de la teneur relative en napines dans les graines.** Les efficiences d'usage ainsi que les indices de récolte en S et en N calculés à la récolte finale ne permettent pas d'expliquer cette différence, malgré une légère augmentation du SHI pour la modalité retardée (non significativement différente selon nos tests statistiques). Cependant, l'efficience d'usage du S (comprenant l'efficience d'utilisation et de remobilisation du S) pourrait évoluer tout au long du cycle de culture et être beaucoup plus efficace à certaines phases cruciales du développement, par exemple lors de la phase de remplissage des graines, correspondant à l'élaboration des réserves protéiques. De plus, les travaux de modélisation visant à comparer les simulations avec les observations issues des différents traitements réalisés en conditions contrôlées (**Chapitre IV.B.3**) ont apporté des informations complémentaires concernant les teneurs en S observées dans les feuilles vertes (correspondant au pool des feuilles présentes sur la plante) au cours de la culture. Les teneurs en S observées dans les feuilles des colzas cultivés sous la condition d'apport retardé sont faibles comparées à l'apport unique de 30 U de S à GS32 : 0,38 contre 0,65 % de S dans les feuilles à GS60-62, correspondant à la floraison. **On peut ainsi émettre l'hypothèse qu'en réponse à un apport tardif en S (30 U de S à GS53), (i) la remobilisation du S foliaire (sous forme de sulfate) est plus efficace, et que (ii) les quantités de S prélevé sont directement allouées vers les siliques contenant les graines en développement et ne sont pas ou peu stockées dans les vacuoles des cellules du mésophylle des feuilles.**

Les résultats présentés dans le **Chapitre IV.B.2** (analyses de sensibilité) nous ont permis d'obtenir des informations supplémentaires sur les effets d'apports fractionnés ou retardés en S. Pour un apport total de 75 U de SO_3 (soit 30 U de S, dose préconisée par Terres Inovia), trois modalités d'apport en S ont été testées : (i) une modalité conventionnelle correspondant à un apport

de 75 U de SO_3 (ou 30 U de S) à GS30 (reprise de végétation, début de montaison) (ii) un fractionnement de 37,5 U de SO_3 (ou 15 U de S) apporté à GS30 (reprise de végétation) et à GS60 (début de floraison), et (iii) un apport tardif de 75 U de SO_3 (ou 30 U de S) au stade GS60 (début de floraison). En comparaison avec les apports en S conventionnels et fractionnés, les résultats des simulations réalisées pour l'apport tardif ont révélé une baisse de la biomasse totale et de l'indice de surface foliaire. **L'apport tardif de S au stade GS60 (floraison), ne permet pas de rattraper le retard de croissance, simulé jusqu'au stade GS70, correspondant au début de formation des siliques.** Cependant, les quantités de S mobile (principalement sulfate) dans les feuilles au début de formation des siliques sont plus élevées pour la condition fractionnée, ce qui peut correspondre au S nouvellement absorbé puis stocké par la plante et non encore utilisé, étant donné la baisse de la biomasse produite (ou le retard de croissance) et donc la diminution de la force puits. La période de simulations par le modèle SuMoToRI débutant à la reprise de la croissance, en fin d'hiver/début de printemps (montaison), et allant jusqu'au début de formation des siliques, nous ne pouvons pas savoir avec la version actuelle du modèle quelles seront les performances finales (rendement et qualité grainière). Cela dépend (i) des réserves en sulfate préalablement accumulées lors de la phase végétative (valeurs initiales de paramètres du modèle), (ii) de la gestion des réserves soufrées pendant la phase reproductrice et (iii) d'événements nutritionnels et/ou environnementaux lors de cette phase. Malhi *et al*., (2004) ont rapporté qu'une déficience en S corrigée à la floraison permettait de compenser partiellement les dommages d'une carence en S sur le rendement. Cependant, son impact sur la qualité est plus incertain. Étant donné la bonne qualité protéique des graines issues des colzas cultivés en conditions contrôlées avec un apport tardif de 30 U de S à GS53 soit plus tôt qu'à GS60, on peut supposer que la qualité protéique ne sera pas aussi impactée que le rendement, bien qu'une correction de la carence en S soit de moins en moins efficace à mesure que l'on avance dans le cycle de développement. On peut aussi préciser que les fonctions de prélèvement utilisées lors des simulations ne sont pas identiques pour ces deux modalités de fertilisation tardives (à GS53 ou à GS60). En effet, les cinétiques du prélèvement en S simulées sont différentes, ainsi que les valeurs initiales retenues, notamment les quantités de S initiales dans la plante, qui sont plus élevées pour l'apport tardif de S à GS53, permettant de moins pénaliser la croissance. Le retard de l'apport en S est une modalité de fertilisation à explorer davantage afin de déterminer les stades limites permettant de compenser et corriger une carence en S et *in fine* de ne pas diminuer le rendement et la qualité nutritionnelle des graines.

Concernant le fractionnement des apports en S, nos résultats démontrent que cette modalité pourrait permettre un meilleur ajustement de l'apport en S en fonction des



<u>Figure V.2</u> : Schéma synthétique des possibilités d'amélioration de la culture du colza pour son adaptation au contexte de changement climatique. Les températures printanières plus élevées attendues vont réduire la durée du cycle de développement du colza d'hiver et principalement la phase de remplissage des graines, pouvant conduire à une altération de la qualité, notamment protéique, des graines. Un des effets collatéraux majeurs de ce raccourcissement du cycle est l'accumulation de S dans les feuilles résultant de la diminution de biomasse produite qui limite l'assimilation du S prélevé dans des composés carbonés. Les voies d'amélioration sont diverses : (i) utilisation de variétés de printemps dont le cycle s'ajuste davantage aux contraintes climatiques à venir, (ii) utilisation de variétés à fortes RUE et SUE afin d'optimiser la croissance, de limiter les pertes de S *via* les feuilles chutées (riches en S) et de maintenir la qualité protéique des graines par une bonne efficience d'utilisation du S (iii) adapter les apports en S en fonction du cycle de croissance du colza (avancement, fractionnement, réduction de l'apport) et (iv) utilisation de variétés adaptées plus résistantes au stress thermique.

conditions climatiques (température et rayonnement) et des besoins de la plante tout au long du cycle de culture. Les simulations réalisées pour différents schémas de fertilisation S montrent que les performances obtenues sont souvent améliorées lorsque les apports en S sont fractionnés en comparaison à un apport unique de S à GS30, ce qui permettrait d'atteindre les mêmes performances (en termes de biomasse, de surface foliaire et de quantité de S minéral dans les feuilles) tout en réduisant les apports en fertilisants S.

Pour développer ces nouveaux schémas, intégrant soit le retard soit le fractionnement de l'apport en S, il est nécessaire d'avoir à disposition des outils de diagnostic du statut soufré des plantes, permettant l'ajustement en S adéquat. Il est actuellement difficile de juger du statut nutritionnel en S des cultures, de façon rapide et fiable. Le besoin de développement d'outils est primordiale afin d'optimiser la fertilisation S et *a fortiori* N.

I.3 Les schémas de fertilisation S doivent être ajustés dans un contexte de dérèglement climatique caractérisé par une augmentation des températures printanières

Nos résultats soulignent la nécessité d'ajuster la fertilisation S dans un contexte de changement climatique caractérisé par des élévations de la température et des modifications du rayonnement incident, d'intensité croissante selon les scénarios climatiques envisagés (**Figure V.2**). **Les simulations réalisées avec le modèle ont montré que la biomasse diminue avec l'augmentation des températures et avec la diminution du rayonnement incident (PAR), à l'inverse des quantités de S minéral (principalement sulfate) qui tendent à s'accumuler dans les feuilles.** Plus particulièrement, les simulations pour Xianning (Chine) ont montré comment une baisse du PAR combinée à une augmentation de la température depuis la fin de la période hivernale jusqu'au milieu du printemps peut affecter la production de biomasse et, à son tour, l'accumulation de S dans la plante. En effet, la diminution du PAR incident a un effet direct sur la photosynthèse et par conséquent sur la production de biomasse qui est réduite. De ce fait, la totalité de la quantité de S absorbée par la plante ne peut pas être assimilée dans les hydrates de carbone plus faiblement synthétisés, ce qui entraîne une accumulation de S minéral. Ces conditions climatiques atypiques à Xianning sont probablement dues à la pollution atmosphérique qui, en plus de l'augmentation des températures, risque d'augmenter fortement avec l'accroissement du nombre de jours présentant une concentration très élevée en particules en suspension dans l'air (Li *et al*., 2017 ; Rohde et Muller, 2015 ; Wild *et al*., 2015).

Ces résultats re-questionnent les schémas conventionnels de fertilisation S dans de nouveaux contextes climatiques plus propices à des températures printanières élevées qui vont

avoir pour effets de réduire la durée du cycle de développement chez le colza et principalement la phase de remplissage des graines. Cette réduction de la durée de phase reproductrice peut ainsi conduire à une altération de la qualité, notamment protéique, des graines (Figure V.2). Étant donné la faible efficience d'usage et de remobilisation du S dans des conditions d'alimentation non-limitantes en S, ce phénomène va conduire à une accumulation excessive de sulfate dans les feuilles, qui sera alors potentiellement perdu par la plante et relargué dans l'environnement. De plus, il a été montré que les effets négatifs d'un pic thermique lors du remplissage des graines pouvaient être atténués par une limitation en S (notamment sur des caractéristiques de la graine associées à son aptitude à la conservation) (Brunel-Muguet et *al*., 2015a), d'où l'intérêt de repenser les schémas de fertilisation S dans un contexte d'augmentation des températures printanières (**Figure V.2**).

Au-delà de la baisse des coûts de production pour l'agriculteur, la diminution des apports en S dans des conditions défavorables contribuerait à prévenir les pertes de S dues aux feuilles chutées et sénescentes, encore riches en S, et permettrait ainsi de réduire le lessivage potentiel du S présent en excès dans le sol. Bien que la fertilisation S ait attiré l'attention en raison du phénomène d'oligotrophisation des sols en S observée au cours de ces trois dernières décennies, sa gestion est restée conforme aux recommandations officielles (75 unités de SO_2 appliquées à la fin de l'hiver, Terres Inovia). Cela aurait également un impact sur la date de semis de la culture suivante et donc sur les schémas de rotation. Dans ce contexte, les simulations réalisées avec le modèle SuMoToRI pourraient être utilisées pour définir des pratiques agricoles davantage adaptées aux effets des dérèglements climatiques projetés.

Cependant, la version actuelle du modèle ne tient pas compte des tendances attendues des autres facteurs environnementaux majeurs qui ont également un impact sur le rendement des cultures, telles que l'élévation de la concentration en CO_2 atmosphérique, des épisodes de stress hydrique (sécheresse ou inondation). Les interactions avec ces facteurs pourraient atténuer les impacts négatifs, comme le démontrent de précédentes études de modélisation qui ont indiqué des rendements plus élevés dans les zones tempérées où une augmentation de la température de 1 à 3 °C se produirait parallèlement à l'augmentation du CO_2 et à la modification de la configuration des précipitations (IPCC, 2014 ; Tubiello *et al*., 2007). De plus, les effets de l'augmentation des températures et de l'ozone (O_3) sur les plantes sont souvent considérés comme opposés à ceux de l'augmentation du CO_2 (Namazkar *et al*., 2016). Les impacts de chaque facteur climatique sont différents s'ils sont étudiés individuellement ou conjointement, soulignant ainsi les nombreuses interactions à l'origine d'une complexification de leurs études et de plus fortes incertitudes de prédiction. Cependant, dans un contexte d'augmentation simultanée du CO_2 et de la température, on

peut supposer que le stockage de S augmenterait plus que sous l'effet exclusif de l'augmentation de la température et ce en raison de l'augmentation de la taille du puits (feuille) (Clausen *et al*., 2011 ; Franzaring *et al*., 2008, 2011).

I.4 Des idéotypes variétaux et culturaux adaptés aux objectifs de rendement et de qualité des graines

Les résultats du **Chapitre IV.B.1** soulèvent des questions sur la gestion de la fertilisation S et le recours à des variétés adaptées à une augmentation des températures projetées qui devrait accélérer le cycle de culture et ainsi réduire la durée des phases au cours desquelles l'interception du rayonnement des organes photosynthétiques présents est cruciale (**Figure V.2**). Ainsi, des idéotypes variétaux ayant des phases de développement plus courts, en particulier à partir de l'élongation de la tige (à la fin de l'hiver, GS30) jusqu'à la formation des siliques (GS70) pourraient être intéressants. De plus, des variétés présentant une efficience d'utilisation du rayonnement (RUE) et/ou une efficacité d'interception du rayonnement plus efficace pourraient être privilégiées. Étant donné que les variétés de colza de printemps ont un cycle de culture plus court et ne nécessitent pas de vernalisation, leur utilisation sous des températures printanières plus élevées telles que projetées par les différents scénarios dans l'hémisphère Nord pourrait être plus répandue, ce qui retarderait le semis à la fin de l'hiver ou au début du printemps et la récolte à la mi-août ou au début de septembre. Leur utilisation aurait également un impact sur la date de semis de la culture suivante et donc sur la mise en place des systèmes de rotation (**Figure V.2**).

Une étude de Namazkar *et al*. (2016) ayant testé les effets de l'élévation de la température ainsi que de l'augmentation des concentrations atmosphériques en CO_2 et O_3 a mis en évidence une diminution globale de la qualité et de la quantité de l'huile de colza. Cependant, les différences de réponses entre cultivars indiquent que ceux possédant les formes alléliques bénéfiques de gènes spécifiques peuvent être retenus et exploités pour conserver des teneurs en huile élevées et garantir une qualité satisfaisante, en dépit des changements climatiques. **À ce stade, il serait opportun de proposer des programmes de criblages des ressources génétiques des plantes cultivées afin d'optimiser la qualité des produits récoltés en vue d'une augmentation future des températures.**

La variation des trois paramètres sélectionnés pour les analyses de sensibilité (AS) *i.e.* efficience d'utilisation des radiations (RUE), indice de surface foliaire (SLA) et coefficient d'allocation du C aux feuilles (β), montrent des impacts différents selon les variables de sortie ciblées *i.e.* biomasse totale (TDW), surface foliaire des feuilles présentes sur la plante (LAI_{GL}) et quantité de S mobile

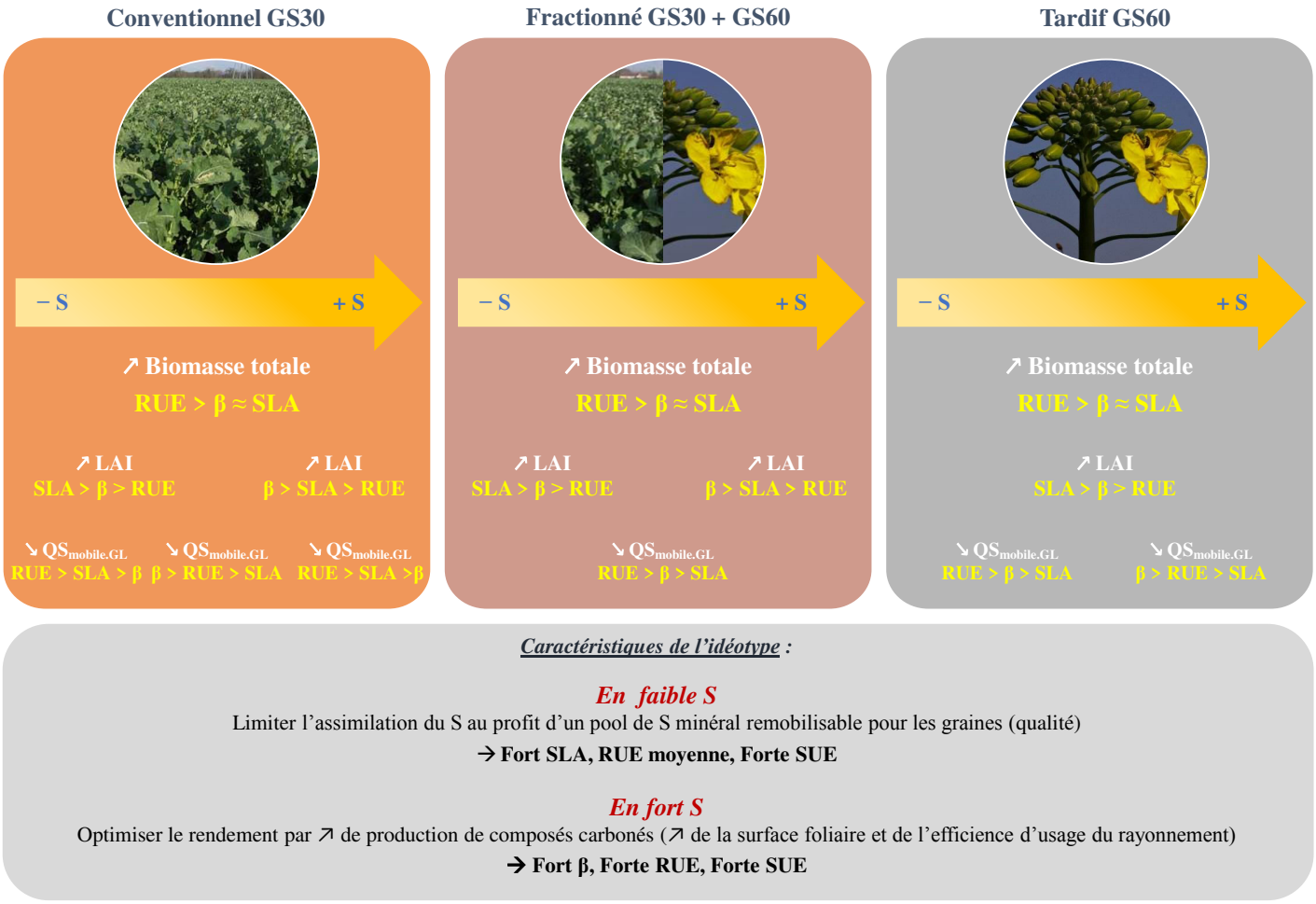


Figure V.3 : Schéma récapitulatif présentant les caractéristiques d'idéotypes de colza pour optimiser leurs performances sous des stratégies de fertilisation soufrée différant par les doses en S et en N, les stades d'apport en S (conventionnel, GS32 : montaison ou retardé, GS53 : boutons accolés) et la fréquence (apport unique à GS32 ou GS53 ou apport fractionné à GS32 et à GS53). Les résultats ont été obtenus par simulations avec le modèle SuMoToRI et analyses de sensibilité. Les « paramètres plante » *i.e.* RUE (efficience d'utilisation des rayonnements, g de $MS.MJ^{-1}$), SLA (surface foliaire spécifique, $m^2.g\ MS^{-1}$) et β (coefficient d'allocation du C aux feuilles, sans dimension), ont des impacts variables sur la biomasse totale, l'indice de surface foliaire (LAI) et la quantité de S mobile dans les feuilles ($QS_{mobile.GL}$) en fonction des schémas de fertilisation soufrés. Ils doivent alors être adaptés à chaque situation (pratiques culturales : doses, dates et fractionnement de l'apport en S), correspondant aux caractéristiques propres de différents idéotypes variétaux et culturaux (paramètres en jaune).

Source images : http://www.terresinovia.fr/espaces-regionaux/actualites-des-cultures/infos-regionsouest/archives-cultures-ouest/colza-2006/2006-colza/
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f4/Climbing_the_colza_moutain.jpg/712px-Climbing_the_colza_mountain.jpg

dans ce pool de feuilles ($QS_{mobile.GL}$), et selon le schéma de fertilisation S (**Figure V.3**). **La RUE est le paramètre impactant le plus la TDW et le $QS_{mobile.GL}$ mais avec des effets opposés sur ces variables.** Son effet sera positif sur la TDW (augmentation de la TDW) et négatif sur le $QS_{mobile.GL}$ (diminution du $QS_{mobile.GL}$) si la valeur de la RUE est augmentée. L'enjeu consiste donc à déterminer une valeur de RUE permettant l'optimisation de ces deux variables afin d'améliorer la croissance et le potentiel de remobilisation des réserves soufrées nécessaires aux puits en croissance (siliques). En revanche, les paramètres β et SLA ont très peu d'impact sur la TDW, ces paramètres étant plus spécifiques aux feuilles. Le paramètre impactant le plus le LAI_{GL} est le coefficient β suivi par le SLA et enfin la RUE. Comme attendu, la quantité de S mobile dans les feuilles ($QS_{mobile.GL}$) est la variable la plus sensible aux schémas de fertilisation S, l'impact respectif des trois paramètres variant en fonction des conditions d'approvisionnement en S (**Figure V.3**). Cependant, la RUE demeure le paramètre le plus impactant. Son augmentation tend à améliorer l'expansion des feuilles et par conséquent la production de biomasse. Les besoins pour la synthèse de composés soufrés structuraux vont ainsi augmenter, appauvrissant les réserves de S mobile stockées majoritairement dans les feuilles. Une autre raison pouvant expliquer ces effets est la dilution de S dans la plante. Pour des quantités de S minéral disponible égales, lorsque la taille des organes végétatifs augmente, la teneur en S dans les feuilles a tendance à baisser (dilution du S), ce qui entraîne une diminution des réserves de S mobiles. Ainsi, l'utilisation des variétés présentant une forte efficience d'utilisation du rayonnement permettrait de produire de fortes biomasses, associées à une diminution des quantités en S mobile dans les feuilles, pouvant notamment refléter une remobilisation accrue due aux besoins en S pour la croissance des nouveaux organes. La diminution des quantités en S mobile dans les feuilles permettrait de limiter les pertes de S associées à la chute des feuilles présentant de fortes teneurs en S.

Une combinaison spécifique de paramètres associée à une stratégie de fertilisation en S adéquate devrait offrir un statut idéal à la plante afin d'atteindre de bonnes performances en termes de rendement et de qualité (**Figure V.3**). **Nos analyses ont révélé que les combinaisons optimisées pour la meilleure performance au début de la formation des siliques** (à savoir une biomasse et une surface de feuilles élevée pour maximiser le développement des plantes, l'interception de la lumière et le stock en S mobile disponible pour le remplissage des graines) **étaient spécifiques à chaque sortie, nécessitant donc de faire des compromis.** Par exemple, la valeur de RUE optimale pour le TDW le plus élevé est de 4,58 g. $MS.MJ^{-1}$, alors qu'elle est de 2,59 g. $MS.MJ^{-1}$ pour atteindre le LAI_{GL} le plus élevé. De plus, dans certains cas, il est crucial de considérer un ensemble de paramètres en raison de leurs interactions fortes, comme illustré pour $QS_{mobile.GL}$. Le paramètre le

plus bénéfique pour la sélection de variétés est différent selon le critère de performances recherché à ce moment du cycle de culture (amélioration de la biomasse, de la surface foliaire ou du stockage de S dans les feuilles) mais aussi par rapport aux schémas de fertilisation S. Les génotypes à haute efficience d'utilisation du rayonnement, à fort LAI ou à forte allocation du carbone aux feuilles bénéficieraient des stratégies de fertilisation en S précoce et fractionnée (**Figure V.3**).

Cependant, ces simulations ne prennent pas en compte les interactions existantes entre les métabolismes S et N, qui peuvent avoir un impact direct sur l'assimilation et la remobilisation du S et indirectement sur les différents paramètres associés aux métabolismes soufré, azoté et carboné.

I.5 Perspectives

Afin de mieux comprendre les interactions SxN, il pourrait être intéressant à court terme de quantifier et suivre en cinétique les réserves en S dans les feuilles pour se rendre compte de la remobilisation du sulfate vacuolaire et des autres formes de composés S. Ainsi, les efficiences d'usage et de remobilisation en S et en N pourraient être calculées afin de déterminer les schémas de fertilisation S et N permettant une optimisation des réserves soufrées. Pourrait être couplé à cela une analyse de l'expression des gènes codant des transporteurs de sulfate *BnSULTR4;1*, *BnSULTR4;2*, *BnSULTR1;1* et *BnSULTR1;2* aux niveaux racinaire et foliaire. Des dosages en méthiine et glutathion (formes de transport de S organique dans le phloème) ou encore en S-protéique (forme de réserves soufrées) dans les différents organes de la plante pourraient être des informations complémentaires non négligeables.

Une étude complémentaire des flux de S et de N par marquage au ^{34}S et ^{15}N pour différents schémas de fertilisations S et N en termes de dose, de moment d'apport et de fractionnement permettrait une meilleure compréhension des processus (i) de remobilisation en S et N et (ii) d'adaptation de la plante aux différents schémas de fertilisation. Lors de notre expérimentation, un marquage au ^{15}N a été réalisé lors de l'apport de N à la sortie de la vernalisation pour tous les traitements, et un marquage au ^{34}S a également été réalisé lors des apports de S à GS32 pour les plantes ayant été cultivées en conditions non limitantes en N. Les données sont en cours d'exploitation au sein du laboratoire afin de mieux comprendre certaines interactions SxN.

Une étude de la détermination des stades de développement pouvant permettre une correction efficace lors de carences en S serait très utile, en intégrant différents niveaux de sévérité de la limitation en S et différents schémas de fertilisation S et/ou N. L'impact de ces corrections plus ou moins tardives sur le rendement mais également sur la qualité des graines (teneur et qualité des protéines et de l'huile) pourrait être alors quantifié.

Étendre cette approche à plus long terme à différentes variétés de colza, présentant des EUS et EUA contrastées permettrait d'étudier l'effet génotypique et de voir si certaines variétés sont plus adaptées à tel ou tel schémas de fertilisation S et N afin de garantir un bon rendement et une bonne qualité grainière.

Afin de confirmer certaines de nos hypothèses (notamment pour les résultats des simulations réalisées à Xianning), il pourrait être mis en place une étude sur l'effet de l'élévation de la température (ou de pics de température) et/ou la diminution du rayonnement à certains stades clés du développement, associée ou non à une limitation en S, sur le métabolisme soufré (absorption, assimilation, stockage du sulfate, remobilisation). L'impact sur le rendement et la qualité des graines pourrait aussi être étudié.

II. Vers de nouveaux indicateurs de la qualité protéique des graines de colza

Le colza est une espèce à fort intérêt agronomique offrant un tourteau pouvant être une excellente source de protéines végétales. Les tourteaux sont principalement dédiés à l'alimentation animale mais sont de plus en plus valorisés comme source de protéines riches en acides aminés essentiels dans l'alimentation humaine, en remplacement des protéines animales (Von Der Haar *et al.*, 2014 ; Wanasundara *et al.*, 2016, 2017) ou valorisés en chimie verte (émulsifiants, matériaux biosourcés, etc). Du fait de son exigence en S, une limitation en S peut s'avérer néfaste pour la qualité de l'huile et du tourteau. Actuellement, les critères de qualité des graines de colza reposent principalement sur les teneurs en huile, en acide linolénique (C18:3), en protéines, en eau et en glucosinolates ainsi que sur les taux d'impuretés, d'acidité de l'huile et de germination des graines (Terres Inovia). À notre connaissance, aucune norme en termes de qualité protéique n'est préconisée et aucun indice rapidement mesurable et fiable de la qualité protéique des graines de colza n'est réellement utilisé afin de valoriser les productions de graines présentant une haute qualité protéique. Les expérimentations menées au cours de cette thèse ont permis d'établir deux nouveaux indicateurs de la qualité protéique des graines de colza, pouvant pour l'un d'eux rendre compte (après validations complémentaires) de l'équilibre entre la fertilisation S et N. Ces indices peuvent également aider à l'amélioration des pratiques culturales et des conduites de fertilisation S et N par exemple en décelant les parcelles à risques de carence en S ou nécessitant une adaptation de la fertilisation S et N.

II.1 La teneur en S des graines peut être utilisée comme un indicateur de la qualité protéique

Nos résultats acquis en conditions contrôlées, comprenant 9 modalités d'apports en S et N, nous ont permis de mettre en évidence une **forte corrélation entre la teneur en S (%S) et l'abondance relative en napines dans les graines matures de colza**. Cette relation permet par le biais de la teneur en S des graines de prédire l'abondance relative en napines, protéines de réserve riches en acides aminés soufrés dont certains sont essentiels tel que la méthionine dans le cas de l'alimentation animale ou humaine. Cette richesse en acides aminés soufrés est donc un critère central de la qualité protéique des graines de colza. **Nos travaux réalisés en conditions contrôlées ont permis d'établir une valeur seuil de 0,32 % de S dans les graines, correspondant à la teneur en S pour laquelle il existe un fort risque d'altération de la qualité protéique des graines.**

Nous avons déjà souligné le fait que de fortes interactions existent entre la fertilisation S et N, ce qui va avoir des retentissements sur la qualité des graines. Nos résultats ont montré que les doses en S et en N apportées vont avoir un impact sur l'abondance en napines de 12 kDa (protéines riches en acides aminés soufrés) et en cruciférines de 30 kDa (protéines pauvres en acides aminés soufrés) dans les graines, modifiant le ratio entre ces deux types de protéines. **Nous avons donc pensé à utiliser le ratio des abondances [napines:cruciférines 30 kDa] en tant qu'indice de la qualité protéique des graines prenant en compte la balance entre la fertilisation S et N, tout en le couplant avec la teneur en S des graines.** Ainsi, une corrélation a pu être établie entre la teneur en S des graines (permettant de placer le seuil de 0,32 % de S) et le ratio [napines:cruciférines 30 kDa]. Dans nos conditions expérimentales, pour la valeur seuil de 0,32 % de S dans les graines il a été observé un ratio [napines:cruciférines 30 kDa] de 0,25 correspondant à des graines dont la qualité protéique est très affectée et dont les apports en S et en N sont très déséquilibrés. Un ratio compris entre à 0,7 et 2 qui est associé à des teneurs en S comprises entre 0,44 et 0,56 % reflète, dans ces conditions, une bonne qualité protéique tout en ayant des apports de S et de N équilibrés. Un ratio [napines:cruciférines 30 kDa] supérieur à 2, correspondant à une teneur en S de plus de 0,56 %, ne représentera pas une qualité protéique des graines affectée mais correspondra à une fertilisation S et N déséquilibrée (en excès), ne permettant pas une optimisation des pratiques culturales.

Les valeurs des ratios [napines:cruciférines 30 kDa] déterminés pour l'essai au champ sont plus élevés (de 1,6 à 7,8 pour le champ et de 0,5 à 3,3 en serre) mais une corrélation significative a également été établie entre les teneurs en S dans les graines et ce ratio ($R^2 = 0,52$). Ces valeurs plus élevées peuvent être la conséquence des abondances en cruciférines 30 kDa plus faibles en condition de plein champ, probablement dues à l'effet génotype et à l'apport de fertilisants N insuffisants sur

des parcelles présentant un sol superficiel et très drainant. L'azote apporté a pu être drainé et lessivé, le rendant peu disponible pour les plantes. Ceci peut aussi expliquer les très faibles rendements obtenus sur ces parcelles. Cependant, pour vérifier la fiabilité de cet indice, il manque dans cet essai au champ des conditions variables d'apport en N afin de positionner un ratio extrême correspondant à des fertilisations S et N très déséquilibrées.

Afin de contrôler la qualité protéique des graines et d'orienter leur utilisation vers les filières alimentaires et non-alimentaires, la teneur seuil de 0,32 % déterminée en conditions contrôlées a pu être validée en condition de plein champ. Elle permet de discriminer des graines dont la qualité protéique est affectée par une baisse de l'abondance en napines. Une teneur en S dans les graines inférieure ou égale à 0,32 % représentera une perte de qualité en protéines, bien que des teneurs plus élevées en protéines puissent contrebalancer une faible teneur relative en napines. Ce seuil permet également de détecter des déficiences en S au champ associées à un schéma de fertilisation et à un site donné. L'analyse des graines issues de ces sites pourra permettre d'améliorer les pratiques culturales en adaptant et en corrigeant les schémas de fertilisation S. La qualité et la production du tourteau doivent cependant encore être améliorées. Étant donné que la quantité de protéines de la graine est étroitement et inversement liée à la teneur en huile (Borisjuk *et al*., 2013), l'augmentation de la teneur en protéines devra être améliorée sans affecter la teneur souhaitée en huile des graines. Une des voies d'amélioration du colza en tant que culture protéagineuse serait l'intégration des progrès récents en génomique et en bio-informatique afin d'identifier les gènes clés régulant le remplissage en protéines des graines et leur composition en acides aminés notamment soufrés, et les appliquer en tant que marqueurs moléculaires lors de la sélection assistée par marqueur (Bayer *et al*., 2015 ; Edwards *et al*., 2013 ; Gacek *et al*., 2018 ; Pasam *et al.*, 2012).

II.2 Le modèle SuMoToRI : un outil de prédiction de la qualité des graines ?

Il a déjà été démontré l'importance des réserves soufrées accumulées dans la plante lors de la phase végétative, principalement dans les feuilles sous forme de sulfate vacuolaire et plus particulièrement en cas de limitation précoce en S (Dubousset *et al*., 2010 ; Girondé *et al*., 2014). Ces réserves permettent de subvenir aux besoins de la plante et d'alimenter les nouveaux organes en croissance, notamment les graines. On peut alors penser qu'une teneur en S élevée dans les feuilles (sous forme minérale et organique) entre la floraison et le début de formation des siliques représente un pool de réserves soufrées important, gage d'un fort potentiel de remobilisation vers les graines, et ainsi faire l'hypothèse que la teneur en S dans les feuilles est un « proxy » de la qualité protéique grainière.

Pour que le modèle SuMoToRI soit un bon outil de prédiction de la qualité protéique des graines, il fallait dans un premier temps vérifier que la teneur en S dans les feuilles vertes (GL, correspondant à l'ensemble des feuilles présentes sur la plante) au début de la floraison était bien simulée (ou identifier les modalités de fertilisation pour lesquelles la qualité des prédictions était moindre) afin d'envisager d'utiliser cette variable simulée comme un indicateur précoce et fiable de la qualité grainière, notamment de la teneur en S dans les graines. Après cette étape, nous avons associé pour chaque condition de fertilisation, la teneur en S dans les graines à maturité physiologique avec les teneurs en S dans les GL simulées ou observées au début de floraison (seules dates où les teneurs en S étaient disponibles).

Nos résultats ont montré qu'en condition non limitante en N (HN) et pour un apport unique de S à GS32, la teneur en S dans les GL (%S_{GL}) prédite par le modèle peut être un proxy fiable de la qualité protéique des graines quelle que soit la dose de fertilisants S apportée. En effet, plus la teneur en S des GL à la floraison est importante, plus les teneurs en S dans les graines augmente, gage d'une bonne qualité protéique des graines. Les graines avec une teneur inférieure en S de 0,32 % ont une teneur en S dans les GL plus faible en comparaison aux graines de bonne qualité protéique. Il est cependant nécessaire d'intégrer au modèle des formalismes prenant en compte la disponibilité en N et les interactions SxN pour que la valeur simulée de la teneur en S des feuilles soit la plus proche possible des valeurs observées à la floraison dans des conditions non pléthoriques d'apports en N. **Pour des conditions d'apport plus faible en N, le S dans les GL ne suffit pas à prédire de façon sûre la qualité protéique des graines car il existe des interactions avec l'azote.** De même, malgré de bonnes simulations, le modèle ne permet pas de se rendre compte de la qualité protéique des graines grâce à la teneur en S dans les feuilles lors d'apport retardé en S, la plante gérant ses réserves en S différemment des conditions d'apport unique en S à la montaison. En effet, il faut que la remobilisation du S soit efficace jusqu'à maturité des graines, ce qui implique que même avec une forte teneur en S dans les feuilles, la plante doit pouvoir remobiliser ses réserves efficacement, ce qui n'est pas le cas par exemple en condition non limitante en S et en N (30S_HN) pour laquelle l'efficience de remobilisation du S est faible.

II.3 Perspectives

Plusieurs perspectives à ces résultats peuvent être proposées pour approfondir les analyses aux échelles physiologique et agronomique et pour exploiter davantage le modèle SuMoToRI comme outil d'aide à la décision dans différents contextes nutritionnels.

II.3.a Perspectives sur le plan physiologique et agronomique

Une perspective envisageable à moyen terme serait de réaliser **des essais au champ intégrant différents schémas de fertilisation S et N** pour (i) vérifier la pertinence de la valeur seuil de 0,32 % de S dans les graines (étude de la qualité par l'abondance des napines selon un gradient de teneur en S des graines, optimisation de l'analyse de la teneur en S par la technique XRF, collaborations avec l'INRA de Nantes (BIA) pour utiliser les anticorps anti-napines permettant des dosages rapides par ELISA...), et pour (ii) vérifier si le ratio [napines:cruciférines 30 kDa] est représentatif de la bonne conduite de la culture au niveau de l'équilibre de la fertilisation S/N. Comme fait chez le pois (travaux de l'équipe de Karine Gallardo en cours), il serait intéressant de tester les corrélations entre le ratio N-protéique/S-protéique ou N_{total}/S_{total} et les teneurs en napines.

Ces relations et seuils pourraient être vérifiés ou affinés par l'intégration de différentes variétés, afin de tester la généricité des valeurs de ces indices quel que soit le génotype. L'utilisation de ces indices permettrait aussi d'identifier des idéotypes variétaux et culturaux en fonction des schémas de fertilisation S et N préconisés selon les contraintes environnementales et inhérentes aux conduites des exploitations.

Afin de vérifier si la teneur en S dans les feuilles est un proxy pertinent de la qualité protéique des graines, il serait nécessaire de mener des expérimentations supplémentaires afin de mesurer la teneur en S des feuilles (pool de feuilles ou feuilles matures ou feuilles jeunes) de colzas cultivés dans diverses conditions d'alimentation S et N, et de les comparer aux teneurs en S et aux abondances relatives en napines retrouvées dans les graines. Il pourrait de plus être souligné les conditions pour lesquelles les interactions entre les métabolismes S et N affectent les teneurs en S des feuilles et des graines, ceci dans certaines conditions d'alimentation S et N. Le caractère variable de la teneur en S des feuilles étant déjà connu, déterminer les causes de cette variabilité ainsi que les stades de développement les plus sensibles à cette mesure sont des éléments à prendre en compte.

II.3.b Perspectives sur le plan de la modélisation

Une perspective (en cours de développement) concerne **l'extension de la phase de prédiction du modèle jusqu'au stade graines matures dans l'objectif de prévoir le rendement grainier, ses composantes ainsi que des critères de qualité des graines** (teneur en huile et en protéines, composition en acides gras et en protéines, teneur en S des graines). Ce développement requiert la caractérisation de toutes les surfaces photosynthétiques au cours du cycle et notamment celles des siliques qui dès le début de leur phase autotrophe sont des organes photosynthétiques d'autant plus cruciaux que la sénescence foliaire s'accroît, reléguant les feuilles au rang d'organes

photosynthétiques secondaires au cours du stade reproducteur. L'introduction d'un PAI (« Pod Area Index ») pour estimer la biomasse produite grâce à l'interception du rayonnement par ces nouvelles surfaces photosynthétiques est en cours et requiert un paramétrage en fonction de la disponibilité en S qui impacte la cinétique de développement des siliques mais aussi la taille des siliques.

Une deuxième perspective dégagée par ces résultats est **la prise en compte dans le modèle de la disponibilité en N qui influe sur les mécanismes d'efficience d'utilisation du S et sur la qualité nutritionnelle des graines**. En effet, les biomasses totales ainsi que les surfaces des feuilles présentes sur la plante sont correctement simulées et ne sont pas impactées par les différentes conditions de fertilisation S et N entre la fin de vernalisation et le début de formation des siliques. Cependant, les teneurs en S des feuilles sont moins bien simulées selon les conditions de fertilisation S et N testées. Cette variable simulée révèle l'importance d'intégrer la disponibilité en N afin d'améliorer la prévision de critères associés à la qualité grainière notamment, dans des conditions variables en N.

Enfin, il serait également pertinent **d'améliorer les simulations dans des conditions d'apport fractionnés ou décalés qui pourraient s'avérer être de nouvelles modalités de fertilisation efficientes et économes**. Cette amélioration pourrait s'envisager conjointement avec le développement de la phase d'extension du modèle (jusqu'à maturité des graines) puisque la plante gère les réserves en S accumulées jusqu'au début de formation des siliques différemment dans ces conditions d'apport de celles d'un apport unique, ce qui peut impacter *in fine* la qualité protéique des graines. Pour cela, les différentes cultures envisagées pour l'étude de la compréhension des interactions SxN pourraient être utilisées afin de fournir des jeux de données pour proposer un nouveau paramétrage du modèle.

Références bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Abdallah, M., Dubousset, L., Meuriot, F., Etienne, P., Avice, J-C. and 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.

Abdin, M. Z., Ahmad, A., Khan, N., Khan, I., Jamal, A. and Iqbal, M. (2003). Sulphur Interaction with Other Nutrients. *Sulphur in Plants* (Dordrecht: Springer Netherlands), 359–374.

Aguirrezábal, L., Martre, P., Pereyra-Irujo, G., Echarte, M. M. and Izquierdo, N. (2014). Improving grain quality: Ecophysiological and modeling tools to develop management and breeding strategies. *Crop Physiology: Applications for Genetic Improvement and Agronomy: Second Edition*, 423–465.

Ahmad, A., and Abdin, M. Z. (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., and Abdin, M. Z. (2000b). Photosynthesis and its related physiological variables in the leaves of Brassica genotypes as influenced by sulphur fertilization. *Physiologia Plantarum* 110, 144–149.

Ahmad, G., Jan, A., Arif, M., Jan, M. T. and Khattak, R. A. (2007). Influence of nitrogen and sulfur fertilization on quality of canola (*Brassica napus* L.) under rainfed conditions. *Journal of Zhejiang University* 8, 731–737.

Allen, E. J., and Morgan, D. G. (1972). A quantitative analysis of the effects of nitrogen on the growth, development and yield of oilseed rape. *The Journal of Agricultural Science* 78, 315-324.

Altenbach, S. B., Kuo, C. C., Staraci, L. C., Pearson, K. W., Wainwright, C., Georgescu, A. and 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.

Aminpanah, H. (2013). Effect of nitrogen rate on seed yield, protein and oil content of two canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Acta Agriculturae Slovenica* 101, 1–8.

Anjum, N. A., Gill, S. S., Umar, S., Ahmad, I., Duarte, A. C. and Pereira, E. (2012). Improving growth and productivity of Oleiferous Brassicas under changing environment: significance of nitrogen and sulphur nutrition, and underlying mechanisms. *The Scientific World Journal* 2012, 657808.

Araus, J. L., and Cairns, J. E. (2014). Field high-throughput phenotyping: The new crop breeding frontier. *Trends in Plant Science* 19, 52–61.

Arkin, G. F., Vanderlip, R. L. and Ritchie, J. T. (1976). A Dynamic Grain Sorghum Growth Model. *Transactions of the ASAE* 19, 0622–0626.

Arkoun, M., Jannin, L., Laîné, P., Etienne, P., Masclaux-Daubresse, C., Citerne, S., Garnica, M., Garcia-Mina, J. M., Yvin, J-C. and Ourry, A. (2013). A physiological and molecular study of the effects of nickel deficiency and phenylphosphorodiamidate (PPD) application on urea metabolism in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant and Soil* 362, 79–92.

Arnold, W. N., and Thompson, J. F. (1962). The formation of (+) S-methyl-l-cysteine sulfoxide from S-methyl-l-cysteine in crucifers. *Biochimica et Biophysica Acta* 57, 604–606.

Asseng, S., Zhu, Y., Wang, E. and Zhang, W. (2014). Crop modeling for climate change impact and adaptation. *Crop Physiology: Applications for Genetic Improvement and Agronomy: Second Edition* (Elsevier), 505–546.

Avice, J.-C., and Etienne, P. (2014). Leaf senescence and nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany* 65, 3813–3824.

-B-

Balint, T. and Rengel, Z. (2009). Differential sulfur efficiency in canola genotypes at vegetative and grain maturity stage. *Crop and Pasture Science* 60, 262–270.

Balint, T. and 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. and 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.

Balint, T., Rengel, Z. and Allen, D. (2008). Australian canola germplasm differs in nitrogen and sulfur efficiency. *Australian Journal of Agricultural Research* 59, 167–174.

Baszczynski, C. L., and Fallis, L. (1990). Isolation and nucleotide sequence of a genomic clone encoding a new *Brassica napus* napin gene. *Plant Molecular Biology* 14, 633–635.

Baud, S., Boutin, J. P., Miquel, M., Lepiniec, L. and Rochat, C. (2002). An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 151–160.

Baud, S. and Lepiniec, L. (2010). Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Progress in Lipid Research* 49, 235–249.

Baux, A., Wegmüller, J. and Holzkämper, A. (2015). Exploring Climatic Impact on Oilseed Rape Yield in Switzerland. *Procedia Environmental Sciences* 29, 123.

Baxter, I., Muthukumar, B., Hyeong, C. P., Buchner, P., Lahner, B., Danku, J., Zhao, K., Lee, J., Hawkesford, M. J., Guerinot, M. L. and Salt, D. E. (2008). Variation in molybdenum content across broadly distributed populations of *Arabidopsis thaliana* is controlled by a mitochondrial molybdenum transporter (MOT1). *PLOS Genetics* 4, e1000004.

Bayer, P. E., Ruperao, P., Mason, A. S., Stiller, J., Chan, C. K. K., Hayashi, S., Long, Y., Meng, J., Sutton, T., Visendi, P., Varshney, R. K., Batley, J. and Edwards, D.(2015). High-resolution skim genotyping by sequencing reveals the distribution of crossovers and gene conversions in *Cicer arietinum* and *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* 128, 1039–1047.

Beillouin, D. (2017). Conception et évaluation d'idéotypes variétaux et culturaux en orge d'hiver brassicole pour des conduites culturales à bas niveau d'intrants : approche par expérimention et modélisation. Thèse de l'Université Paris-Saclay, Agroparistech, pp. 288.

Belda, M., Holtanová, E., Halenka, T., Kalvová, J. and Hlávka, Z. (2015). Evaluation of CMIP5 present climate simulations using the Köppen-Trewartha climate classification. *Climate Research* 64, 201–212.

Bergez, J. E., Colbach, N., Crespo, O., Garcia, F., Jeuffroy, M. H., Justes, E., Loyce, C., Munier-Jolain, N. and Sadok, W. (2010). Designing crop management systems by simulation. *European Journal of Agronomy* 32, 3–9.

Bérot, S., Compoint, J. P., Larré, C., Malabat, C. and Guéguen, J. (2005). Large scale purification of rapeseed proteins (*Brassica napus* L.). in *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 35–42.

Bewley, J.D. and Black, M. (1994). Seeds: physiology of development and germination 2nd ed. New York, NY, USA: Plenum Press, 445.

Bittner, F. (2014). Molybdenum metabolism in plants and crosstalk to iron. *Frontiers in Plant Science* 5, 28.

Blake-Kalff, M. M. A., Zhao, F. J., McGrath, S. P. and Withers, P. J. A. (2004). Development of the malate:sulphate ratio test for sulphur deficiency in winter wheat and oilseed rape. London: Home-Grown Cereals Authority.

Blake-Kalff, M. M. A., Harrison, K. R., Hawkesford, M. J., Zhao, F. J. and McGrath, S. P. (1998). Distribution of Sulfur within Oilseed Rape Leaves in Response to Sulfur Deficiency during Vegetative Growth. *Plant Physiology* 118, 1337–1344.

Blake-Kalff, M. M. A., Hawkesford, M. J., Zhao, F. J. and McGrath, S. P. (2000). Diagnosing sulfur deficiency in field-grown oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Soil* 225, 95–107.

Blake-Kalff, M. M. A, Zhao, F. J., Hawkesford, M. J. and McGrath, S. P. (2001). Using plant analysis to predict yield losses caused by sulphur deficiency. *Annals of Applied Biology* 138, 123–127.

Bloem, E., Riemenschneider, A., Volker, J., Papenbrock, J., Schmidt, A., Salac, I., Haneklaus, S. and Schnug, E. (2004). Sulphur supply and infection with Pyrenopeziza brassicae influence L-cysteine desulphydrase activity in *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany* 55, 2305–2312.

Bonhomme R., Ruguet F., Derieux M. and Vincourt P. (1982). Relationship between aerial dry matter production and intercepted solar radiation for various maize genotypes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* 294, 393-398.

Borisjuk, L., Neuberger, T., Schwender, J., Heinzel, N., Sunderhaus, S., Fuchs, J., Hay, J. O., Tschiersch, H., Braun, H-P., Denolf, P., Lambert, B., Jakob, P. M. and Rolletschek, H. (2013). Seed architecture shapes embryo metabolism in oilseed rape. *The Plant Cell* 25, 1625–40.

Bourgis, F., Roje, S., Nuccio, M. L., Fisher, D. B., Mitchell, C., Tarczynski, M. C., Li, C., Herschbach, C., Rennenberg, H., Pimenta, M. J., Shen, T. L., Gage, D. A. and Hanson, A. D. (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.

Bouwman, A. F., Boumans, L. J. M. and Batjes, N. H. (2002). Modeling global annual N2O and NO emissions from fertilized fields. *Global Biogeochemical Cycles* 16, 28-1-28–9.

Bradford, M. M. (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.

Brennan, P., Hsu, C. C., Moullan, N., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., Zaridze, D., Rudnai, P., Fabianova, E., Mates, D., Bencko, V., Foretova, L., Janout, V., Gemignani, F., Chabrier, A., Hall, J., Hung, R. J., Boffetta, P. and Canzian, F. (2005). Effect of cruciferous vegetables on lung cancer in patients stratified by genetic status: A mendelian randomisation approach. *Lancet* 366, 1558–1560.

Brisson, N. and Delécolle, R. (1992). Développement et modèles de simulation. Agronomie, EDP Sciences 12, 253–263.

Brisson, N., Mary, B., Ripoche, D., Jeuffroy, M. H., Ruget, F., Nicoullaud, B., Gate, P., Devienne-Barret, F., Antonioletti, R., Durr, C., Richard, G., Beaudoin, N., Recous, S., Tayot, X., Plenet, D., Cellier, P., Machet, J-M., Meynard, J. Ma. and Delécolle, R. (1998). STICS: a generic model for the simulation of crops and their water and nitrogen balances. I. Theory and parameterization applied to wheat and corn. *Agronomie* 18, 311–346.

Brosnan, J. and Brosnan, M. (2006). The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview. *The Journal of nutrition* 136, 16365–16405.

Brunel-Muguet, S., D'Hooghe, P., Bataillé, M.-P., Larré, C., Kim, T.-H., Trouverie, J., Avice, J-C., Etienne, P., Dürr, C. (2015a). Heat stress during seed filling interferes with sulfur restriction on grain composition and seed germination in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Frontiers in Plant Science* 6, 213.

Brunel-Muguet, S., Mollier, A., Kauffmann, F., Avice, J.-C., Goudier, D., Sénécal, E. and Etienne, P. (2015b). SuMoToRI, an Ecophysiological Model to Predict Growth and Sulfur Allocation and Partitioning in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) Until the Onset of Pod Formation. *Frontiers in Plant Science* 6, 993.

Buchner, P. (2004). Regulation of Sulfate Uptake and Expression of Sulfate Transporter Genes in *Brassica oleracea* as Affected by Atmospheric H2S and Pedospheric Sulfate Nutrition. *Plant Physiology* 136, 3396–3408.

-C-

Cariboni, J., Gatelli, D., Liska, R. and Saltelli, A. (2007). The role of sensitivity analysis in ecological modelling. *Ecological Modelling* 203, 167–182.

Carver, M. F. F. (2005). Monitoring winter barley, wheat, oilseed rape and spring barley for sulphur in England and Wales to predict fertiliser need. The Arable Group, Manor Farm, Daglingworth, Cirencester, Gloucestershire, GL7 7AH.

Casadebaig, P., Zheng, B., Chapman, S., Huth, N., Faivre, R. and Chenu, K. (2016). Assessment of the potential impacts of wheat plant traits across environments by combining crop modeling and global sensitivity analysis. *PLOS ONE* 11, 1–27.

Challinor, A. J., Müller, C., Asseng, S., Deva, C., Nicklin, K. J., Wallach, D., Vanuytrecht, E., Whitfield, S., Ramirez-Villegas, J. and Koehler, A. K. (2017). Improving the use of crop models for risk assessment and climate change adaptation. *Agricultural Systems*, 1–0.

Challinor, A. J., Watson, J., Lobell, D. B., Howden, S. M., Smith, D. R. and Chhetri, N. (2014). A meta-analysis of crop yield under climate change and adaptation. *Nature Climate Change* 4, 287–291.

Chenu, K., Porter, J. R., Martre, P., Basso, B., Chapman, S. C., Ewert, F., Bindi, M. and Asseng, S. (2017). Contribution of Crop Models to Adaptation in Wheat. *Trends in Plant Science* 22, 472–490.

Christy, B., O'Leary, G., Riffkin, P., Acuna, T., Potter, T. and Clough, A. (2013). Long-season canola (*Brassica napus* L.) cultivars offer potential to substantially increase grain yield production in south-eastern Australia compared with current spring cultivars. *Crop and Pasture Science* 64 (9), 901-913.

Clausen, S. K., Frenck, G., Linden, L. G., Mikkelsen, T. N., Lunde, C. and Jørgensen, R. B. (2011). Effects of Single and Multifactor Treatments with Elevated Temperature, CO_2 and Ozone on Oilseed Rape and Barley. *Journal of Agronomy and Crop Science* 197, 442–453.

Cobb, J. N., DeClerck, G., Greenberg, A., Clark, R. and McCouch, S. (2013). Next-generation phenotyping: Requirements and strategies for enhancing our understanding of genotype-phenotype relationships and its relevance to crop improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 126, 867–887.

Colbach, N., Molinari, N. and Clermont-Dauphin, C. (2004). Sensitivity analyses for a model simulating demography and genotype evolutions with time. *Ecological Modelling* 179, 91–113.

Coleto, I., de la Peña, M., Rodríguez-Escalante, J., Bejarano, I., Glauser, G., Aparicio-Tejo, P. M., González-Moro, M. B. and Marino, D. (2017). Leaves play a central role in the adaptation of nitrogen and sulfur metabolism to ammonium nutrition in oilseed rape (*Brassica napus*). *BMC Plant Biology* 17.

Colnenne, C. (1998). Determination of a Critical Nitrogen Dilution Curve for Winter Oilseed Rape. *Annals of Botany* 81, 311–317.

Covington, M. B. (2004). Omega-3 fatty acids. *American Family Physician* 70, 133–140.

-D-

D'Hooghe, P. (2013). 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. Thèse de l'*Universitée de Caen Basse-Normandie*, pp. 229.

D'Hooghe, P., Bataillé, M. P., Trouverie, J. and 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* 27, 2737–2744.

D'Hooghe, P., Dubousset, L., Gallardo, K., Kopriva, S., Avice, J.-C. and Trouverie, J. (2014). Evidence for Proteomic and Metabolic Adaptations Associated with Alterations of Seed Yield and Quality in Sulfur-limited *Brassica napus* L. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 13, 1165–1183.

D'Hooghe, P., Escamez, S., Trouverie, J. and 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, 23.

Da Silva, P. M. F. R., Eastmond, P. J., Hill, L. M., Smith, A. M. and Rawsthorne, S. (1997). Starch metabolism in developing embryos of oilseed rape. *Planta* 203, 480–487.

DaMatta, F. M., Grandis, A., Arenque, B. C. and Buckeridge, M. S. (2010). Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. *Food Research International* 43, 1814–1823.

Davies, W. P. (2003). An Historical Perspective from the Green Revolution to the Gene Revolution. *Nutrition Reviews* 61, S124–S134.

Dawar, K., Iqbal, J. and Wahab, S. (2016). Effect of Sulfur on Nitrogen Use Efficiency and Yield of Maize Crop. *Advances in Environmental Biology* 10, 85–90.

De Kok, L. J., Castro, A., Durenkamp, M., Koralewska, A., Posthumus, F. S. and Stuiver, C. E. E. (2005). Pathways of plant sulfur uptake and metabolism - an overview. Sonderheft 283 Proceedings of the 1 Sino-German Workshop on Aspects of Sulfur Nutrition of Plants. *Landbauforschung Vôlkenrode* 283, 5–13.

De Wit, C. T., Brouwer, R. and de Vries, F. W. T. (1970). The simulation of photosynthetic systems. *Prediction and Measurement of Photosynthetic Productivity. Proceedings of the IBP/PP Technical Meeting, Trebon, 14-21 September 1969*, 47–70.

Debaeke, P., Gauffreteau, A., Durel, C. E. and Jeuffroy, M.-H. (2015). Conception d'idéotypes variétaux en réponse aux nouveaux contextes agricoles et environnementaux. *Agronomie Environnement et Sociétés*, 4 (2), 9.

Desclos, M., Etienne, P., Coquet, L., Jouenne, T., Bonnefoy, J., Segura, R., Reze, S., Ourry, A. and Avice, J-C. (2009). A combined^{15}N tracing/proteomics study in *Brassica napus* reveals the chronology of proteomics events associated with N remobilisation during leaf senescence induced by nitrate limitation or starvation. *Proteomics* 9, 3580–3608.

Dixon, D. P., Skipsey, M. and Edwards, R. (2010). Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 71, 338–350.

Donald, C. M. (1968). The breeding of crop ideotypes. *Euphytica* 17, 385–403.

Dong, Q., Louarn, G., Wang, Y., Barczi, J. F., De Reffye, P. (2008). Does the structure-function model GREENLAB deal with crop phenotypic plasticity induced by plant spacing? A case study on tomato. *Annals of Botany* 101 (8), 1195-1206.

Dosio, G. A. A., Aguirrezábal, L. A. N., Andrade, F. H. and Pereyra, V. R. (2000). Solar radiation intercepted during seed filling and oil production in two sunflower hybrids. *Crop Science* 40, 1637–1644.

Droux, M., Ruffet, M. L., Douce, R. and Job, D. (1998). Interactions between serine acetyltransferase and O-acetylserine (thiol) lyase in higher plants. Structural and kinetic properties of the free and bound enzymes. *European Journal of Biochemistry* 255, 235–245.

Dubousset, L., Abdallah, M., Desfeux, A. S., Etienne, P., Meuriot, F., Hawkesford, M. J., Gombert, J., Ségura, R., Bataillé, M. P., Rezé, S., Bonnefoy, J., Ameline, A. F., Ourry, A., Le Dily, F. and Avice, J-C. (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. and 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.

Dufresne, J.-L., Foujols, M.-A., Denvil, S., Caubel, A., Marti, O., Aumont, O., Balkanski, Y., Bekki, S., Bellenger, H., Benshila, R., Bony, S., Bopp, L., Braconnot, P., Brockmann, P., Cadule, P., Cheruy, F., Codron, F., Cozic, A., Cugnet, D., de Noblet, N., Duvel, J. P., Ethé, C., Fairhead, L., Fichefet, T., Flavoni, S., Friedlingstein, P., Grandpeix, J. Y., Guez, L., Guilyardi, E., Hauglustaine, D., Hourdin, F., Idelkadi, A., Ghattas, J., Joussaume, S., Kageyama, M., Krinner, G., Labetoulle, S., Lahellec, A., Lefebvre, M. P., Lefevre, F., Levy, C., Li, Z. X., Lloyd, J., Lott, F., Madec, G., Mancip, M., Marchand, M., Masson, S., Meurdesoif, Y., Mignot, J., Musat, I., Parouty, S., Polcher, J., Rio, C., Schulz, M., Swingedouw, D., Szopa, S., Talandier, C., Terray, P., Viovy, N. and Vuichard, N. (2013). Climate change projections using the IPSLCM5 earth system model: from CMIP3 to CMIP5. *Climate Dynamics* 40, 2123.

-E-

Eastmond, P. J. and Graham, I. A. (2001). Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends in Plant Science* 6, 72–77.

Eastmond, P. J. and Rawsthorne, S. (2000). Coordinate Changes in Carbon Partitioning and Plastidial Metabolism during the Development of Oilseed Rape Embryos. *Plant Physiology* 122, 767–774.

Edmands, W. M. B., Gooderham, N. J., Holmes, E. and Mitchell, S. C. (2013). S-Methyl- 1 -cysteine sulphoxide: the Cinderella phytochemical? *Toxicology Research* 2, 11–22.

Edwards, D., Batley, J. and Snowdon, R. J. (2013). Accessing complex crop genomes with next-generation sequencing. *Theoretical and Applied Genetics* 126, 1–11.

Etienne, P., Sorin, E., Maillard, A., Gallardo, K., Arkoun, M., Guerrand, J., Cruz, F., Yvin, J-C. and Ourry, A. (2018). Assessment of Sulfur Deficiency under Field Conditions by Single Measurements of Sulfur, Chloride and Phosphorus in Mature Leaves. *Plants* 7, 37.

Evans, N., Butterworth, M. H., Baierl, A., Semenov, M. A., West, J. S., Barnes, A., Moran, D. and Fitt, B. D. L. (2010). The impact of climate change on disease constraints on production of oilseed rape. *Food Security* 2, 143–156.

-F-

Fahlgren, N., Feldman, M., Gehan, M. A., Wilson, M. S., Shyu, C., Bryant, D. W., Hill, Steven T., McEntee, C. J., Warnasooriya, S. N., Kumar, I., Ficor, T., Turnipseed, S., Gilbert, K., B., Brutnell, T. P., Carrington, J. C., Mockler, T. C. and Baxter, I. (2015). A versatile phenotyping system and analytics platform reveals diverse temporal responses to water availability in Setaria. *Molecular Plant* 8, 1520–1535.

Fismes, J., Vong, P. C., Guckert, A. and 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.

Foster, R., Williamson, C. S. and Lunn, J. (2009). Culinary oils and their health effects. *Nutrition Bulletin* 34, 4–47.

Foyer, C. H. and Noctor, G. (2011). Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology* 155, 2–18.

Foyer, C. H., Theodoulou, F. L. and Delrot, S. (2001). The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends in Plant Science* 6, 486–492.

Fox, J. (2005). The R commander: A basic-Statistics Graphical User Interface to R. *Journal of Statistical Software* 14 (9), 1-42.

Franzaring, J., Högy, P. and Fangmeier, A. (2008). Effects of free-air CO_2 enrichment on the growth of summer oilseed rape (*Brassica napus* cv. Campino). *Agriculture, Ecosystems & Environment* 128, 127–134.

Franzaring, J., Weller, S., Schmid, I. and Fangmeier, A. (2011). Growth, senescence and water use efficiency of spring oilseed rape (*Brassica napus* L. cv. Mozart) grown in a factorial combination of nitrogen supply and elevated CO_2. *Environmental and Experimental Botany* 72, 284–296.

Friedrich, J. W. and Schrader, L. E. (1978). Sulfur Deprivation and Nitrogen Metabolism in Maize Seedlings. *Plant Physiology* 61, 900–903.

Furbank, R. T. and Tester, M. (2011). Phenomics - technologies to relieve the phenotyping bottleneck. *Trends in Plant Science* 16, 635–644.

-G-

Gabrielle, B., Denoroy, P., Gosse, G., Justes, E. and Andersen, M. N. (1998a). A model of leaf area development and senescence for winter oilseed rape. *Field Crops Research* 57, 209–222.

Gabrielle, B., Denoroy, P., Gosse, G., Justes, E. and Andersen, M. N. (1998b). Development and evaluation of a CERES-type model for winter oilseed rape. *Field Crops Research* 57, 95–111.

Gacek, K., Bartkowiak-Broda, I. and Batley, J. (2018). Genetic and Molecular Regulation of Seed Storage Proteins (SSPs) to Improve Protein Nutritional Value of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) Seeds. *Frontiers in Plant Science* 9, 890.

Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P. C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J. and Job, D. (2002). Proteomics of Arabidopsis seed germination. A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiology* 129, 823–37.

Gaudin, Z. (2013). Place de l'azote dans l'interaction plante - plante parasite : *Brassica napus* L . – *Phelipanche ramosa* (L .) Thèse de l'Univeristé de Nantes, pp. 427.

Gheisari, A. and Ghayor, P. (2014). Different Dietary Levels of Rapeseed Meal Effects on Egg Quality Characteristics in Indigenous Breeding Hens. *Journal of Farm Animal Nutrition and Physiology* 9/1, 1–8.

Gilardelli, C., Stella, T., Frasso, N., Cappelli, G., Bregaglio, S., Chiodini, M. E., Scaglia, B. and Confalonieri, R. (2016). WOFOST-GTC: A new model for the simulation of winter rapeseed production and oil quality. *Field Crops Research* 197, 125-132.

Girondé, A., Dubousset, L., Trouverie, J., Etienne, P. and Avice, J.-C. (2014). The impact of sulfate restriction on seed yield and quality of winter oilseed rape depends on the ability to remobilize sulfate from vegetative tissues to reproductive organs. *Frontiers in Plant Science* 5, 695.

Girondé, A., Etienne, P., Trouverie, J., Bouchereau, A., Le Cahérec, F., Leport, L., Orsel, M., Niogret, M. F., Nesi, N., Carole, D., Soulay, F., Masclaux-Daubresse, C. and Avice, J-C. (2015a). The contrasting N management of two oilseed rape genotypes reveals the mechanisms of proteolysis associated with leaf N remobilization and the respective contributions of leaves and stems to N storage and remobilization during seed filling. *BMC Plant Biology* 15, 59.

Girondé, A., Poret, M., Etienne, P., Trouverie, J., Bouchereau, A., Le Cahérec, F., Leport, L., Orsel, M., Niogret, M. F., Deleu, C. and Avice, J-C. (2015b). A profiling approach of the natural variability of foliar N remobilization at the rosette stage gives clues to understand the limiting processes involved in the low N use efficiency of winter oilseed rape. *Journal of Experimental Botany* 66, 2461–2473.

Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M. and Toulmin, C. (2010). Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science* 327, 812–818.

Gosse, G., Varlet-grancher, C., Bonhomme, R., Allirand, J. and Lemaire, G. (1986). Production maximale de matière sèche et rayonnement solaire intercepté par un couvert végétal. *Agronomie, EDP Sciences* 6, 47–56.

Grant, C. A., Mahli, S. S. and Karamanos, R. E. (2012). Sulfur management for rapeseed. *Field Crops Research* 128, 119–128.

Greenwood, D. J., Lemaire, G., Gosse, G., Cruz, P., Draycott, A. and Neeteson, J. J. (1990). Decline in percentage N of C3 and C4 crops with increasing plant mass. *Annals of Botany* 66, 425–436.

Guerche, P., De Almeida, E. R. P., Schwarztein, M. A., Gander, E., Krebbers, E. and Pelletier, G. (1990). Expression of the 2S albumin from Bertholletia excelsa in *Brassica napus*. *Molecular & General Genetics* 221, 306–314.

-H-

Habekotté, B. (1997a). Indentification of strong and weak yield determining components of winter oilseed rape compared with winter wheat. *European Journal of Agronomy* 7 (4), 315-321.

Habekotté, B. (1997b) Description, parameterization and user guide of LINTUL-BRASNAP 1.1 : a crop growth model of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *DLO Research Institute for Agrobiology and Soil Fertility*.

Hampton, J. G., Boelt, B., Rolston, M. P. and Chastain, T. G. (2013). Effects of elevated CO_2 and temperature on seed quality. *The Journal of Agricultural Science* 151, 154–162.

Haneklaus, S., Bloem, E. and Schnug, E. (2008). History of Sulfur Deficiency in Crops Sulfur—Yellow Poison or Jilted Plant Nutrient? *Sulfur: A Missing Link between Soils, Crops, and Nutrition. Agronomy Monograph 50*, 45–58.

Hannoufa, A., Pillai, B. V. S. and Chellamma, S. (2014). Genetic enhancement of Brassica napus seed quality. *Transgenic Research* 23, 39–52.

Hansen, S., Jensen, H. E., Nielsen, N. E., and Svendsen, H. (1990). DAISY - Soil Plant Atmosphere System Model. *NPO Report No. A 10. The National Agency for Environmental Protection*, 1–276.

Hansen, S., Jensen, H. E., Nielsen, N. E. and Svendsen, H., (1991). Simulation of nitrogen dynamics and biomass production in winter wheat using the Danish simulation model DAISY. *Fertilizer Research 27* (2-3), 245-259.

Hawkesford, M. J. (2000). Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. *Journal of Experimental Botany* 51 (342), 131-138.

Hawkesford, M. J. (2003). Transporter gene families in plants: The sulphate transporter gene family - Redundancy or specialization? *Physiologia Plantarum* 117, 155–163.

Hawkesford, M. J. and De Kok, L. J. (2006). Managing sulphur metabolism in plants. *Plant, Cell and Environment* 29, 382–395.

Hawkins, E., Osborne, T. M., Ho, C. K. and Challinor, A. J. (2013). Calibration and bias correction of climate projections for crop modelling: An idealised case study over Europe. *Agricultural and Forest Meteorology* 170, 19–31.

Hesse, H. and Hoefgen, R. (2008). "Metabolism of methionine in plants and phototrophic bacteria," in *Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms* (Springer, Dordrecht), 93–110.

Hesse, H., Nikiforova, V., Gakière, B. and Hoefgen, R. (2004). Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: Integration of nitrogen and sulphur metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 1283–1292.

Higashi, Y., Hirai, M. Y., Fujiwara, T., Naito, S., Noji, M. and 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. *Plant Journal* 48, 557–571.

Higgins, T. J. V, Chandler, P. M., Randall, P. J., Spencer, D., Beach, L. R., Blagroves, R. J., Kortt, A. A. and Inglis, A. S. (1986). Gene Structure, Protein Structure, and Regulation of the Synthesis of a Sulfur-rich Protein in Pea Seeds*. *The Journal of Biological Chemistry* 261, 11124–11130.

Hirai, M. Y., Fujiwara, T., Chino, M. and 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 & Cell Physiology* 36, 1331–9.

Hirai, M. Y., Klein, M., Fujikawa, Y., Yano, M., Goodenowe, D. B., Yamazaki, Y., Kanaya, S., Nakamura, Y., Kitayama, M., Suzuki, H., Sakurai, N., Shibata, D., Tokuhisa, J., Reichelt, M., Gershenzon, J., Papenbrock, J. and Saito, K. (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, M. Y. and Saito, K. (2004). Post-genomics approaches for the elucidation of plant adaptive mechanisms to sulphur deficiency. *Journal of Experimental Botany* 55, 1871–1879.

Hoefgen, R. and Nikiforova, V. J. (2008). Metabolomics integrated with transcriptomics: Assessing systems response to sulfur-deficiency stress. *Physiologia Plantarum* 132 (2), 190-198.

Honsel, A., Kojima, M., Haas, R., Frank, W., Sakakibara, H., Herschbach, C. and Rennenberg, H. (2012). Sulphur limitation and early sulphur deficiency responses in poplar: Significance of gene expression, metabolites, and plant hormones. *Journal of Experimental Botany* 63, 1873–1893.

Hung, S., Umemura, T., Yamashiro, S., Slinger, S. J. and Holub, B. J. (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.

Husson, F., Wallach, D. and Vandeputte, B. (1998). Evaluation of CECOL, a model of winter rape (*Brassica napus* L.). *European Journal of Agronomy* 8 (3-4), 205-214.

-I-

Imran, and Khan, A. A. (2017). Canola yield and quality enhanced with sulphur fertilization. *Russian Agricultural Sciences* 43, 113–119.

Ingestad, T. and Lund, A.-B. (1986). Theory and techniques for steady state mineral nutrition and growth of plants. *Scandinavian Journal of Forest Research* 1, 439–453.

Inman, M. (2011). Opening the future. *Nature Climate Change* 1, 7–9.

Iooss, B. (2011). Revue sur l 'analyse de sensibilité globale de modèles numériques. *Journal de la société françaoise de statistique, Société française de statistique et société mathématique de France* 152, 1–23.

Iooss, B. and Lemaître, P. (2015). A Review on Global Sensitivity Analysis Methods. *Uncertainty management in Simulation-Optimization of Complex Systems: Algorithms and Applications*, 101–122.

IPCC (2014). *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. IPCC

Izquierdo, N. G., Dosio, G. A. A., Cantarero, M., Luján, J. and Aguirrezábal, L. A. N. (2008). Weight per grain, oil concentration, and solar radiation intercepted during grain filling in black hull and striped hull sunflower hybrids. *Crop Science* 48, 688–699.

-J-

Jamieson, P. D., Semenov, M. A., Brooking, I. R. and Francis, G. S. (1998). Sirius: a mechanistic model of wheat response to environmental variation. *European Journal of Agronomy* 8, 161–179.

Janzen, H. H. and Bettany, J. R. (1984). Sulfur Nutrition of Rapeseed: I. Influence of Fertilizer Nitrogen and Sulfur Rates1. *Soil Science Society of America Journal* 48, 100.

Jeuffroy, M. H. and Recous, S. (1999). Azodyn: A simple model simulating the date of nitrogen deficiency for decision support in wheat fertilization. *European Journal of Agronomy* 10, 129–144.

Jeuffroy, M. H., Valantin-Morison, M., Champolivier, L. and Reau, R. (2006). Azote, rendement et qualité des graines: Mise au point et utilisation du modèle Azodyn-colza pour améliorer les performances du colza vis-à-vis de l'azote. *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides* 13, 388–392.

Jones, C. A., Kiniry, J. R., James R. and Dyke, P. T. (1986). *CERES-Maize : a simulation model of maize growth and development*. Texas A & M University Press.

Joshi, N. L., Mali, P. C. and Saxena, A. (1998). Effect of Nitrogen and Sulphur Application on Yield and Fatty acid Composition of Mustard (*Brassica juncea* L.) Oil. *Journal of Agronomy and Crop Science* 180, 59–63.

Jullien, A., Allirand, J.-M., Cournède, P.-H., Mathieu, A., de Reffye, P. and Ney, B. (2007). Is it possible to simulate rapeseed organ mass in relation to N nutrition? Calibration of the functional-structural model GreenLab for the oilseed rape *Brassica napus* L. during the vegetative phase for two nitrogen nutrition levels. in *Proceedings of the 12th International Rapeseed Congress, Wuhan, China (2007).*

Jullien, A., Allirand, J. M., Mathieu, A., Andrieu, B. and Ney, B. (2009). Variations in leaf mass per area according to N nutrition, plant age, and leaf position reflect ontogenetic plasticity in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Field Crops Research* 114, 188–197.

Jullien, A., Mathieu, A., Allirand, J. M., Pinet, A., De Reffye, P., Cournède, P. H. and Ney, B. (2011). Characterization of the interactions between architecture and sourcesink relationships in winter oilseed rape (*Brassica napus*) using the GreenLab model. *Annals of Botany* 107 (5), 765-779.

-K-

Kapusta-Duch, J., Kopec, A., Piatkowska, E., Borczak, B. and Leszczynska, T. (2012). The beneficial effects of Brassica vegetables on human health. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny* 63, 389–395.

Karmoker, J. L., Clarkson, D. T., Saker, L. R., Rooney, J. M. and Purves, J. V. (1991). Sulphate deprivation depresses the transport of nitrogen to the xylem and the hydraulic conductivity of barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Planta* 185, 269–278.

Kataoka, T., Hayashi, N., Yamaya, T. and 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, M. J., Yamaya, T. and Takahashi, H. (2004b). Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16, 2693–704.

Kaur, G., Chandna, R., Pandey, R., Abrol, Y. P., Iqbal, M. and Ahmad, A. (2011). Sulfur starvation and restoration affect nitrate uptake and assimilation in rapeseed. *Protoplasma* 248, 299–311.

Kersebaum, K. C. and Richter, J. (1991). Modelling nitrogen dynamics in a plant-soil system with a simple model for advisory purposes. *Fertilizer Research* 27 (2-3), 273-281.

Kersebaum, K. C. (1995). Application of a simple management model to simulate water and nitrogen dynamics. *Ecological Modelling* 81 (1-3), 145-156.

Kersebaum, K. C. (2007). Modelling nitrogen dynamics in soil-crop systems with HERMES. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 77 (1), 39-52.

Khan, N. A., Mobin, M. and Samiullah (2005). The influence of gibberellic acid and sulfur fertilization rate on growth and S-use efficiency of mustard (*Brassica juncea*). *Plant and Soil* 270, 269–274.

Kiniry, J. R., Williams, J. R., Major, D. J., Izaurralde, R. C., Gassman, P. W., Morrison, M., Bergentine, R. and Zentner, R. P. (1995). EPIC model parameters for cereal, oilseed, and forage crops in the northern Great Plains region. *Canadian Journal of Plant Science* 75 (3), 679-688.

Kohno-Murase, J., Murase, M., Ichikawa, H. and Imamura, J. (1994). Effects of an antisense napin gene on seed storage compounds in transgenic *Brassica napus* seeds. *Plant Molecular Biology* 26, 1115–1124.

Kohno-Murase, J., Murase, M., Ichikawa, H. and Imamura, J. (1995). Improvement in the quality of seed storage protein by transformation of *Brassica napus* with an antisense gene for cruciferin. *Theoretical and Applied Genetics* 91, 627–631.

Kopriva, S. and Koprivova, A. (2004). Plant adenosine 5′-phosphosulphate reductase: The past, the present, and the future. in *Journal of Experimental Botany* (Oxford University Press), 1775–1783.

Kopriva, S., Mugford, S. G., Matthewman, C. and Koprivova, A. (2009). Plant sulfate assimilation genes: Redundancy versus specialization. *Plant Cell Reports* 28, 1769–1780.

Kopriva, S. and Rennenberg, H. (2004). Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: Interaction with N and C metabolism. in *Journal of Experimental Botany* (Oxford University Press), 1831–1842.

Koprivova, A. and Kopriva, S. (2014). Molecular mechanisms of regulation of sulfate assimilation: first steps on a long road. *Frontiers in Plant Science* 5, 589.

Koprivova, A., Suter, M., den Camp, R. O., Brunold, C. and Kopriva, S. (2000). Regulation of Sulfate Assimilation by Nitrogen in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 122, 737–746.

Koralewska, A., Posthumus, F. S., Stuiver, C. E. E., Buchner, P., Hawkesford, M. J. and De Kok, L. J. (2007). The characteristic high sulfate content in *Brassica oleracea* is controlled by the expression and activity of sulfate transporters. *Plant Biology* 9, 654–661.

Kuai, J., Sun, Y., Zhou, M., Zhang, P., Zuo, Q., Wu, J. and Zhou, G. (2016). The effect of nitrogen application and planting density on the radiation use efficiency and the stem lignin metabolism in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Field Crops Research* 199, 89–98.

Kuai, J., Sun, Y., Zuo, Q., Huang, H., Liao, Q., Wu, C., Lu, J., Wu, J. and Zhou, G. (2015). The yield of mechanically harvested rapeseed (*Brassica napus* L.) can be increased by optimum plant density and row spacing. *Scientific Reports* 5, 14.

Kumar, M. (2016). Impact of climate change on crop yield and role of model for achieving food security. *Environmental Monitoring and Assessment* 188, 465.

-L-

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Lambrix, V. (2001). The Arabidopsis Epithiospecifier Protein Promotes the Hydrolysis of Glucosinolates to Nitriles and Influences Trichoplusia ni Herbivory. *The Plant Cell* 13, 2793–2807.

Lancashire, P. D., Bleiholder, H., Boom, T. Van Den, Langelüddeke, P., Stauss, R., Weber, E. and Witzenberger, A. (1991). A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Annals of Applied Biology* 119, 561–601.

Lappartient, A. G., Vidmar, J. J., Leustek, T., Glass, A. D. and 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.

Lassaletta, L., Billen, G., Grizzetti, B., Anglade, J. and Garnier, J. (2014). 50 year trends in nitrogen use efficiency of world cropping systems: The relationship between yield and nitrogen input to cropland. *Environmental Research Letters* 9, 105011.

Lee, B.-R., Zaman, R., Avice, J.-C., Ourry, A. and Kim, T.-H. (2016). Sulfur Use Efficiency Is a Significant Determinant of Drought Stress Tolerance in Relation to Photosynthetic Activity in *Brassica napus* Cultivars. *Frontiers in Plant Science* 7, 459.

Lemaire, G. and Gastal, F. (1997). N Uptake and Distribution in Plant Canopies. *Diagnosis of the Nitrogen Status in Crops* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 3–43.

Leustek, T. and Saito, K. (1999). Sulfate Transport and Assimilation in Plants. *Plant Physiology* 120, 637–644.

Lewandowska, M. and Sirko, A. (2008). Recent advances in understanding plant response to sulfur-deficiency stress. *Acta Biochimica Polonica* 55, 457–471.

Li, X., Wagner, F., Peng, W., Yang, J. and Mauzerall, D. L. (2017). Reduction of solar photovoltaic resources due to air pollution in China. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 11867–11872.

Lindahl, M. and 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.

London, S. J., Yuan, J. M., Chung, F. L., Gao, Y. T., Coetzee, G. a, Ross, R. K. and Yu, M. C. (2000). Isothiocyanates, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China. *Lancet* 356, 724–729.

López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A. and Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 280–287.

-M-

Madan, P., Jagadish, S. V. K., Craufurd, P. Q., Fitzgerald, M., Lafarge, T. and Wheeler, T. R. (2012). Effect of elevated CO_2 and high temperature on seed-set and grain quality of rice. *Journal of Experimental Botany* 63, 3843–3852.

Maillard, A., Sorin, E., Etienne, P., Diquélou, S., Koprivova, A., Kopriva, S., Arkoun, M., Gallardo, K., Turner, M., Cruz, F., Yvin, J-C. and Ourry, A. (2016). Non-Specific root transport of nutrient gives access to an early nutritional indicator: The case of sulfate and molybdate. *PLOS ONE* 11, e0166910.

Maiorano, A., Martre, P., Asseng, S., Ewert, F., Müller, C., Rötter, R. P., Ruane, Alex C., Semenov, M. A., Wallach, D., Wang, E., Alderman, P. D., Kassie, B. T., Biernath, C., Basso, B., Cammarano, D., Challinor, A. J., Doltra, J., Dumont, B., Rezaei, E. E., Gayler, S., Kersebaum, Kurt C., Kimball, B. A., Koehler, A. K., Liu, B., O'Leary, G. J., Olesen, J. E., Ottman, M. J., Priesack, E., Reynolds, M., Stratonovitch, P., Streck, T., Thorburn, P. J., Waha, K., Wall, G. W., White, J. W., Zhao, Z. and Zhu, Y. (2017). Crop model improvement reduces the uncertainty of the response to temperature of multi-model ensembles. *Field Crops Research* 202, 5–20.

Malabat, C., Atterby, H., Chaudhry, Q., Renard, M. and Guéguen, J. (2003). Genetic variability of rapeseed protein composition. *Proceedings of the 11th International Rapeseed Congress*, 205–208.

Malagoli, P., Lainé, P., Le Deunff, E., Rossato, L., Ney, B. and Ourry, A. (2004). Modeling Nitrogen Uptake in Oilseed Rape cv Capitol during a Growth Cycle Using Influx Kinetics of Root Nitrate Transport Systems and Field Experimental Data. *Plant Physiology* 134 (1), 388-400.

Malhi, S., Schoenau, J. and Grant, C. A. (2004). A review of sulphur fertilizer management for optimum yield and quality of canola in the Canadian Great Plains. *Canadian Journal of Plant Science* 85 (2), 297-307.

Malhi, S. S., Gan, Y. and Raney, J. P. (2007). Yield, Seed Quality, and Sulfur Uptake of Oilseed Crops in Response to Sulfur Fertilization. *Agronomy Journal* 99, 570.

Malhi, S. S. and Gill, K. S. (2007). Interactive effects of N and S fertilizers on canola yield and seed quality on S-deficient Gray Luvisol soils in northeastern Saskatchewan. *Canadian Journal of Plant Science* 87, 211–222.

Marks, H. S., Hilson, J. A., Leichtweis, H. C. and Stoewsand, G. S. (1992). S-Methylcysteine Sulfoxide in Brassica Vegetables and Formation of Methyl Methanethiosulfinate from Brussels Sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 2098–2101.

Martre, P., Quilot-Turion, B., Luquet, D., Memmah, M. M. O. S., Chenu, K. and Debaeke, P. (2014). Model-assisted phenotyping and ideotype design. *Crop Physiology: Applications for Genetic Improvement and Agronomy: Second Edition*, 349–373.

Maruyama-Nakashita, A. (2003). Transcriptome Profiling of Sulfur-Responsive Genes in Arabidopsis Reveals Global Effects of Sulfur Nutrition on Multiple Metabolic Pathways. *Plant Physiology* 132, 597–605.

Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Tohge, T., Saito, K. and Takahashi, H. (2006). Arabidopsis SLIM1 Is a Central Transcriptional Regulator of Plant Sulfur Response and Metabolism. *The plant Cell* 18, 3235–3251.

Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Yamaya, T. and Takahashi, H. (2004). Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: Towards systematic analysis of sulphur signalling and reguation. *Journal of Experimental Botany* 55, 1843–1849.

Mathieu, A., Cournde, P. H., Letort, V., Barthélémy, D. and De Reffye, P. (2009). A dynamic model of plant growth with interactions between development and functional mechanisms to study plant structural plasticity related to trophic competition. *Annals of Botany* 103 (8), 1173-1186.

Mawson, R. and Heaney, R. K. (1994). Rapeseed meal-glucosinolates and their antinutritional effects. Part 3. Animal growth and performance. *Molecular Nutrition Food Research* 38, 167–177.

Mawson, R., Heaney, R. K., Piskula, M. and Kozlowska, H. (1993). Rapeseed meal-glucosinolates and their antinutritional effects Part 1. Rapeseed production and chemistry of glucosinolates. *Food / Nahrung* 37, 131–140.

Maynard, D. G., Stewart, J. W. B., Bettany, J. R., Mlvuano, D. G. and Eno Bprrany, J. W. B. (1983). Use of plant analysis to predict sulfur deficiency in Rapeseed (*Brassica napus* and *B. campestris*). *Canadian Journal of Soil Science* 63, 387–396.

McCown, R., Hammer, G., Hargreaves J., Holzworth, D. P. and Freebairn, D. M. (1996). APSIM: a novel software system for model development, model testing and simulation in agricultural systems research. *Agricultural Systems* 50 (3), 255-271.

McGrath, S. P. and Zhao, F. J. (1996). Sulphur uptake, yield responses and the interactions between nitrogen and sulphur in winter oilseed rape (*Brassica napus*). *The Journal of Agricultural Science* 126, 53–62.

McGrath, S. P., Zhao, F. J. and Blake-Kalff, M. M. (2002). History and outlook for sulphur fertilizers in {Europe}. *Fertilizers Fertilization* 2, 5–27.

Mckay, M. D., Beckman, R. J. and Conover, W. J. (1979). Comparison of Three Methods for Selecting Values of Input Variables in the Analysis of Output from a Computer Code A Comparison of Three Methods for Selecting Values of Input Variables in the Analysis of Output from a Computer Code. *Technometrics* 21, 239–245.

McNeill, A. M., Eriksen, J., Bergström, L., Smith, K. A., Marstorp, H., Kirchmann, H. and Nilsson, I. (2005). Nitrogen and sulphur management: challenges for organic sources in temperate agricultural systems. *Soil Use and Management* 21, 82–93.

Mollier, A., De Willigen, P., Heinen, M., Morel, C., Schneider, A. and Pellerin, S. (2008). A two-dimensional simulation model of phosphorus uptake including crop growth and P-response. *Ecological Modelling* 210, 453–464.

Monsalve, R. I., Lopez-Otin, C., Villalba, M. and Rodríguez, R. (1991). A new distinct group of 2 S albumins from rapeseed. Amino acid sequence of two low molecular weight napins. *Federation of European Biochemical Society Letters* 295, 207–210.

Monteith, J. L. and Moss, C. J. (1977). Climate and the Efficiency of Crop Production in Britain [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 281, 277–294.

Morris, M. D. (1991). Factorial Sampling Techniques for Preliminary Computational Experiments. *Technimetrics* 33, 161–174.

Morrison, M. J., Mcvettyi, P. B. E. and Shaykewich, C. F. (1989). The determination and verification of a baseline temperature for the growth of westar summer rape. *Canadian. Journal of Plant Sciences* 69, 455–464.

Mossa, H. J., Wrigleyb, C. W., Macritchieb, F. and Randallc, P. J. (1981). Sulfur and Nitrogen Fertilizer Effects on Wheat. Influence on Grain Quality. *Australian Journal of Agricultural Research* 32, 213-226.

-N-

Namazkar, S., Stockmarr, A., Frenck, G., Egsgaard, H., Terkelsen, T., Mikkelsen, T., Ingvordsen, C. H., Jørgensen, R. B. (2016). Concurrent elevation of CO_2, O_3 and temperature severely affects oil quality and quantity in rapeseed. *Journal of Experimental Botany* 67, 4117–4125.

Nendel, C., Berg, M., Kersebaum, K. C., Mirschel, W., Specka, X., Wegehenkel, M., Wenkel, K. O. and Wieland, R. (2011). The MONICA model: Testing predictability for crop growth, soil moisture and nitrogen dynamics. *Ecological Modelling* 222 (9), 1614-1625.

Nesi, N., Delourme, R., Brégeon, M., Falentin, C. and Renard, M. (2008). Genetic and molecular approaches to improve nutritional value of *Brassica napus* L. seed. *Comptes Rendus - Biologies* 331, 763–771.

Nikiforova, V., Freitag, J., Kempa, S., Adamik, M., Hesse, H. and Hoefgen, R. (2003). Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: Interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant Journal* 33, 633–650.

Nikiforova, V. J. (2005). Systems Rebalancing of Metabolism in Response to Sulfur Deprivation, as Revealed by Metabolome Analysis of Arabidopsis Plants. *Plant Physiology* 138, 304–318.

Nikiforova, V. J., Gakière, B., Kempa, S., Adamik, M., Willmitzer, L., Hesse, H. and Hoefgen, R. (2004). Towards dissecting nutrient metabolism in plants: A systems biology case study on sulphur metabolism. in *Journal of Experimental Botany*, 1861–1870.

Nonogaki, H., Bassel, G. W. and Bewley, J. D. (2010). Germination-still a mystery. *Plant Science* 179, 574–581.

Nuttall, J. G., O'Leary, G. J., Panozzo, J. F., Walker, C. K., Barlow, K. M. and Fitzgerald, G. J. (2017). Models of grain quality in wheat—A review. *Field Crops Research* 202, 136–145.

-O-

Oenema, O. and Postma, R. (2003). "Managing Sulphur in Agroecosystems," in *Sulphur in Plants* (Dordrecht: Springer Netherlands), 45–70.

Orlovius K. (2003). Fertilizing for High Yield and Quality Oilseed Rape. *International Potash Institute Bulletin* 16, 125.

Ortolan, F. and Steel, C. J. (2017). Protein Characteristics that Affect the Quality of Vital Wheat Gluten to be Used in Baking: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16, 369–381.

Oscarson, P., Ingemarsson, B. and Larsson, C-M (1989). Growth and nitrate uptake properties of plants grown at different relative rates of nitrogen supply. II. Activity and affinity of the nitrate uptake system in Pisum and Lemna in relation to nitrogen availability and nitrogen demand. *Plant, Cell & Environment* 12, 787–794.

-P-

Papas, A., Ingalls, J. R. and Campbell, L. D. (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, 1129–39.

Parmar, S., Buchner, P. and Hawkesford, M. J. (2007). Leaf developmental stage affects sulfate depletion and specific sulfate transporter expression during sulfur deprivation in *Brassica napus* L. *Plant Biology* 9, 647–653.

Pasam, R. K., Sharma, R., Malosetti, M., van Eeuwijk, F. A., Haseneyer, G., Kilian, B. and Graner, A. (2012). Genome-wide association studies for agronomical traits in a world wide spring barley collection. *BMC Plant Biology* 12, 16.

Penning de Vries, F. W. T. and Rabbinge, R. (1995). Models in research and education, planning and practice. *Potato ecology and modelling of crops under conditions limiting growth* (Springer, Dordrecht), 1–18.

Petersen, C. T., Jorgensen, U., Svendsen, H., Hansen, S., Jensen, H. E. and Nielsen, N. E. (1995). Parameter assessment for simulation of biomass production and nitrogen uptake in winter rape. *European Journal of Agronomy* 4 (1), 77-89.

Pinkerton, A. (1998). Critical sulfur concentrations in oilseed rape (*Brassica napus*) in relation to nitrogen supply and to plant age. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 38, 511.

Poisson, E., Brunel-Muguet, S., Kauffmann, F., Trouverie, J., Avice, J.-C. and Mollier, A. (2018a). Sensitivity analyses for improving sulfur management strategies in winter oilseed rape. *PLOS ONE* 13, e0204376.

Poisson, E., Mollier, A., Trouverie, J., Avice, J.-C. and Brunel-Muguet, S. (2018b). SuMoToRI model simulations for optimizing sulphur fertilization in oilseed rape in the context of increased spring temperatures. *European Journal of Agronomy* 97, 28–37.

Prosser, I. M., Purves, J. V., Saker, L. R. and Clarkson, D. T. (2001). Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. *Journal of Experimental Botany* 52, 113–121.

Purkrtova, Z., Jolivet, P., Miquel, M. and Chardot, T. (2008). Structure and function of seed lipid body-associated proteins. *Comptes Rendus - Biologies* 331, 746–754.

-Q-

Qin, C., Yi, K. and Wu, P. (2011). Ammonium affects cell viability to inhibit root growth in Arabidopsis. *Journal of Zhejiang University* 12, 477–484.

-R-

R core team (2013). The R Project for Statistical Computing. *Http://www.R-Project.Org/*, 1–12.

Racca, P., Kakau, J., Kleinhenz, B. and Kuhn, C. (2015). Impact of climate change on the phenological development of winter wheat, sugar beet and winter oilseed rape in lower Saxony, Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection* 122, 16–27.

Raes, D., Steduto, P., Hsiao, T. C. and Fereres, E. (2009). AquaCropThe FAO Crop Model to Simulate Yield Response to Water: II. Main Algorithms and Software Description. *Agronomy Journal* 101 (3), 438.

Randall, P. J., Freney, J. R. and Spencer, K. (2003). Diagnosing sulfur deficiency in rice by grain analysis. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 65, 211–219.

Randall, P. J., Spencer, K. and Freney, J. R. (1981). Sulfur and nitrogen fertilizer effects on wheat. I. Concentrations of sulfur and nitrogen and the nitrogen to sulfur ratio in grain, in relation to the yield response. *Australian Journal of Agricultural Research* 32, 203–212.

Randall, P. J., Wang, Q., Hocking, P. J. and Pinkerton, A. (1997). "Critical values for sulfur in young plants of oilseed rape (*Brassica napus* L.) determined with reference to dry weight, leaf area and specific leaf weight," in *Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment* (Dordrecht: Springer Netherlands), 335–339.

Rathke, G. W., Behrens, T. and Diepenbrock, W. (2006). Integrated nitrogen management strategies to improve seed yield, oil content and nitrogen efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): A review. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 117, 80–108.

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

Rausch, T. and Wachter, A. (2005). Sulfur metabolism: A versatile platform for launching defence operations. *Trends in Plant Science* 10, 503–509.

Regitano Neto, A., Miguel, A. M. R. de O., Mourad, A. L., Henriques, E. A. and Alves, R. M. V. (2016). Environmental effect on sunflower oil quality. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 16, 197–204.

Reussi, N., Echeverŕia, H. and Rozas, H. S. (2011). Diagnosing sulfur deficiency in spring red wheat: Plant analysis. *Journal of Plant Nutrition* 34, 573–589.

Reuveny, Z., Dougall, D. K., Trinityt, P. M. and Jones, W. A. (1980). Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells. *Cell Biology* 77, 6670–6672.

Ribas, V., García-Ruiz, C. and Fernández-Checa, J. C. (2014). Glutathione and mitochondria. *Frontiers in Pharmacology* 5 JUL, 151.

Robertson, M. J. and Lilley, J. M. (2016). Simulation of growth, development and yield of canola (*Brassica napus*) in APSIM. *Crop and Pasture Science* 67.

Rohde, R. A. and Muller, R. A. (2015). Air pollution in China: Mapping of concentrations and sources. *PLOS ONE* 10.

Ross, D. J., Newton, P. C. D. and Tate, K. R. (2004). Elevated [CO_2] effects on herbage production and soil carbon and nitrogen pools and mineralization in a species-rich, grazed pasture on a seasonally dry sand. in *Plant and Soil*, 183–196.

Rossato, L., Lainé, P. and 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.

Rossing, W. A. H., Meynard, J. M. and van Ittersum, M. K. (1997). *Model-based explorations to support development of sustainable farming systems: case studies from france and the netherlands*. Elsevier Masson SAS.

Ruane, A. C., Teichmann, C., Arnell, N. W., Carter, T. R., Ebi, K. L., Frieler, K., Goodess, C. M., Hewitson, B., Horton, R., Kovats, R. S., Lotze, H. K., Mearns, L. O., Navarra, A., Ojima, D. S., Riahi, K., Rosenzweig, C., Themessl, M. and Vincent, K. (2016). The Vulnerability, Impacts, Adaptation and Climate Services Advisory Board (VIACS AB v1.0) contribution to CMIP6. *Geoscientific Model Development* 9, 3493–3515.

-S-

Saito, K. (2004). Sulfur Assimilatory Metabolism. The Long and Smelling Road. *Plant Physiology* 136, 2443–2450.

Salas Fernandez, M. G., Bao, Y., Tang, L. and Schnable, P. S. (2017). A High-Throughput, Field-Based Phenotyping Technology for Tall Biomass Crops. *Plant Physiology* 174, 2008–2022.

Salisbury, F. (1992). *Plant physiology* (4th ed.). Belmont: Wadsworth.

Saltelli, a., Tarantola, S. and Campolongo, F. (2000). Sensitivity analysis as an ingredient of modeling. *Statistical Science* 15, 377–395.

Saltelli, A. (2002). Sensitivity analysis for importance assessment. in *Risk Analysis* (Blackwell Publishing, Inc.), 579–590.

Salvagiotti, F., Castellarín, J. M., Miralles, D. J. and Pedrol, H. M. (2009). Sulfur fertilization improves nitrogen use efficiency in wheat by increasing nitrogen uptake. *Field Crops Research* 113, 170–177.

Salvagiotti, F. and Miralles, D. J. (2008). Radiation interception, biomass production and grain yield as affected by the interaction of nitrogen and sulfur fertilization in wheat. *European Journal of Agronomy* 28, 282–290.

Sapone, A., Affatato, A., Canistro, D., Pozzetti, L., Broccoli, M., Barillari, J., Iori, R. and Paolini, M. (2007). Cruciferous vegetables and lung cancer. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 635, 146–148.

Saseendran, S. A., Nielsen, D. C., Ma, L. and Ahuja, L. R. (2010). Adapting CROPGRO for simulating spring canola growth with both RZWQM2 and DSSAT 4.0. *Agronomy Journal* 102 (6), 1606-1621.

Scaife, A. and Burns, I. G. (1986). The sulphate-S/total S ratio in plants as an index of their sulphur status. *Plant and Soil* 91, 61–71.

Scherer, H. W. (2001). Sulphur in crop production - Invited paper. *European Journal of Agronomy* 14, 81–111.

Schjoerring, J. K., Bock, J. G. H., Gammelvind, L., Jensen, C. R. and Mogensen, V. O. (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.

Schneider, M. K., Lüscher, A., Richter, M., Aeschlimann, U., Hartwig, U. A., Blum, H., Frossard, E. and Nösberger, J. (2004). Ten years of free-air CO_2 enrichment altered the mobilization of N from soil in Lolium perenne L. swards. *Global Change Biology* 10, 1377–1388.

Schnug, E. and Evans, E. J. (1992). Monitoring of the Sulfur Supply of Agricultural Crops in Northern Europe. *Phyton-Annales Rei Botanicae* 32, 119–122.

Schnug, E. and Haneklaus, S. (1998). Diagnosis of sulphur nutrition. *Sulphur in agroecosystems* 2, 1–38.

Schnug, E., Haneklaus, S. and Murphy, D. (1993). Impact of sulphur fertilization on fertilizer nitrogen efficiency. *Sulphur in Agriculture* 17, 8–12.

Schwender, J., Shachar-Hill, Y. and Ohlrogge, J. B. (2006). Mitochondrial metabolism in developing embryos of *Brassica napus*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 34040–34047.

Semenov, M. A., Martre, P. and Jamieson, P. D. (2009). Quantifying effects of simple wheat traits on yield in water-limited environments using a modelling approach. *Agricultural and Forest Meteorology* 149, 1095–1104.

Seow, A., Vainio, H. and Yu, M. C. (2005). Effect of glutathione-S-transferase polymorphisms on the cancer preventive potential of isothiocyanates: An epidemiological perspective. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 592, 58–67.

Sheffield, J., Goteti, G. and Wood, E. F. (2006). Development of a 50-year high-resolution global dataset of meteorological forcings for land surface modeling. *Journal of Climate* 19, 3088–3111.

Shimada, T. L. and Hara-Nishimura, I. (2010). Oil-Body-Membrane Proteins and Their Physiological Functions in Plants. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 33, 360–363.

Sobol, I. M. (1990). Sensitivity analysis for nonlinear mathematical models. *Matematicheskoe Modelirovanie* 2, 112–118.

Solomon, M. B., Lynch, G. P., Paroczay, E. and 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.

Sorin, E. (2016). Identification d'indicateurs de la nutrition soufrée chez le colza (*Brassica napus* L.) : mécanismes physiologiques sous-jacents et validation en conditions de plein champ. Thèse de L'Université de Caen Normandie, pp. 129.

Sorin, E., Etienne, P., Maillard, A., Zamarreño, A. M., Garcia-Mina, J. M., Arkoun, M., Jamois, F., Cruz, F., Yvin, J-C. and Ourry, A. (2015). Effect of sulphur deprivation on osmotic potential components and nitrogen metabolism in oilseed rape leaves: Identifcation of a new early indicator. *Journal of Experimental Botany* 66, 6175–6189.

Spencer, K. and Freney, J. R. (1980). Assessing the Sulfur Status of Field-Grown Wheat by Plant Analysis. *Agronomy Journal* 72, 4–7.

Spitters, C. J. T., Van Keulen, H. and Van Kraalingen, D. W. G. (1989). A simple and universal crop growth simulator: SUCROS87. *Simulation and systems management in crop protection / , R. Rabbinge, S.A. Ward, H.H. van Laar.*, 147–181.

Spitters, C. J. T. (1990). Crop growth models: their usefulness and limitations. *Acta Horticulturae 267: VI Symposium on the Timing of Field Production of Vegetables* (267), 349-368.

Steduto, P., Hsiao, T. C., Raes, D. and Fereres, E. (2009). Aquacrop-the FAO crop model to simulate yield response to water: I. concepts and underlying principles. *Agronomy Journal* 101 (3), 426-437.

Stella, T., Frasso, N., Negrini, G., Bregaglio, S., Cappelli, G., Acutis, M. and Confalonieri, R. (2014). Model simplification and development *via* reuse, sensitivity analysis and composition: A case study in crop modelling. *Environmental Modelling and Software* 59, 44-58.

Sundström, J. F., Albihn, A., Boqvist, S., Ljungvall, K., Marstorp, H., Martiin, C., Nyberg, K., Vågsholm, I., Yuen, J. and Magnusson, U. (2014). Future threats to agricultural food production posed by environmental degradation, climate change, and animal and plant diseases - a risk analysis in three economic and climate settings. *Food Security* 6, 201–215.

Swaney, D. P., Jones, J. W., Boggess, W. G., Wilkerson, G. G. and Mishoe, J. W. (1983). Real-Time Irrigation Decision Analysis Using Simulation. *Transactions of the ASAE* 26, 0562–0568.

-T-

Takahashi, H., Buchner, P., Yoshimoto, N., Hawkesford, M. J. and 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. and 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, F. W., Blake-Kalff, M., Hawkesford, M. J. and Saito, K. (2000). The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 23, 171–182.

Tausz, M. (2001). The Role of Glutathione in Plant Response and Adaptation to Natural Stress. *Significance of Glutathione to Plant Adaptation to the Environment* (Springer, Dordrecht), 101–122.

Taylor, K. E., Stouffer, R. J. and Meehl, G. A. (2012). An overview of CMIP5 and the experiment design. *Bulletin of the American Meteorological Society* 93, 485–498.

Tejada-Jimenez, M., Llamas, A., Sanz-Luque, E., Galvan, A. and Fernandez, E. (2007). A high-affinity molybdate transporter in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 20126–20130.

Thompson, J. F. and Gering, R. K. (1966). Biosynthesis of S-Methylcysteine in Radish Leaves1. *Plant Physiology* 41, 1301.

Timms, M. F., Bottomley, R. C., Ellis, J. R. S. and Schofield, J. D. (1981). The baking quality and protein characteristics of a winter wheat grown at different levels of nitrogen fertilisation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32, 684–698.

Tomatsu, H., Takano, J., Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Shibagaki, N. and Fujiwara, T. (2007). An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 18807–18812.

Tubiello, F. N., Soussana, J.-F. and Howden, S. M. (2007). Crop and pasture response to climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 19686–19690.

-V-

Van Diepen, C. A., Wolf, J., van Keulen, H. and Rappoldt, C. (1989). WOFOST: a simulation model of crop production. *Soil Use and Management* 5, 16–24.

Van Vuuren, D. P., Edmonds, J., Kainuma, M., Riahi, K., Thomson, A., Hibbard, K., Hurtt, G. C., Kram, T., Krey, V., Lamarque, J. F., Masui, T., Meinshausen, M., Nakicenovic, N., Smith, S. J. and Rose, S K. (2011). The representative concentration pathways: An overview. *Climatic Change* 109, 5–31.

Varlet-Grancher, C., Bonhomme, R., Chartier, M. and Artis, P. (1982). Efficience de la conversion de l'energie solaire par un couvert vegetal. *Acta Oecologica. Oecologia Plantarum* 3, 3–26.

Von Der Haar, D., Müller, K., Bader-Mittermaier, S. and Eisner, P. (2014). Rapeseed proteins – Production methods and possible application ranges. *Oilseeds & Fats Crops and Lipids* 21, 1–8.

-W-

Wallach, D., Makowski, D., Jones, J. W. and Brun, F. (2013). Working with Dynamic Crop Models. Methods, Tools and Examples for Agriculture and Environment. *Academic Press, second edition, editor Elsevier,* pp. 487.

Wanasundara, J. P. D., McIntosh, T. C., Perera, S. P., Withana-Gamage, T. S. and Mitra, P. (2016). Canola/rapeseed protein-functionality and nutrition. *OCL - Oilseeds & fats Crops and Lipids* 23, 1–15.

Wanasundara, J. P. D., Tan, S., Alashi, A. M., Pudel, F. and Blanchard, C. (2017). Proteins From Canola/Rapeseed: Current Status. *Sustainable Protein Sources*, 285–304.

Wang, E., Martre, P., Zhao, Z., Ewert, F., Maiorano, A., Rötter, R. P., Kimball, Bruce A., Ottman, M. J., Wall, G. W.? White, J. W., Reynolds, M. P., Alderman, P. D., Aggarwal, P. K., Anothai, J., Basso, B., Biernath, C., Cammarano, D., Challinor, A. J., De Sanctis, G., Doltra, J., Fereres, E., Garcia-Vila, M., Gayler, S., Hoogenboom, G., Hunt, L. A., Izaurralde, R. C., Jabloun, M., Jones, C. D., Kersebaum, K. C., Koehler, A-K., Liu, L., Müller, C., Naresh Kumar, S., Nendel, C., O'Leary, G., Olesen, J. E., Palosuo, T., Priesack, E/, Eyshi Rezaei, E., Ripoche, D., Ruane, A. C., Semenov, M. A., Shcherbak, I., Stöckle, C., Stratonovitch, P., Streck, T., Supit, I., Tao, F., Thorburn, P., Waha, K., Wallach, D., Wang, Z., Wolf, J., Zhu, Y. and Asseng, S. (2017a). The uncertainty of crop yield projections is reduced by improved temperature response functions. *Nature Plants* 3, 17102.

Wang, L., Hampe, A., Mühling, K. H. and Schulte auf'm Erley, G. (2017b). Sulfur uptake and remobilization are differentially affected by N deficiency in winter oilseed rape cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 40, 524–531.

Wild, M., Folini, D., Henschel, F., Fischer, N. and Müller, B. (2015). Projections of long-term changes in solar radiation based on CMIP5 climate models and their influence on energy yields of photovoltaic systems. *Solar Energy* 116, 12–24.

Williams, J. R., Jones, C. A., Kiniry, J. R. and Spanel, D. A. (1989). The EPIC Crop Growth Model. *Transactions of the ASAE* 32, 0497–0511.

Wirtz, M. and 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. and Halkier, B. A. (2002). Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends in Plant Science* 7, 263–270.

Wolf, J., De Wit, C. T. and Van Keulen, H. (1989). Modeling long-term crop response to fertilizer and soil nitrogen - I. Model description and application. *Plant and Soil* 120, 11–22.

-Y-

Yan, H. P., Meng, Z. K., De Reffye, P. and Dingkuhn, M. (2004). A dynamic, architectural plant model simulating resource-dependent growth. *Annals of Botany* 93 (5), 591-602.

Yoshimoto, N., Inoue, E., Saito, K., Yamaya, T. and 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., Saito, K. and Takahashi, H. (2007). Posttranscriptional Regulation of High-Affinity Sulfate Transporters in Arabidopsis by Sulfur Nutrition. *Plant Physiology* 145, 378–388.

Yu, B., Gruber, M., Khachatourians, G. G., Hegedus, D. D. and Hannoufa, A. (2010). Gene expression profiling of developing *Brassica napus* seed in relation to changes in major storage compounds. *Plant Science* 178, 381–389.

-Z-

Zeleke, K. T., Luckett, D. and Cowley, R. (2011). Calibration and testing of the FAO AquaCrop model for canola. *Agronomy Journal* 103, 1610–1618.

Zeleke, K. T., Luckett, D. J. and Cowley, R. B. (2014). Response of canola (*Brassica napus* L.) and Mustard (*B. juncea* L.) to different watering regimes. *Experimental Agriculture* 50, 573–590.

Zhao, F. J., Bilsborrow, P. E., Evans, E. J. and McGrath, S. P. (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., Hawkesford, M. J. and McGrath, S. P. (1999). Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. *Journal of Cereal Science* 30, 1–17.

Zuber, H., Davidian, J.-C., Aubert, G., Aime, D., Belghazi, M., Lugan, R., Heintz, D., Wirtz, M., Hell, R., Thompson, R. and Gallardo, K. (2010). 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.

Zulfi-Qar, M., Ahmad, U., Mustafa, M. B., Hamed, C. B., Aslam, A. S. and Anjum, M. S. (2018). Quantification of Radiation Use Efficiency and Yield of Wheat as Influenced by Different Levels of Nitrogen and Water Stress under Semi-Arid Conditions of Faisalabad. *Agricultural Sciences* 9, 873–887.

Sites internet consultés

- Atlas des plantes médicinales, http://caliban.mpiz- koeln.mpg.de/koehler/RAPS.jpg
- CITEPA, https://www.citepa.org/fr/
- FAOSTAT, http://www.fao.org/
- GNIS, https://www.gnis.fr/
- PROLEA, http://www.prolea.com
- SAS PIVERT, https://www.institut-pivert.com/programme-genesys/
- Terres Inovia, http://www.terresinovia.fr/colza/
- Terres OléoPro, https://www.terresoleopro.com
- Terres Univia, http://www.terresunivia.fr
- www.futura-sciences.com, https://cmc.ipsl.fr/

POISSON Émilie
Thèse de l'Université de Caen Normandie au sein de l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (Spécialité : Sciences agronomiques, Biotechnologies agro-alimentaires). UMR INRA-UCN 950 EVA (Écophysiologie Végétale Agronomique et nutrition N, C, S).

Titre : Optimisation de la fertilisation soufrée pour améliorer le rendement et la qualité grainière du colza (*Brassica napus* L.) : impacts des interactions Soufre/Azote et du changement climatique, identifications d'idéotypes.

Résumé : Le colza est une oléoprotéagineuse exigeante en soufre (S) mais caractérisée par une faible efficience d'usage du S (EUS). La baisse des retombées atmosphériques soufrées, l'existence de fortes interactions entre les métabolismes soufré et azoté et l'augmentation prédite des températures terrestres peuvent conduire à une altération des rendements et de la qualité des graines de colza. Dans ce contexte, en s'appuyant sur des approches *in planta* (conditions contrôlées et de plein champ) et *in silico* (expérimentations numériques *via* le modèle écophysiologique SuMoToRI "Sulphur Model Towards Rapeseed Improvement"), les principaux objectifs de cette thèse étaient d'étudier l'impact (i) de différentes stratégies de fertilisation S et N, (ii) du changement climatique et (iii) de la variabilité des paramètres « plante » du modèle sur la croissance ainsi que sur les composantes du rendement et la qualité des graines de colza.
Cette étude a permis de confirmer les effets synergiques des apports de S et de N ainsi que leurs effets antagonistes lors d'apport excessif d'un des deux éléments sur l'EUS et l'EUN, soulignant l'importance d'équilibrer les apports S/N. Décaler l'apport en S a permis d'améliorer la qualité protéique des graines en augmentant l'abondance relative en napines (protéines de réserve des graines riches en cystéine). Deux indices de la qualité protéique des graines ont pu être proposés : (i) la teneur en S des graines, fortement corrélée avec l'abondance relative en napines et (ii) le ratio napine:cruciférine-30kDa (cruciférines : protéines de réserve pauvres en S), permettant d'apprécier l'équilibre des apports S/N. Les simulations réalisées avec le modèle ont montré que des ajustements de la fertilisation S devront s'opérer dans un contexte d'augmentation des températures et/ou de diminution du rayonnement incident conduisant à une baisse de la biomasse et à une augmentation du S stocké dans les feuilles. Ces résultats requestionnent les schémas conventionnels de fertilisation et l'utilisation d'idéotypes variétaux et culturaux adaptés aux schémas de fertilisation S et N ainsi qu'au dérèglement climatique.

Mot clés : Physiologie végétale, Colza, fertilisation soufrée, interaction soufre azote, changement climatique, idéotypes culturaux et variétaux, modélisation, modèle agro-écophysiologique, SuMoToRI.

Title : Optimization of Sulfur fertilization for improving seed yield and quality in oilseed rape (*Brassica napus* L.): impacts of Sulfur/Nitrogen interactions and climate change, identification of ideotypes.

Abstract : Oilseed rape is an oleoproteaginous crop with high sulfur (S) demanding and characterized by a low S use efficiency (SUE). The decline in atmospheric S deposition, the existence of strong interactions between S and nitrogen (N) metabolism and the predicted increase in terrestrial temperatures can lead to an alteration in seeds yields and quality. In this context, using *in planta* (controlled conditions and fields experiments) and *in silico* (numerical experiments through an agro-ecophysiological model SuMoToRI, "Sulfur Model Towards Rapeseed Improvement") approaches, the main objectives of this thesis were to study the impact of (i) different S and N fertilization strategies, (ii) climate change and (iii) the variability of the model's "plant" parameters on growth as well as the yield components and the seeds quality of oilseed rape.
This study confirmed the synergistic effects of S and N inputs and their antagonistic effects when of one of the two elements was in excessive rate on EUS and EUN, highlighting the importance of balancing S/N inputs. Delaying S input has improved seed protein quality by increasing the relative abundance of napins (cysteine-rich seed storage proteins). Two seed protein quality indices could be proposed (i) seeds S content, strongly correlated with relative napine abundance and (ii) the ratio napins:cruciferins-30kDa (cruciferins : S-poor seed storage proteins). S), making it possible to assess the S/N balance inputs. The simulations carried-out with the model showed that the adjustment of S fertilization must be performed in a context of increasing temperature and/or a reduction of incident radiation which lead to a decrease of biomass and an increase of S stored in leaves. Overall, these results questioned conventional fertilization strategies and the use of varietal and crop ideotypes adapted to S and N fertilization strategies as well as to climate change.

Key words: Plant Physiology, Oilseed rape, sulfur fertilization, sulfur nitrogen interaction, climate change, crop and variety ideotypes, modeling, agro-ecophysiological model, SuMoToRI.