



UNIVERSITÉ de CAEN/BASSE-NORMANDIE

U.F.R : Institut de biologie fondamentale et appliquée

École Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé et Environnement

THÈSE

Présentée par

Mme Maha Mohamed-Shater ABDALLAH

Et soutenue

Le 8 Juillet 2010



En vue de l'obtention du

DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ de CAEN

Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations

Arrêté du 07 août 2006

Titre : Etudes de l'allocation et de la mobilisation du soufre (S) chez le colza d'hiver (*Brassica napus L.*) en situation d'oligotrophisation en S.

MEMBRES du JURY

Mr. A. BOUCHEREAU, Professeur, Université de Rennes	(Rapporteur)
Mr. C. SALON, Directeur de recherche, INRA Dijon	(Rapporteur)
Mr. B. NEY, Professeur, AgroParisTech	(Examineur)
Mr. F. LE DILY, Professeur, Université de Caen	(Examineur)
Mr. F. MEURIOT, Maître de Conférences, Université de Caen	(Examineur)
Mr. A. OURRY, Professeur, Université de Caen	(Directeur de Thèse)

REMERCIEMENTS

Avant de présenter ce travail, je voudrais remercier tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à sa réalisation. Cette thèse a bénéficié d'une bourse d'étude accordée par le Ministère de l'Éducation supérieure, et de la Recherche Scientifique d'Égypte.

Tout d'abord, je tiens à remercier Alain Ourry pour m'avoir accueillie au sein de l'UMR INRA-UCBN 950 EVA nutrition NCS pour réaliser ma thèse. Je le remercie de la confiance qu'il m'a accordée. Je témoigne également ma reconnaissance à l'actuel directeur du laboratoire, Frédéric Le Dily, ainsi que pour ses conseils et sa participation au sein du jury.

Je remercie le jury de thèse d'avoir accepté d'examiner ces travaux. Je suis très honorée que Christophe Salon et Alain Bouchereau aient accepté d'être les rapporteurs. Je remercie également Bertrand Ney et Frédéric Le Dily, de l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail en acceptant d'en être les examinateurs.

Je tiens à remercier tout particulièrement Alain Ourry et Frédéric Meuriot qui m'ont encadrée au cours de ce travail. Merci à tous les deux de m'avoir soutenue au cours de ces quatre années. Vous avez été disponibles aux moments où j'en avais besoin et ce, malgré vos emplois du temps chargés. Ce projet de thèse n'aurait pu aboutir sans votre présence. Je souhaite adresser quelques lignes de remerciements à chacun de vous.

Alain, je te remercie pour ton aide, tes idées toujours pertinentes, ta rigueur scientifique attentive et tes conseils rédactionnels rapides et précieux. Ton implication de tout instant et ton exigence m'ont permis de me surpasser professionnellement.

Fredo, je te remercie pour ta bonne humeur continue, pour ta participation joyeuse aux récoltes, pour avoir toujours été optimiste et encourageant par rapport à mon travail (c'est toi qui m'a montré qu'il y avait toujours une lumière au bout du tunnel!), pour m'avoir accordé ta confiance, pour avoir répondu à tant d'interrogations sur le colza et le soufre, et pour avoir passé beaucoup de temps et dépensé tant d'énergie lors de mon arrivée en France et après. Tu m'as apporté tes connaissances et tes critiques toujours constructives en me rappelant sans cesse à la nécessaire rigueur scientifique. Encore merci pour tout!

Je remercie tous les membres du laboratoire pour leur aide, leur disponibilité et surtout leur bonne humeur. Mes plus sincères remerciements vont à Marie-Pascal, Annette, Servane, Emmanuelle, Nathalie, Philippe L, Jean-

Bernard, Philippe E, Jacques, Sylvain et Erwan pour les discussions, les conversations fructueuses que nous avons eues ensemble lors des repas de midi..... Merci à vous tous car ce fut très agréable de travailler dans une telle atmosphère. Ces quatre années de travail m'ont fait découvrir une remarquable équipe scientifique et aussi des tricoteuses et tricoteurs talentueux et insoupçonnés. Un grand merci pour la contribution de chacune et chacun pour la couverture offerte au petit dernier qui a vu le jour à la fin de ma thèse...j'ai l'impression de repartir en Egypte avec un bout de chacun d'entre vous ! Parmi vous, je ne me suis jamais sentie loin de mon pays et de ma famille.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance à Jean-Bernard pour son aide lors des réactions d'oxydation du ^{34}S et à Philippe E pour son aide en biologie moléculaire.

Je remercie Jean-Christophe pour les réunions COSMOS qui m'ont beaucoup apporté. Je le remercie également pour son invitation au congrès Soufre au Pologne. Je garde de très bons souvenirs des échanges scientifiques, et les longues ballades!

Je souhaite remercier très chaleureusement Marie Paule et Marie-Laure. Sans vous, mon séjour en France avec ma famille aurait été plus difficile : vous m'avez aidée de nombreuses fois, en m'apportant un soutien matériel et moral au travail comme dans ma vie privée. Un grand merci pour les moments très agréables que ma famille et moi avons passé grâce à vous. Je vous en serai éternellement reconnaissante.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous ceux qui ont participé à mes différentes récoltes : merci à Frédo, Jean-Christophe, Philippe E, Josette, Marie-Paule, Anne Françoise, Michelle, Josiane, Sandrine, Raphaël et Julie L. pour votre bonne humeur et votre aide. Merci également à Dominique, Xavier et Patrick pour leurs supports techniques et informatique.

Ma reconnaissance s'adresse également au staff technique: à Sandrine pour son aide apportée en biologie moléculaire, à Anne-Françoise et à Raphaël pour leurs aides et conseils avisés sur la culture de colza, à Marie-Paule et Raphaël pour DIONEX et l'IRMS et à Josette pour la partie micropesées, à Michelle, Josiane, Magali, Nathalie et Bénédicte pour toutes ces choses faites au sein du laboratoire qui vous facilitent la vie.

Je tiens à remercier également Julie G. et Anne-So pour leur aide et leur gentillesse. Le travail avec vous n'a été que du bonheur !

Je souhaite exprimer ma gratitude à Sophie B. pour son aide volontaire à la lecture de ma thèse et m'avoir consacré du temps.

Je n'oublie pas l'ensemble des doctorants avec lesquels j'ai partagé cette expérience commune, Bertrand, Julie, Fabien, Jérémy, Tiphaine, Marie D, Sébastien, Lucie, Virginie, Alexandre, Romain, Mustapha, Laëtitia, Marouf et Anthonin. Je souhaite bon courage aux doctorants encore présents au laboratoire.

Je remercie énormément mes parents et mes sœurs pour leur soutien «téléphonique» depuis l'Égypte au cours de la thèse, mais également pour m'avoir toujours encouragée à poursuivre des études qui me plaisaient.

Mes plus profondes pensées s'adressent maintenant à ma grande famille. Ce chemin n'aurait pu être aussi formidable sans le soutien de mon cher mari. Merci mon amour pour ton soutien, tes encouragements, tes sacrifices, ta patience, ton écoute et tes conseils pleins de sagesse.

Merci à mes enfants, Mohamed, Amr, Ahmed et mon bébé Aboubakr, pour m'avoir supportée durant ses quatre longues années, vous avez été très courageux car être loin de notre famille n'a pas été chose facile pour vous, et je ne vous ai jamais caché ma peine à moi aussi chaque fois que vous me posiez la question « pour qui sommes-nous là ??? ». J'espère que vous trouverez la réponse dans ce manuscrit ? J'espère aussi vous avoir montré l'exemple et vous avoir prouvé que l'on n'est jamais trop grand pour apprendre.

A tous, j'exprime toute ma gratitude

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ADN: Acide désoxyribonucléique
ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire
ANOVA: Analyse de variance
APR: 5'–adenylphosphosulphate réductase
APS: 5' –adenylphosphosulphate
ARN: Acide RiboNucleique
ARNm: Acide RiboNucleique messenger
ATPS: ATP sulfurylase

B

BSA: Sérum albumine bovine

C

C: Carbone
CO₂: Dioxyde de carbone
C₂H₂: Acétylène
CaSO₄: Pyrite ou sulfate de Calcium
CH₃SCH₃: Dimethylsulfure

D

DM: Dry Matter
DMS: Diméthylsulfure
dNTP: Désoxyribonucléotide triphosphate
DW: Dry weight

E

EUA: Efficience d'Utilisation de l'Azote
EUS: Efficience d'Utilisation de Soufre

G

GS: Glutamine Synthase
GSH : Glutathion

H

H: Hydrogène
H₂O: Eau
H₂S: Sulfure d'hydrogène
ha: Hectare
HS: High Sulphate
HS_i: High Sulphate initial
HSO₃: Bisulfite
HNO₃: Acid Nitric

I

INRA: Institut National de la Recherche Agronomique

IRN: Indice de Récolte en azote

IRS: Indice de Récolte en Soufre

K

K⁺: Ion Potassium

L

LCD: L-Cystéine Désulphydrase
LiCl: Chlorure de Lithium
LS: Low Sulphate
LS_i: Low Sulphate initial

M

MF: Matière Fraîche
MS: Matière Sèche

N

N: Azote
N₂: Diazote
NR: Nitrate Réductase
NHI: Nitrogen Harvest Index

O

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

P

P: Phosphore

PAPS: 3'-Phosphoadénosine-5'-Phospho
Sulfate

ppm: Partie par million

Q

q : Quintal

R

RGR: Relative Growth Rate ou taux de
croissance relatif

RT: Reverse Transcription

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

S

S: Soufre

-S: Absence de fertilisation soufrée

S²⁻: Sulfure (sulfide)

S₂O₃²⁻: Thiosulfate

SAM: S-adenosyl methionine

SAT: Sérine acetyl transférase

SDC: Sulfur-containing Defense
Compounds

SHI: Sulfur Harvest Index

SIR: Sulfite réductase ferrédoxine-
dépendante

SNI: Sulfur Nutrition Index

SO₂: Dioxyde de soufre

SO₃: Trioxyde de soufre

SO₃²⁻: Sulfite

SO₄²⁻ : Sulfate

SPAD: Soil plant analysis development

SSA: Sunflower seed albumin

SUtE: Sulfur Utilization Efficiency

SULTR: Sulfate Transporter

SAG: Senescence Associated Genes

SDG's: Senescence Down-regulated
Genes

U

UCBN : Université de Caen Basse
Normandie

UMR: Unité Mixte de Recherche

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
I. Contexte.....	1
II. Objectifs et plan de la thèse :	2
Analyse bibliographique.....	5
A Le colza.....	5
A.1 Généralités.....	5
A.2 Aspects agronomiques	5
A.3 Les débouchés alimentaires et industriels du colza	6
A.4 Cycle ontogénétique du colza d'hiver.....	6
A.5 La fertilisation azotée et soufrée du colza	8
B. Acquisition et métabolisme du soufre chez les végétaux supérieurs.....	10
B.1 L'importance du soufre dans la biomasse	10
B.2 L'état et la dynamique du soufre dans le sol	10
B.3 Mécanismes d'absorption et de transport du soufre.....	11
B.4 Assimilation du sulfate.....	13
C. Interaction entre la nutrition azotée et soufrée	15
D. Etat des lieux sur l'occurrence de carences en S	16
D.1. Les origines des carences en S	16
D.2. Impacts des carences en soufre à l'échelle des cultures	17
D.3 Effets physiologiques d'une carence en soufre.....	18
E. Stratégies d'amélioration de l'Efficiencia d'Utilisation du Soufre.....	23
E.1. par l'optimisation du prélèvement du soufre minéral.....	23
E.2. Par l'optimisation de l'utilisation des réserves soufrées endogènes	24
F. Objectifs de recherche.....	28
<u>Chapitre I: Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetative growth of Brassica napus L.</u>	29
Introduction.....	32
Materials and Methods.....	34
Hydroponic Experiment	34
Application of S treatments and tissue sampling.....	35
Preparation of ³⁴ S:	35
Determination of total N and S content.....	36
Determination of S mobilization and partitioning of S derived from uptake or mobilization within tissues.....	37
Determination of SO ₄ ²⁻ content	37
RNA extraction	38
RT and Q-PCR analysis of BnSultr genes	38
Statistical analysis	39
Results	40
Plant biomass analysis:.....	40
N, S and cumulated ¹⁵ N and ³⁴ S contents:	40
S partitioning and remobilization:	40
S and cumulated ³⁴ S dynamics of leaf-blade (LB) and roots:.....	41
Remobilization of endogenous S content of leaf blade and roots:.....	42
N / S ratio, N organic / S organic ratio and sulphate contents:	42
Relative expression of Sulphate transporters	43
Discussion.....	43
<u>Chapitre II: Fluctuations of S availability affect growth, S reserves, ¹⁵N and ³⁴S uptake in Brassica napus L.</u>	47
Introduction.....	50
Materials and Methods.....	52

Application of S treatments and tissue sampling.....	52
Preparation of ³⁴ S:	53
Determination of total N and S content.....	53
Determination of S and N partitioning and mobilization	54
Determination of NO ₃ ⁻ and SO ₄ ²⁻ contents.....	54
RNA extraction.....	55
Relative expression of BnNrt.1;1, BnNrt.2;1 and BnSultr.1 and BnSultr.4 genes using Q-PCR	55
Results	56
Whole Plant analysis:.....	56
Plant biomass analysis:.....	56
Whole plant N and ¹⁵ N uptake:.....	57
Whole plant S and ³⁴ S uptake:.....	57
Whole plant N and S partitioning and remobilization.....	58
Roots analysis	59
Total N, total S and cumulated ¹⁵ N and ³⁴ S contents:.....	59
Nitrate, sulphate and amino acids content:.....	59
Relative expression of nitrate and sulphate transporters	60
Discussion.....	61
S limitation modifies plant initial S status :.....	62
A low initial S status increased N and S uptake under ample supply.....	62
Low S availability can be compensated for by high initial S status	63
Low initial S status affects N metabolism when plants are S limited	64
Chapitre III: Do initial S reserves and mineral S availability alter leaf S-N mobilization and leaf senescence in oilseed rape?	66
Introduction.....	69
Materials and Methods	71
Application of S treatments and tissue sampling.....	71
Preparation of ³⁴ S and determination of N and S contents and remobilization :	72
Determination of sulphate, total amino acids and soluble proteins contents.....	73
RNA extraction, reverse transcription (RT) and semi-quantitative PCR analysis	74
Quantitative-PCR (Q-PCR) analysis.....	74
Results	75
Whole plant and leaf biomass:	75
Leaf blade N and cumulated ¹⁵ N contents:	76
Leaf blade soluble protein and amino acids contents:	77
Leaf blade S and cumulated ³⁴ S contents:	77
Leaf blade sulphate transporters gene expression and sulphate-S content:	78
Leaf blade ¹⁴ N and ³² S remobilization.....	78
BnSAG12/BnCAB molecular indicator of leaf senescence progression.....	79
Discussion and conclusions.....	79
I) S uptake or S remobilization can compensate for short -term S limitation	80
II) Short or long- term S limitation delays senescence and proteolysis	81
Conclusions et discussion générale	84
I) Quel que soit le niveau de limitation en S, le colza met en place et de façon systématique un certain nombre de mécanismes physiologiques et moléculaires :	86
II) Dans le cas de limitation en S appliquées tardivement.....	87
III) Une limitation en S appliquée précocement ou de longue durée (traitements LSi et LSi-LS des chapitres II et III) affecte négativement la croissance de la plante entière, en particulier celles des racines et des feuilles:.....	89
Perspectives.....	93
References bibliographiques.....	96
Table des illustrations.....	119

INTRODUCTION

Introduction générale

I. Contexte

Le **colza** (*Brassica napus* L.) est une brassicacée cultivée dont l'importance agronomique s'accroît notamment en raison de l'extension des surfaces de cultures tant à l'échelle mondiale qu'Européenne. De façon similaire, au niveau régional ou national, les surfaces consacrées à cette culture ne cessent de croître et devraient atteindre 1.7 millions d'hectares en 2010 (source : CETIOM). L'intérêt de cet oléagineux riche en lipides et en protéines réside dans ses nombreux débouchés, que ce soit dans le **secteur alimentaire** (production d'huile ou de tourteaux destinés à l'alimentation bovine) **ou industriel**. L'utilisation du colza comme ressource énergétique ou comme matière première pour l'industrie permet en effet de substituer partiellement une ressource fossile (produits pétroliers) par une ressource agricole renouvelable. L'huile de colza peut être utilisée pour la production de biocarburants, de biolubrifiants, de tensio-actifs, de solvants ou encore d'intermédiaires chimiques. De telles utilisations industrielles ont suscité le développement de variétés plus appropriées comme le colza à forte teneur en acide oléique ou stéarique. **En raison de sa proximité génétique avec l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* L. largement étudiée et utilisée en génomique, elle constitue par ailleurs une espèce modèle idéale pour étudier les mécanismes de remplissage en macroéléments des graines.**

Sa culture nécessite d'importantes quantités d'intrants minéraux, en particulier en azote, phosphore, potassium et soufre. Considérée et utilisée potentiellement comme une culture « piège à nitrate », et comparativement à d'autres cultures, cette espèce présente des capacités élevées d'absorption du nitrate (Lainé *et al.*, 1993 ; Malagoli *et al.*, 2004) tout en étant caractérisée par une faible Efficience d'Utilisation de l'Azote (EUA ; Schjoerring *et al.*, 1995). Cette dernière est essentiellement liée à un recyclage sous-optimal de l'azote au cours de la sénescence des feuilles (Malagoli *et al.*, 2005a), qui constituent les organes sources majeurs pour le remplissage en N des tissus reproducteurs. Ces feuilles sénescentes peuvent alors chuter avec des teneurs en N élevées (~2% de la matière sèche), ce qui peut alors affecter le rendement grainier en fin de cycle (Noquet *et al.*, 2004 ; Malagoli *et al.*, 2005a). A l'instar du N, le soufre (S), présent principalement sous forme de sulfate (SO_4^{2-}) dans le sol et de dioxyde de soufre (SO_2) dans l'atmosphère, est un élément essentiel à la croissance du colza. Comme pour la majorité des Brassicacées, les besoins en S du colza sont particulièrement élevés. Après

Quantité de SO₂ (Kt)

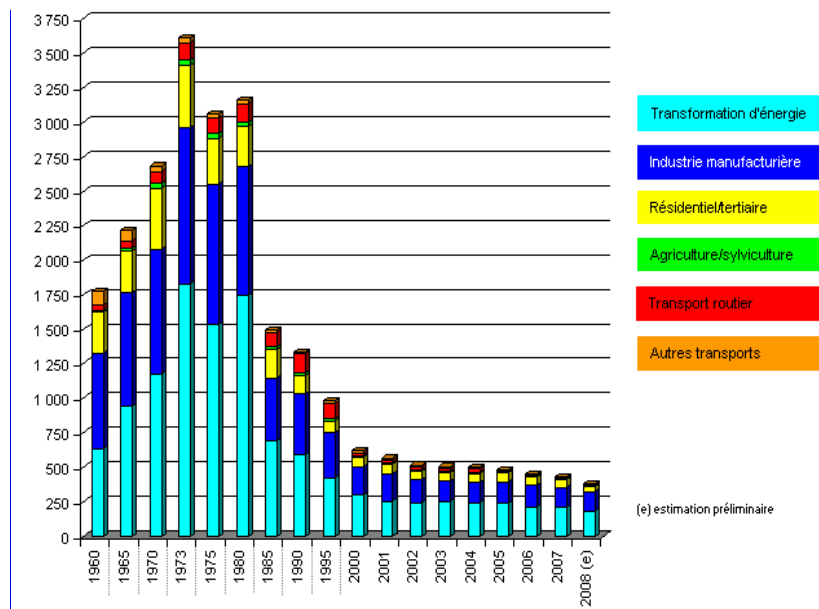


Figure 1. Evolution des quantités de dioxyde de soufre (SO₂) dans l'air (en kt) et origines des émissions de SO₂ de 1960 à 2007 en France métropolitaine. Entre 1973 et 2004, les émissions de SO₂ ont chuté de plus de 86 %. (d'après le Citepa, Mai 2009).

une étude bibliographique sur la réponse de cette culture à la fertilisation soufrée, Zhao *et al.*, (2002) ont conclu que le S est maintenant l'un des principaux éléments nutritifs qui limite le rendement dans de nombreuses régions européennes. **Le colza est donc une plante exigeante en soufre et de nombreuses études suggèrent que les parcelles agricoles sont globalement confrontées à une oligotrophisation en S depuis près de deux décennies.** Cette oligotrophisation est une conséquence indirecte de la mise en place de conventions strictes en matière d'environnement visant à réduire les émissions de S d'origine anthropique (adoptées lors du « Sommet de la terre » de Rio en 1992, et lors du « Sommet mondial sur le Développement Durable » de Johannesburg en 2002). En France, les émissions de S dans l'atmosphère ont ainsi chuté de 86% entre 1973 et 2004 (Figure 1). Ces diminutions de rejets soufrés, également perçues au niveau Européen, limitent donc la déposition de S vers les sols et ont contribué à leur appauvrissement en S (Scherer, 2001) notamment en l'absence d'une fertilisation S raisonnée et suffisante.

Une telle oligotrophisation en S pourrait alors contribuer à réduire le rendement des cultures de colza. Chez les Brassicacées, la carence en S peut en effet modifier la qualité grainière *via* l'altération de la composition protéique et lipidique selon Ahmad et Abdin (2000a). Enfin, certains travaux ont montré que cette réponse est différente selon le statut en N minéral de la culture, confirmant ainsi les interactions très fortes entre les métabolismes N et S. Par ailleurs, un nombre assez important de travaux réalisés au sein de l'UMR INRA – UBCN EVA a montré que le contenu en azote des graines du colza dépend assez largement du potentiel de remobilisation de l'azote foliaire (Rossato *et al.*, 2002; Malagoli *et al.*, 2005b). De nombreux auteurs ont aussi mis en évidence l'influence du niveau de disponibilité en N du sol sur le prélèvement, la distribution et l'assimilation du S minéral au sein de la plante (Fismes *et al.*, 2000). Des apports élevés de N minéral peuvent ainsi aggraver une situation de carence en S et affecter la qualité de l'huile (Asare et Scarisbrick, 1995 ; Ahmad et Abdin, 2000a ; Ahmad *et al.*, 2007). En revanche, il n'existe que très peu de travaux décrivant l'importance et les mécanismes d'une mobilisation du soufre à l'échelle de la feuille ou de la plante entière, en réponse à une réduction du niveau de la fertilisation soufrée.

II. Objectifs et plan de la thèse :

Cette thèse, à été financée par une allocation du Ministère de l'Éducation Supérieure et de la Recherche Scientifique d'Égypte (ESRS). Elle s'insère par ailleurs dans le cadre d'un programme ANR- COSMOS (Colza et Soufre : cycle du soufre et Mobilisation des

composés soufrés et azotés en réponse à une Oligotrophisation en Soufre, 2006-2008) et dans celui de l'UMR INRA-UCBN 950 EVA de l'Université de Caen Basse-Normandie au sein duquel l'étude des réponses physiologiques et moléculaires du colza à une limitation en S constitue un nouvel axe de recherche.

Dans ce cadre, ma thèse vise à **étudier les effets de la limitation en S exogène sur l'absorption et la remobilisation de composés S et accessoirement N au niveau de la plante entière, ainsi qu'à l'échelle de différents organes cibles (rangs foliaires), en se limitant dans un premier temps au stade de développement végétatif du colza. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux mécanismes physiologiques et moléculaires intervenant dans le recyclage des composés soufrés et azotés.** Dans un premier temps, une approche reposant sur l'utilisation de traceurs ^{34}S et ^{15}N visait à quantifier les flux inter-organes de S et de N endogènes et ainsi mettre en évidence le potentiel du végétal à compenser une disponibilité réduite en S au stade végétatif par une remobilisation. Cette première démarche a ensuite débouché sur une caractérisation plus fine des mécanismes potentiellement impliqués (absorption et transport du sulfate, sénescence foliaire). Un certain nombre d'indicateurs du niveau de nutrition soufrée ont par ailleurs pu être identifiés et ont ensuite été utilisés dans le cadre d'une enquête en milieu agricole.

Après une présentation des caractéristiques physiologiques et agronomiques de la plante étudiée (le colza d'hiver), l'analyse bibliographique (Chapitre II) fera dans un premier temps un bilan des connaissances relatives aux réponses des brassicacées, et du colza en particulier, à une limitation en S minérale en présentant : 1) le caractère indispensable de cet élément au bon fonctionnement de la plante, 2) les mécanismes qui régissent l'acquisition et l'assimilation du S, 3) la nature des réserves S chez le colza, 4) les stratégies connues ou hypothétiques de la plante pour améliorer l'efficacité d'utilisation du S (EUS) en se focalisant sur les processus de mobilisation susceptibles d'être impliqués dans le recyclage foliaire des composés S associés potentiellement à une sénescence foliaire. L'ensemble de cette analyse bibliographique a permis de proposer un certain nombre d'hypothèses qui ont conditionné les approches expérimentales mises en place.

Les résultats obtenus ont fait l'objet de cinq manuscrits de publications, sous presse ou en cours de soumission dont les 3 premiers font l'objet des chapitres I à III des résultats :

- **ABDALLAH, M., DUBOUSSET L., MEURIOT F., ETIENNE, AVICE J.C. and A. OURRY** (2010a). Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany*, acceptée IF= 4.44.
- **ABDALLAH M., OURRY, A. and F. MEURIOT**, 2010b. Fluctuations of S availability affect growth, S reserves, ¹⁵N and ³⁴S uptake in *Brassica napus* L. *Soumis à Journal of Experimental Botany*.
- **ABDALLAH M., ETIENNE P., OURRY and F. MEURIOT**, 2010c. Influence of initial S reserves and mineral S availability on leaf senescence and S and N mobilization in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Soumis à Plant science*.
- **SARDA X., DIQUELOU, S., ABDALLAH M., DUBOUSSET L., GAUTIER, V., CANTAT, O., MEURIOT F. AVICE J.C., and A. OURRY**, 2010d. Assessment of S deficiency in *Brassica napus* L. agricultural plots from stem, seed and senescing leaf analysis. *Soumis à European Journal of Agronomy*.
- **DUBOUSSET L., ABDALLAH M., DESFEUX A.S., ETIENNE P., MEURIOT F., HAWKESFORD M.J., GOMBERT J., SEGURA R., BATAILLÉ M.P., REZE S., BONNEFOY J., AMELINE A.F., OURRY A., LE DILY F. and, J.C. AVICE**, 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. IF= 4.44.

L'ensemble de ces résultats fera ensuite l'objet d'une discussion générale et les conclusions principales permettront de dégager de nouvelles perspectives de recherche.

***ANALYSE
BIBLIOGRAPHIQUE***



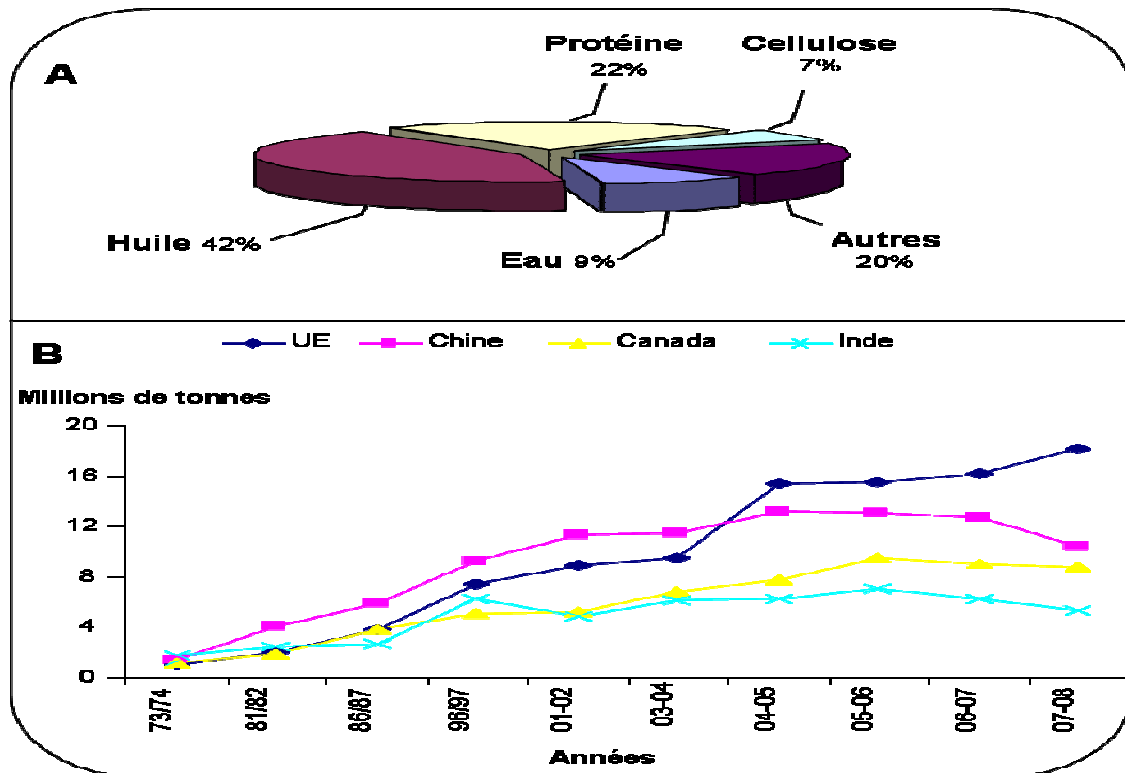


Figure 2: (A) Composition moyenne de la graine de colza (source: CETIOM) (B) Répartition mondiale de la production de graines de colza en 2007/2008 (en millions de tonnes) (Source PROLEA-CETIOM 2007).

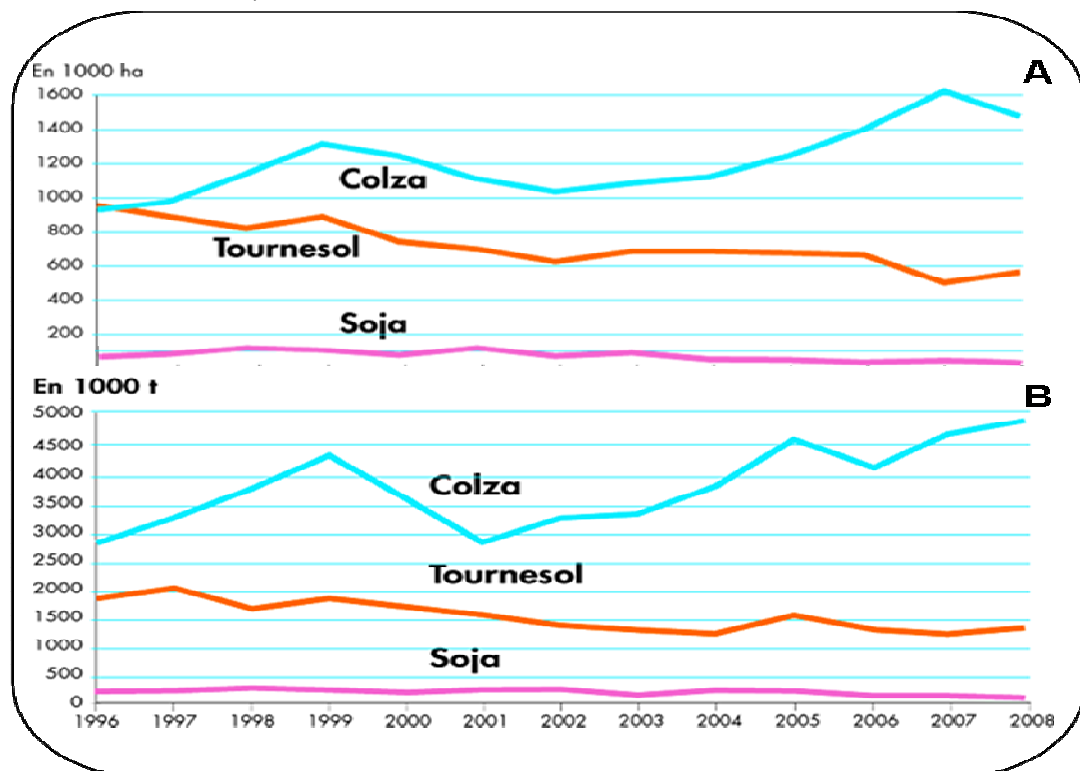


Figure 3: Evolution des surfaces françaises d'oléagineux (A) depuis 1996 (Source PROLEA-CETIOM 2007) et de la production française de oléagineuses depuis 1996 (B).

Analyse bibliographique

A Le colza

A.1 Généralités

Le colza (*Brassica napus* L.), plante herbacée annuelle pouvant atteindre plus de deux mètres de hauteur, appartient à la famille des Brassicacées (crucifères) et résulte de l'hybridation naturelle entre le chou (*Brassica oleracea* L.) et la navette (*Brassica campestris* L.). Les variétés de colza d'hiver sont les plus répandues en Europe de l'Ouest, et elles sont considérées comme des plantes bisannuelles. Elles réalisent leur cycle de développement en 250-310 jours. Les variétés de printemps, dont le cycle de développement s'effectue en 120-150 jours, sont pour leur part considérées comme des plantes annuelles.

A.2 Aspects agronomiques

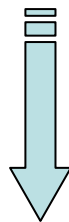
Le colza est largement cultivé dans le monde tant pour une valorisation alimentaire que non alimentaire de ses graines riches en protéines (22%) et présentant des teneurs particulièrement élevées en huile (de l'ordre de 42% ; CETIOM ; Figure 2A).

A.2.1 Evolution des surfaces cultivées et de la production mondiale

Le colza est une culture largement répandue dans le monde, principalement dans les zones tempérées fraîches. Les surfaces cultivées n'ont cessé de croître depuis un demi-siècle (Figure 2B) mais plus particulièrement au sein de l'Union Européenne lors des 20 dernières années. La production mondiale de graines de colza, qui était de l'ordre de 7,1 millions de tonnes en 1974, dépasse désormais en 2007 les 47 millions de tonnes. Ceci permet une production de 18 millions de tonnes d'huile et environ 27 millions de tonnes de tourteaux. Les principaux producteurs mondiaux par ordre d'importance sont l'Union Européenne, la Chine, le Canada et l'Inde (Source PROLEA-CETIOM ; Figure 2B).

A.2.2 la production Européenne

En 2007, l'Union Européenne produisait le tiers du colza mondial soit environ 16 millions de tonnes de graines. A l'échelle de l'Union Européenne des 27 Etats Membres, les principaux producteurs sont la France et l'Allemagne (estimations EuroStat, 2008). En France, bien que représentant seulement 60 000 hectares en 1960, la superficie cultivée en colza a doublé entre 1994 et 2008 contrairement aux autres plantes oléagineuses (comme le tournesol) pour lesquelles les superficies de culture ont eu tendance à diminuer



4 grandes familles de Colza



Classique
*Riche en acide
 α -linoléique*



**Biocarburants,
Diététique (Oméga 3)**



Érucique
Riche en Acide érucique



**Chimie verte
production de détergents
et cosmétiques**



Oléique
Riche en acide oléique



**Diététique, Chimie verte,
Biocarburants**



**Riche en acide
oléique et pauvre en
acide α -linoléique**



**Diététique
(huile de friture)**

Figure 4: Débouchés alimentaires et industriels du colza (*Brassica napus* L.)

(Figure 3A et B). Avec 1,6 millions d'hectares en 2007 (Agreste, 2007), la production française était de 4,7 millions de tonnes de graines avec des rendements moyens de 29,1 quintaux.ha⁻¹. Depuis ces dix dernières années, le potentiel de rendement a gagné 2,5% par an. Cette augmentation significative des rendements est essentiellement due aux progrès génétiques (sélection variétale), ainsi qu'à l'amélioration des techniques agricoles et des modalités d'apport des intrants (fertilisants et produits phytosanitaires).

A.3 Les débouchés alimentaires et industriels du colza

Cette extension des surfaces cultivées s'explique par les débouchés alimentaires et industriels multiples qu'offre cette culture. Quatre types essentiels de débouchés agroalimentaires et industriels sont spécifiquement conditionnés par la richesse en certains acides gras (Figure 4). En effet, les fruits du colza sont des siliques renfermant de petites graines ex-albuminées à cotylédons riches en lipides (environ 45%) qui sont utilisées pour l'essentiel à la production d'huile de table (Figure 4). L'extraction de cette huile à partir des siliques fournit par ailleurs un sous-produit, le tourteau de colza, qui est une source de protéines intéressante pour l'alimentation animale. Les dérivés d'huile de colza sont également valorisés dans des usages autres qu'alimentaires, tels que des biolubrifiants, des solvants, des produits cosmétiques (Figure 4), ou encore tels que la production d'agents protecteurs du bois contre les attaques de champignons et d'insectes (ASAM). Actuellement, une des principales applications dans le domaine industriel est le diester, un biocarburant pour moteur diesel. En 2005, environ 450 000 hectares de colza ont été cultivés pour le diester soit 35% des surfaces de colza cultivé en France. Avec des besoins 2,5 fois plus élevés en 2009, les surfaces de colza dédiées au diester ont atteint 1 million d'hectares.

A.4 Cycle ontogénétique du colza d'hiver

Le développement du colza se décompose en 10 étapes (Figure 5), d'après Sylvester-Bradley et Makepeace (1984), sachant que plusieurs d'entre elles se chevauchent : germination / levée, production de feuilles, extension de la tige, développement du bourgeon floral, floraison, développement des siliques, développement des graines, sénescence des feuilles, sénescence de la tige et sénescence des siliques. On distingue deux types de colza : le colza d'hiver et le colza de printemps (ou canola), qui diffèrent de par leur cycle de développement pouvant atteindre 310 jours pour le colza d'hiver, contre 150 jours pour le colza de printemps.

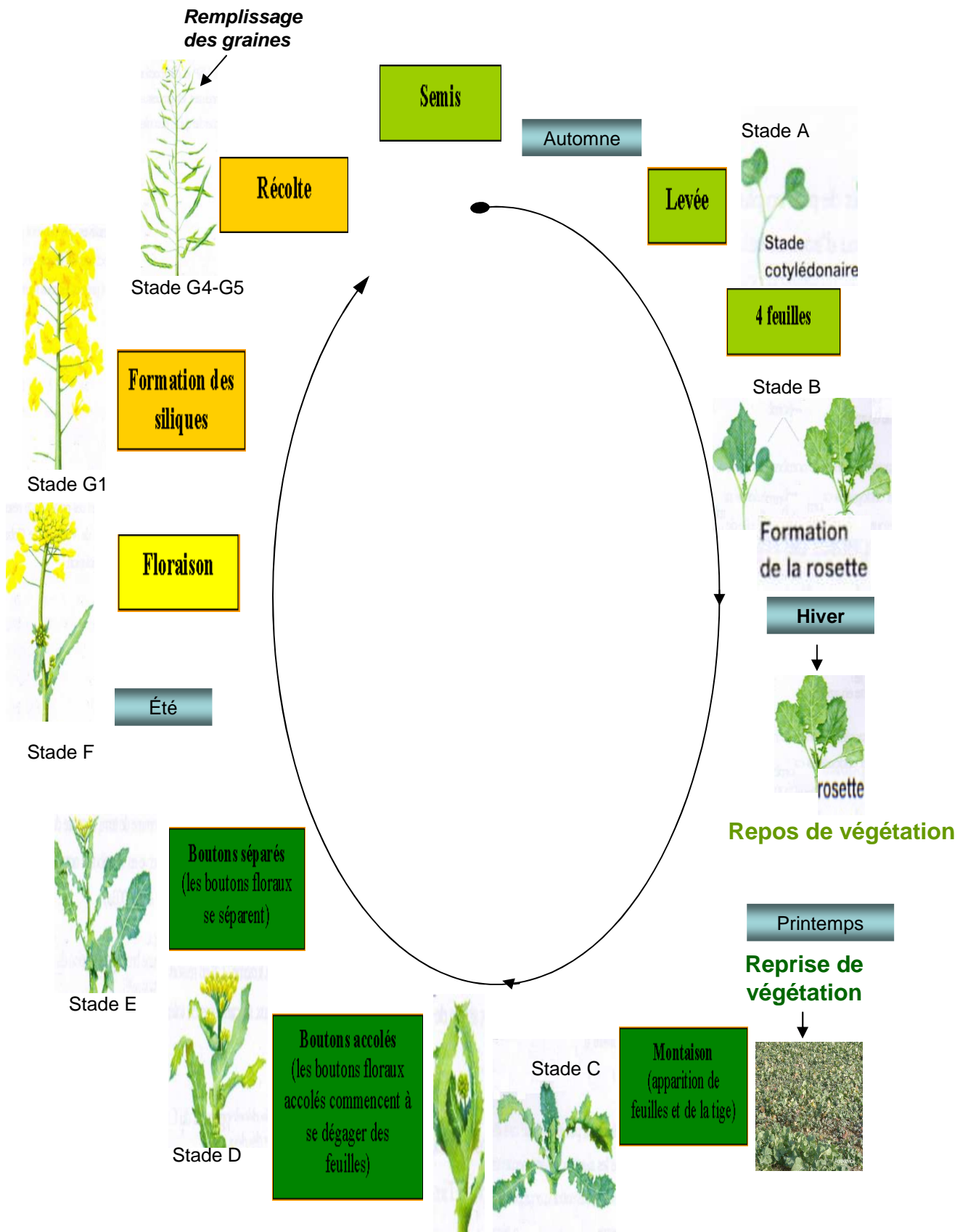


Figure 5: Principaux stades du cycle ontogénétique du colza d'hiver (source CETIOM).

En France, le colza d'hiver est généralement semé fin août – début septembre. Le temps séparant le semis de la levée (environ $150 \text{ } ^\circ\text{C} \cdot \text{J}^{-1}$) varie en fonction de la température du sol, de son taux d'humidité et de la position de la graine dans le sol. A la levée, le colza développe deux cotylédons puis la plante produit un pivot et une vingtaine de feuilles de rosette, nécessaires pour résister aux faibles températures de l'hiver. Le zéro végétatif du colza étant de 4°C , la croissance est progressivement ralentie en fin d'automne et stoppée durant la période hivernale. Le froid est cependant nécessaire à l'initiation florale du colza d'hiver (vernalisation). Généralement, une température inférieure à 10°C durant une quarantaine de jours est requise. Cependant, la durée de vernalisation est d'autant plus courte que la température est basse, l'héméroperiode longue et les plantes âgées (Leterme, 1988). L'initiation florale a lieu dès le début du mois de novembre (pour un semis précoce) jusqu'à mi-décembre (pour un semis tardif). A la fin de l'hiver, lorsque la température journalière dépasse régulièrement 5°C , la croissance reprend. La date de reprise de végétation dépend cependant plus de celle du semis que de la température (Tittonel *et al.*, 1988). La croissance printanière se caractérise par une forte production foliaire, les feuilles étant les sites majeurs de photosynthèse jusqu'à la floraison. Parallèlement, la tige s'allonge (montaison) et se ramifie. La floraison a lieu à une date relativement «fixe» car elle est fortement liée au photopériodisme. La floraison est favorisée par les jours longs mais elle est également influencée par la précocité des cultivars. La floraison s'échelonne sur 4 à 6 semaines (généralement avril, mai en France) et commence par l'inflorescence principale suivie des ramifications ; les fleurs s'ouvrant toujours de manière basifuge (Figure 5), c'est-à-dire de la base de l'inflorescence vers son extrémité. Parallèlement à la floraison, le développement des premières siliques a lieu également de manière basifuge. Les siliques puis les graines se forment progressivement. A la maturité, les tiges et les siliques de la plante sont sénescents et le moindre choc peut provoquer la déhiscence des siliques, et donc la libération des graines. La récolte a lieu lorsque le taux d'humidité des graines est inférieur à 15%.

Sa culture nécessite des quantités importantes d'intrants minéraux, en particulier N, P, K et S. Sa capacité d'absorption du nitrate du sol particulièrement élevée fait du colza une plante «pompe à nitrate». L'azote absorbé durant l'automne limite les pertes de nitrate par lessivage et le maintien des repousses en été permet de mobiliser l'azote minéral du sol, en réduisant le lessivage hivernal avant la culture de céréales traditionnellement effectuée ensuite.

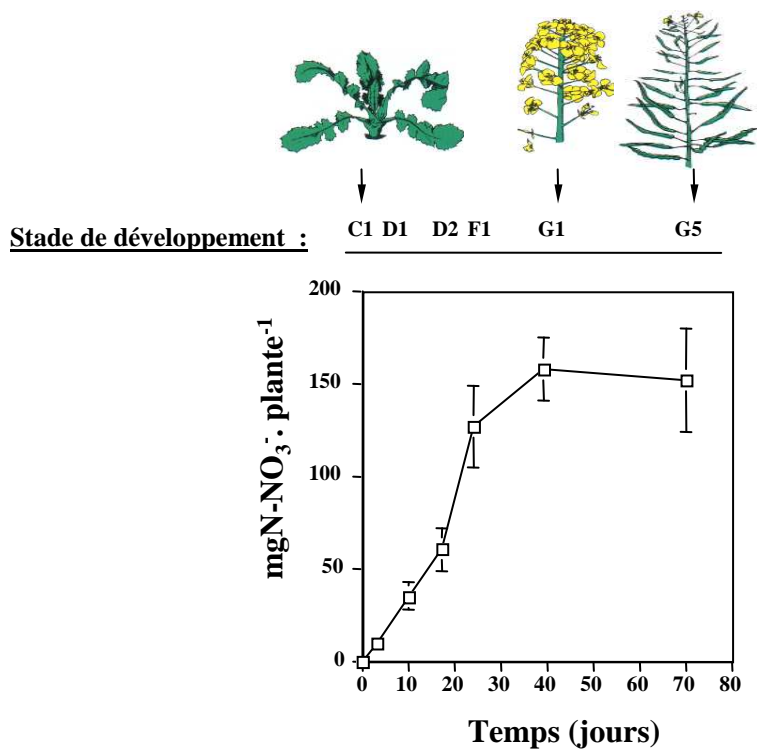


Figure 6 : Absorption cumulée d'azote nitrique (exprimée en mg N-NO₃⁻ · plante⁻¹) estimée par marquage au ¹⁵NO₃⁻ pendant 70 jours et en conditions de culture hydroponique. Les barres verticales indiquent ± l'écart-type de la moyenne pour n=6, lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole. Les stades indiqués (C à G) correspondent à ceux définis par le CETIOM. C1 : montaison; F : début floraison; G : début formation des siliques; G5 : graines colorées. D'après Rossato *et al.* (2001).

Généralement cultivé dans les rotations céréalières, le colza d'hiver permet d'augmenter le rendement en céréales (de 7 à 30% pour un blé après colza, par rapport au blé en monoculture ; source : CETIOM 2007) et joue un rôle épurateur de l'excédent nitrique du sol en automne. Cette espèce est qualifiée de nitrophile de par sa forte capacité d'absorption du nitrate. Cependant, une fois absorbé, une proportion relativement faible de cet azote est utilisée pour l'élaboration des tissus récoltés. Cette observation reflète une faible efficacité d'utilisation de l'azote (EUA).

A.5 La fertilisation azotée et soufrée du colza

L'Indice de Récolte en azote (IRN) ou NHI (Nitrogen Harvest Index) représente la part de N dans les graines par rapport au N présent dans l'ensemble des parties aériennes à la récolte. Malgré une capacité d'absorption du nitrate particulièrement élevée, le colza possède un IRN généralement inférieur à 50%, alors que chez les céréales, celui-ci peut dépasser 80%. En conséquence, le colza requiert une fertilisation importante. Pour une production de graines de 10 quintaux ha^{-1} , cela nécessite 50 à 70 kg N ha^{-1} , contre 30 kg N. ha^{-1} chez le blé. Compte tenu du rendement grainier annuel moyen du colza (environ 30 qx. ha^{-1}), une fertilisation azotée de 150 à 210 kg N. ha^{-1} est généralement nécessaire (Rathke *et al.*, 2006). Le colza a aussi des besoins importants en N en fin d'hiver et au printemps, c'est à dire lors de la période de reprise de végétation (Figure 6), alors que la disponibilité en N du sol est assez faible (Dejoux, 1999). Lors du développement des tissus reproducteurs, l'absorption d'azote est généralement plus restreinte (Figure 6, Rossato *et al.*, 2001, Malagoli *et al.*, 2005a). Pour satisfaire les besoins de la plante et obtenir un fort indice foliaire à la floraison, il est alors recommandé d'apporter une quantité importante d'engrais dès la reprise de végétation. La dose à utiliser dépend donc du reliquat en sortie hiver. Si la dose dépasse 100 kg N. ha^{-1} , il est conseillé de réaliser deux apports, voire trois si la dose est au-delà de 170 kg N. ha^{-1} (le premier apport ayant toujours lieu à la reprise de végétation (CETIOM 2007).

Des excès de fertilisation azotée ne sont pas sans conséquence pour l'environnement. Ils conduisent non seulement à une accumulation de N minéral dans le sol (Sherpherd et Sylvester Bradley, 1996), mais aussi à une teneur en N élevée des résidus de récolte susceptibles de se minéraliser pendant l'interculture. En effet, la quantité de N issue de la minéralisation du N organique contenu dans les feuilles mortes tombées au sol au cours de la période automno-hivernale peut atteindre 190 kg N. ha^{-1} (Dejoux 1999). Ainsi en contre partie de ses avantages de « piège à nitrate » à l'automne,

<i>Engrais</i>	<i>Concentration de SO₃ (1)</i>	<i>Apport minimal pour 75 unités de SO₃ ha⁻¹</i>		<i>Elément associé au soufre % (1)</i>
		<i>en kg</i>	<i>en litre</i>	
<i>Sulfate d'ammoniaque</i>	60%	125	-	21% N
<i>Sulfonitrate d'ammoniaque</i>	32,5%	230	-	26% N
<i>Ammonitrate soufré</i>	13%	580	-	26% N
<i>Solution azotée</i>	11 kg/100 L	860	680	20,6% N
<i>Superphosphate de chaux</i>	30%	250	-	18% P ₂ O ₅
<i>Superphosphate de chaux</i>	20%	375	-	25% P ₂ O ₅
<i>Sulfate de potassium</i>	45%	170	-	50% K ₂ O
<i>Kiesérite granulé (sulfate de magnésium)</i>	50%	150	-	25% MgO

Tableau I : Les 8 principaux engrais soufrés utilisés en France (CETIOM).

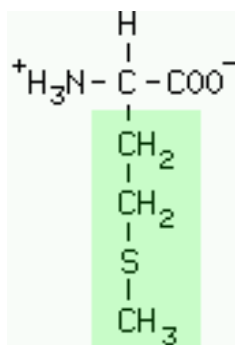
(1) Proportion variable selon les distributeurs.

c'est-à-dire pendant la période où les pertes de nitrate par lessivage sont les plus importantes, le colza présente une mauvaise Efficience d'Utilisation de l'azote (EUA). Cette dernière peut générer une source de pollution nitrique à l'automne suivant sa récolte mais peut également être profitable à la culture suivante (ex : blé après colza).

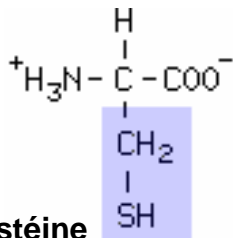
L'indice de récolte en S (IRS ou pourcentage de S dans les graines par rapport au S présent dans l'ensemble des parties aériennes) est également très faible puisqu'il est égal à seulement 20% en fin de cycle (McGrath et Zhao, 1996). Les besoins en S du colza sont par ailleurs largement supérieurs à la plupart des autres espèces de grande culture (Abrol et Ahmad, 2003).

Le S entrant principalement dans la composition des acides aminés et des protéines, son absorption et son assimilation sont fortement conditionnées par le statut N de la plante et *vice versa* (Kopriva *et al.*, 2000). Un apport de N stimule le prélèvement de S, augmente la croissance (Zhao *et al.*, 1993 ; Kast *et al.*, 1995), mais, *a contrario*, accroît l'effet d'une carence en S si sa disponibilité est trop faible (Dubousset 2009).

La teneur en S des parties aériennes des plantes diffère d'une espèce à l'autre, variant de 0,25 % à 0,80 % de la matière sèche (MS) respectivement dans les feuilles de trèfle et de colza. Le ratio S/N des teneurs en S et N varie de 1/20 (trèfle) à environ 1/7 (colza), ce qui révèle chez ces deux espèces cultivées des besoins en S différents. Janzen et Bettany (1984) ont proposé un ratio N assimilable / S assimilable de 7 comme étant une valeur optimale chez le colza pour une utilisation efficace du N et du S (avec une incorporation maximale dans les graines). Aussi, différents modes de fertilisation soufrée sont possibles (Tableau I) selon la nature du sol. Le sulfate de magnésium apporté sous forme de granulés de kiesérite est particulièrement adapté aux sols pauvres en magnésie. Cependant, l'apport de S est généralement associé à un apport de N (Tableau I) et doit être réalisé au printemps. Le sulfate d'ammoniac ne doit pas être épandu sur végétation humide ou gelée. Les apports de S sous forme de sulfonitrate d'ammoniac, d'ammonitrate soufré ou d'autres solutions N/S (Tableau I) sont bien adaptés au deuxième apport de N. Le CETIOM recommande un apport d'environ 30 kg S.ha⁻¹ quelles que soient les conditions de culture ou le statut S du sol, ce qui ressemble plus à une fertilisation de sécurité qu'à un apport raisonné.



Méthionine



Cystéine

✓ **ACIDES AMINES :**

- Synthèse de protéines essentielles (enzymes...)
- Régulation absorption et assimilation d'autres éléments (N, Na...)

✓ **GLUTATHION** : tripeptide composé de glycine, d'acide glutamique et de cystéine.

Fonctions multiples :

- intervient dans les réactions d'oxydoréduction,
- forme de transport des acides aminés,
- anti-oxydant : neutralise les radicaux libres,
- agent de détoxication (phytochélatine),

✓ **SAM:**

- Synthèse des chlorophylles

Soufre

✓ **PYRUVATE, COENZYME A :**

- Métabolisme respiratoire

✓ **GLUCOSINOLATES** : composés secondaires soufrés

- Résistance des végétaux aux maladies et aux animaux (myrosinase),
- Réserve de soufre.

Figure 7 : Principaux rôles du soufre chez les végétaux supérieurs.

B. Acquisition et métabolisme du soufre chez les végétaux supérieurs

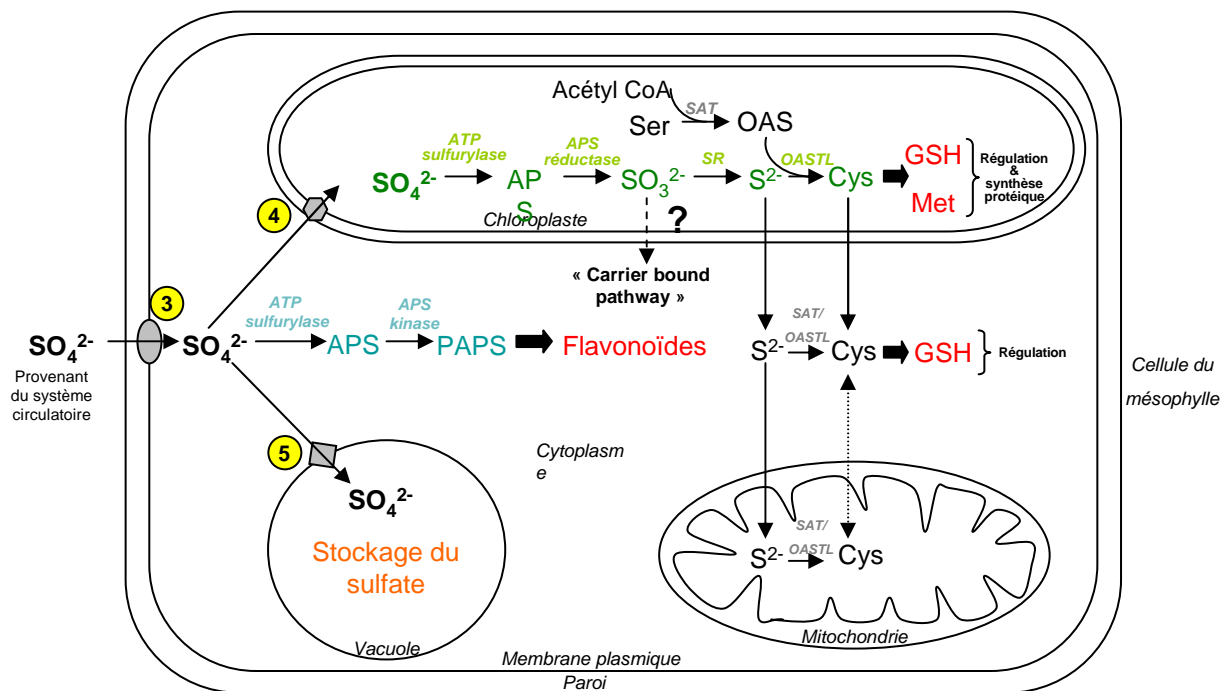
B.1 L'importance du soufre dans la biomasse

Le soufre (S) est un élément essentiel à la nutrition des végétaux, et il est quantitativement le quatrième élément minéral le plus important après l'azote (N), le phosphore (P) et le potassium (K) (Figure 7). Il entre dans la synthèse des protéines (rôle important dans la stabilité de la structure tertiaire assurée notamment par des ponts disulfures après oxydation des groupements SH), des acides aminés soufrés (cystéine et méthionine), de peptides (glutathion, phytochélatines), du co-enzyme A, des vitamines, ou encore de composés secondaires soufrés divers tels que les glucosinolates ou les phytoalexines. Au sein des écosystèmes, la teneur moyenne en S total du sol se situe entre 0.02 et 0.2% en grande majorité sous forme organique (Friend, 1973). Il est prélevé par les plantes essentiellement sous forme de sulfates. Or ces derniers, comme les nitrates, sont des anions très mobiles, et les pertes par lessivage peuvent atteindre 80 kg S ha⁻¹an⁻¹ (Studer, 1987). L'exportation moyenne de soufre par les végétaux cultivés est en outre d'environ 50 Kg ha⁻¹ (Stewart et Bettany, 1982). L'apport de soufre par fertilisation apparaît donc nécessaire pour les cultures à large échelle telles que le blé ou encore le colza.

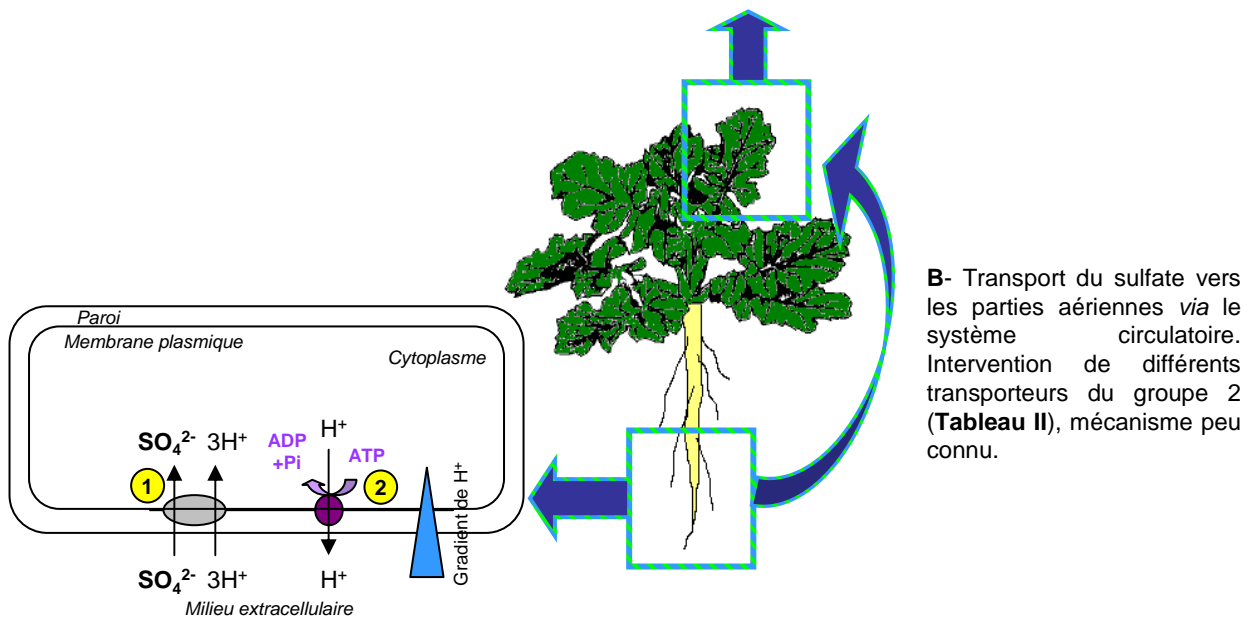
B.2 L'état et la dynamique du soufre dans le sol

Il est présent dans les sols sous forme organique ou minérale. Dans les sols arables, les formes organiques représentent environ 95% du soufre présent dans les sols (Scherer, 2001) des régions tempérées et humides.

Le soufre organique du sol est généralement présent sous 3 formes potentielles : le S élémentaire « HI-réductible » (principalement des esters sulfates), les acides aminés soufrés et le S résiduel lié au carbone (principalement des sulfonates et du S hétérocyclique) (Kertesz et Mirleau, 2004). Ce S organique n'est disponible pour les racines des plantes que par l'intermédiaire d'enzymes hydrolytiques : les sulfatases (Scherer, 2001). Ces sulfatases sont principalement microbiennes et la mieux caractérisée est l'aryl-sulfatase qui hydrolyse les esters de sulfate en sulfate (Vong *et al.*, 2007). Les composés exsudés par certaines plantes (dont le colza) stimulent cependant l'activité aryl-sulfatase microbienne et peuvent orienter la composition des communautés bactériennes telluriques (Dedourge *et al.*, 2004).



C- Assimilation réductrice et non réductrice dans les feuilles.



A- Absorption racinaire du soufre sous forme de sulfate

Figure 8 : Absorption (A), transport (B) et voies d'assimilation réductrice/non réductrice (C) du sulfate (SO_4^{2-}) dans la cellule végétale. Les voies d'assimilation réductrice et non réductrice sont respectivement représentées en vert et en bleu. Les enzymes sont indiquées en italique dans la couleur correspondante. Les molécules produites sont présentées en rouge. Par ordre alphabétique, les molécules impliquées dans l'assimilation du SO_4^{2-} sont : **Acétyl CoA** : Acétyl Co-enzyme A, **APR** : Adénosine 5'-phosphosulfate réductase, **APS** : Adénosine 5'-phosphosulfate, **Cys** : cystéine, **GSH** : glutathion sous forme réduite, **Met** : méthionine, **OAS** : O-acétylsérine, **OASTL** : O-acétylsérine thiolylase, **PAPS** : 3'-phospho-5'-adénylylsulfate, **S^{2-}** : sulfide, **SAT** : S-acétyl-transférase, **SO_3^{2-}** : sulfite, **SR** : sulfite réductase (d'après Leustek & Saito 1999 ; De Kok *et al.* 2005).

Dans la plupart des terres agricoles, le soufre minéral représente une part inférieure à 5 % du S présent dans le sol. Il est également présent essentiellement sous trois formes dans ce compartiment : le sulfate (SO_4^{2-}) de la solution du sol, le sulfate adsorbé sur le complexe argilo-humique du sol et le soufre solide. Sous sa forme solide, c'est-à-dire essentiellement sous forme de sulfate de calcium (CaSO_4) dans les roches sédimentaires, il est très peu accessible pour la croissance des organismes. Le sulfate présent dans la solution du sol est en équilibre avec les formes adsorbées ; une augmentation de la teneur en sulfate de la solution du sol engendre une augmentation de sulfate adsorbé (Scherer, 2001). Le sulfate adsorbé est très peu disponible pour la plante car il est retenu par des minéraux insolubles à forte charge positive, notamment des hydroxydes d'aluminium et de fer, mais peut être désorbé en présence de phosphate (Scherer, 2001). Cette adsorption est également fortement dépendante du pH. Elle est forte à pH acide et devient négligeable pour un pH supérieur à 6.5 (Curtin et Syers, 1990 ; Hu *et al.*, 2005). Le S peut être accumulé sous forme de métaux soufrés tel que la pyrite ou sous forme précipitée avec le CaSO_4 dans les sols calcaires. Niknahad-Gharmakher (2009) ont montré que quand le S élémentaire est mélangé au sol, il peut alors être oxydé en sulfate par les microorganismes par une série de réactions enzymatiques.

B.3 Mécanismes d'absorption et de transport du soufre

Dans le sol, les racines absorbent le soufre sous forme de sulfate (SO_4^{2-}) qui constitue la voie majeure d'acquisition du S. Les plantes sont également capables d'absorber passivement le dioxyde de soufre (SO_2) et le diméthylsulfure (CH_3SCH_3) atmosphériques par voie foliaire, mais cette fraction ne contribue que très peu à la nutrition soufrée, même si elle n'est quantitativement pas négligeable dans les régions industrielles fortement polluées (Leustek et Saito 1999).

L'absorption du sulfate correspond à un flux net, bilan de deux flux unidirectionnels opposés à travers la membrane plasmique des cellules racinaires : l'influx et l'efflux (Cram, 1983 ; Bell *et al.*, 1995). L'influx se fait contre un gradient électrochimique grâce à un transport de type symport ($1 \text{ SO}_4^{2-} / 3 \text{ H}^+$) et nécessite un gradient de protons maintenus par une pompe H^+ /ATPasique (Figure 8A) (Clarkson *et al.*, 1989 ; Leustek et Saito, 1999). Un certain nombre de transporteurs à forte affinité ou à faible affinité a été mis en évidence chez les plantes supérieures (Leustek et Saito, 1999).

Les transporteurs de sulfate possèdent 12 domaines transmembranaires et sont codés par une même famille de gènes (Smith *et al.*, 1997 ; Hawkesford, 2003). Les

	Localisation	Affinité pour le sulfate	Rôle
Groupe 1	Racinaire et foliaire (minoritaire)	haute ($K_m = 1,5-10 \mu M$)	Absorption racinaire du sulfate (Sultr1;1 et Sultr1;2) et sa redistribution des organes source vers les organes puits (Sultr1;3)
Groupe 2	Racinaire et foliaire	moins haute que pour le groupe 1 ($K_m \sim 0,41 mM$)	Chargement/déchargement du xylème dans les racines et les feuilles (Sultr2;1) et chargement puis transport par le phloème dans les racines et feuilles (Sultr2;2)
Groupe 3	Foliaire	inconnue	inconnu
Groupe 4	Racinaire et foliaire	inconnue	Rôle inconnu au niveau du chloroplaste et efflux du sulfate stocké dans la vacuole
Groupe 5	inconnue	inconnue	inconnue

Tableau II : Les 5 groupes de transporteurs de sulfate mis en évidence chez *Arabidopsis thaliana* (Buchner *et al.*, 2004 ; Yoshimoto *et al.*, 2002 ; Abrol & Ahmad, 2003).

relations phylogéniques entre les séquences protéiques de ces systèmes de transport, leur fonction et distribution (Tableau II) ont permis de les classer en cinq groupes (Buchner et al., 2004a ; Hawkesford et De Kok, 2006). Des représentants de chacun de ces groupes ont été caractérisés dans les plantes supérieures et en particulier chez *Arabidopsis thaliana* (Buchner et al., 2004b) et *Stylosanthes hamata* (Smith et al., 1997). Les transporteurs des groupes 1, 2 et 3 sont localisés dans la membrane plasmique, tandis que les transporteurs des groupes 4 et 5 sont localisés dans la membrane tonoplastique. Les transporteurs du groupe 1 sont impliqués dans le prélèvement du sulfate de la solution du sol. Ils ont une forte affinité pour le sulfate et sont principalement exprimés dans les racines (Leustek et Saito, 1999 ; Takahashi et al., 2000 ; Buchner et al., 2004a). Lorsque le milieu s'appauvrit en sulfate, la synthèse de ces transporteurs est fortement stimulée (Hawkesford et al., 1993). Leur expression est donc usuellement réprimée *in planta* en condition non limitantes en S. Certains groupes de gènes de transport du sulfate seraient exprimés dans les racines, les parties aériennes ou dans les deux types de tissus. Toutefois, le rôle fonctionnel de certains des groupes 3 à 5 reste à confirmer. Les résultats les plus récents sur chaque groupe fonctionnel sont rapportés ci-après :

Les transporteurs à haute affinité (K_m avoisinant les 10 μM) (Smith et al., 1995, 1997) jouent un rôle dans l'absorption du sulfate du sol. Les transporteurs de sulfate **AtSultr1;1** et **AtSultr1;2** appartenant au **groupe 1** sont les mieux caractérisés : Ils sont exprimés majoritairement dans les poils absorbants, les cellules épidermiques et les cellules corticales de racines (Takahashi et al., 2000 ; Vidmar et al., 2000 ; Yoshimoto et al., 2002, 2007 ; El Kassis et al., 2007). Les transporteurs AtSULTR1;3 seraient quand à eux impliqués dans le chargement phloémique du sulfate (Yoshimoto et al., 2003).

Deux gènes appartenant au **groupe 2** (**AtSultr2;1** et **AtSultr2;2**) codent des transporteurs de plus faible affinité (K_m supérieur à 100 μM) qui sont localisés dans les cellules des vaisseaux conducteurs (Figure 9B) de la sève xylémique (pour **AtSULTR2;2**) et phloémique (pour **AtSultr2;2**) des racines. Le sulfate absorbé est ensuite soit stocké dans les vacuoles des racines (Figure 9B), soit transporté *via* les vaisseaux conducteurs du xylème vers les feuilles où il est alors assimilé et/ou stocké dans les vacuoles (Figure 9C, Tableau II). Ces deux transporteurs interviendraient plus spécifiquement dans le transport à longue distance au cours de la translocation du sulfate des organes source aux organes puits (Takahashi et al., 2000).

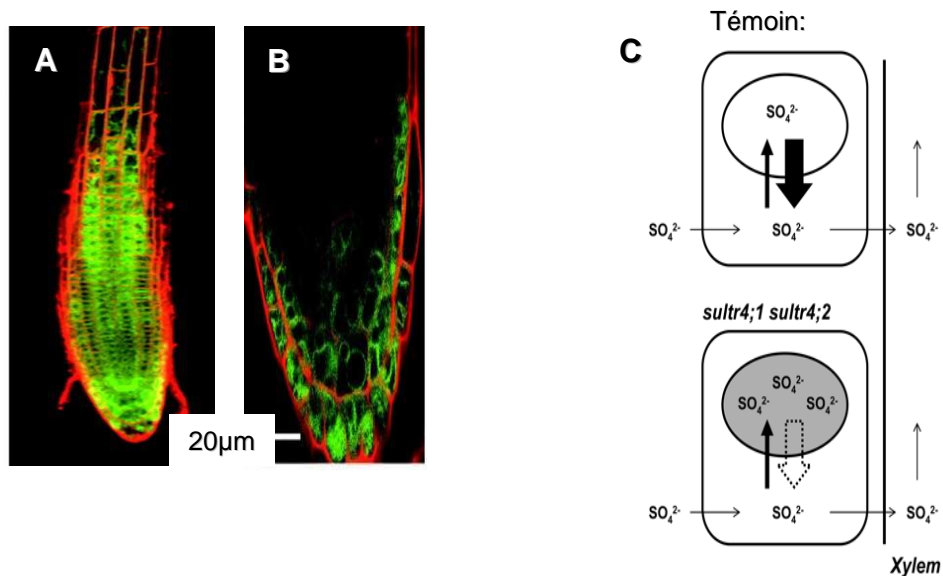


Figure 9 : (A et B) : Localisation tonoplastique de SULTR4;1 au sein de cellules épidermiques de l'apex racinaire d'*Arabidopsis thaliana*, observée en microscopie confocale par Kataoka *et al.*, (2004). Cette protéine est révélée par fluorescence verte de la protéine de fusion SULTR4;1- GFP. La fluorescence rouge est obtenue par révélation des parois cellulaires à l'iodure de propidium.

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

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

Les rôles des transporteurs du **groupe 3** n'ont pas encore été totalement élucidés. Chez *Arabidopsis*, **AtSultr3 ;1**, **AtSultr3 ;2** et **AtSultr3 ;3** sont tous localisés au niveau foliaire (Takahashi *et al.*, 2000 ; Hawkesford *et al.* , 2003), tandis que chez *Brassica oleracea* **BoSULTR3 ;2** est exclusivement exprimé au niveau racinaire et **BoSULTR3 ;3** est retrouvé aux niveaux foliaires, caulinaires et racinaires (Buchner *et al.*, 2004b ; Tableau II). En outre **BoSultr.3;4** et **BoSultr.3 ;5** sont respectivement exprimés chez *Brassica oleracea* aux niveaux caulinaire et racinaire (Buchner *et al.*, 2004a).

L'identification des transporteurs impliqués dans le recyclage du sulfate vacuolaire a été effectuée par Kataoka *et al.* (2004). Ces transporteurs appartiennent au **groupe 4 (AtSultr4;1 et AtSultr4;2)** et sont localisés au niveau du tonoplaste des cellules du péricycle, du parenchyme xylémique des racines (Figure 9A et B) et des cotylédons. Ils sont responsables de l'efflux de sulfate de la vacuole vers le cytoplasme (Figure 9C).

Le groupe 5 de transporteurs de sulfate correspond au groupe dont les séquences nucléotidiques diffèrent des autres transporteurs identifiés. Chez *Brassica napus* **BnSULTR 5;1** est présent au niveau tonoplastique dans les racines, les tiges et les feuilles. Bien que la fonction cellulaire des transporteurs du groupe 5 soit à ce jour inconnue, leur intervention dans l'influx de sulfate vacuolaire est fortement suspectée (Hawkesford *et al.*, 2003 ; Parmar *et al.*, 2007). Cette hypothèse n'exclut pas que cette famille de transporteurs puisse être impliquée dans le transport d'autres éléments. Par exemple, chez *Arabidopsis*, **Atsultr5;2** serait impliqué dans le transport à haute affinité du molybdène et, de ce fait, a été renommé MOTI pour MOlybden Transporter 1 (Tomastu *et al.*, 2007 ; Baxter *et al.*, 2008).

B.4 Assimilation du sulfate

L'assimilation du sulfate peut se faire selon deux voies (Figure 8C): la voie d'assimilation réductrice plastidiale, qui semble majoritaire, et la voie d'assimilation non réductrice cytosolique (Leusteck et Saito, 1999 ; Kopriva et Koprivova, 2004 ; Saito, 2004).

B.4.1 Voie réductrice

Cette réduction est fortement dépendante de l'intensité lumineuse et les enzymes catalysant cette réaction sont principalement localisées dans les chloroplastes. Les électrons sont fournis par la ferrédoxine réduite. Contrairement au nitrate, le sulfate est un composé inerte qui doit être activé avant d'être réduit et métabolisé (Figure 8C) (Saito, 2004). Cette réduction est catalysée par une ATP sulfurylase (ATPS) dans les plastes ou dans le cytosol (Leustek et Saito, 1999). Elle active le sulfate en le convertissant en

adenosine-5'-phosphosulfate (APS) grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP en pyrophosphate, lui-même hydrolysé en Pi dont l'énergie libérée entraîne la formation d'APS (Leustek et Saito, 1999 ; Scherer, 2001). Le sulfate actif présent sur l'APS est ensuite transféré sur le groupement thiol du glutathion (GSH) via l'APS sulfotransférase (ou APS réductase). Puis, en présence d'un excès de glutathion, il y a libération de sulfite libre (SO_3^{2-}). Le sulfite peut être directement utilisé comme source de S pour l'UDP-sulfoquinovose qui est le précurseur des sulfolipides (Rausch et Wachter, 2005). La réduction du SO_3^{2-} en ion sulfure (S^{2-}) est catalysée par le sulfite réductase en présence de 6 ferrédoxines. Cette voie est essentiellement chloroplastique. L'existence d'une deuxième voie de réduction appelée « carrier bound pathway » dans laquelle le sulfite n'est pas libre mais lié au groupement thiol d'un transporteur est toujours discutée (Leustek et saito, 1999). Le sulfite est alors réduit en S lié par le thiosulfate réductase en présence de 6 ferrédoxines. Le premier composé organique soufré synthétisé est la cystéine. Cet acide aminé sera à l'origine de tous les composés organiques soufrés (Rausch et Wachter, 2005) et pourra être synthétisé dans les plastes, le cytoplasme ou encore les mitochondries (Figure 8C) (Saito, 2004). Sa synthèse implique 2 enzymes : la serine acétyl-transferase (SAT) qui forme l'Oacétyl- L-sérine (OAS) à partir de la sérine et de l'acétylCoA et l'O-acetylserine(thiol)lyase (OAS-TL) qui catalyse la synthèse de la cystéine, à partir de l'OAS et de l'ion sulfure. Ces deux enzymes peuvent agir de façon isolée ou sous forme de complexe appelé cystéine synthase, localisé à la fois dans les plastes, le cytosol et les mitochondries (Leustek *et al.*, 2000 ; Saito, 2004). L'ion sulfure libre peut donc être exporté hors du chloroplaste pour servir de substrat aux enzymes du cytosol et des mitochondries. La forme cytosolique permettrait de fournir de la cystéine pour alimenter les mécanismes de détoxification (Leustek et Saito, 1999). Le deuxième acide aminé soufré, la méthionine est issu de la cystéine à travers l'homocystéine (Figure 8C) (Saito, 2004). La cystéine est également le précurseur de plusieurs autres composés organiques soufrés en particulier le glutathion, tripeptide composé de glycine, glutamate et cystéine. Puis les protéines, sulfolipides et composés soufrés secondaires sont synthétisés par des réactions qui ne sont pas spécifiques au règne végétal (Leustek et Saito, 1999 ; Saito, 2000, 2004 ; Droux, 2004 ; Hesse *et al.*, 2004). La cystéine constitue donc le point d'entrée du soufre réduit (-SH) dans toutes les molécules organiques, comme le glutamate l'est pour l'azote réduit.

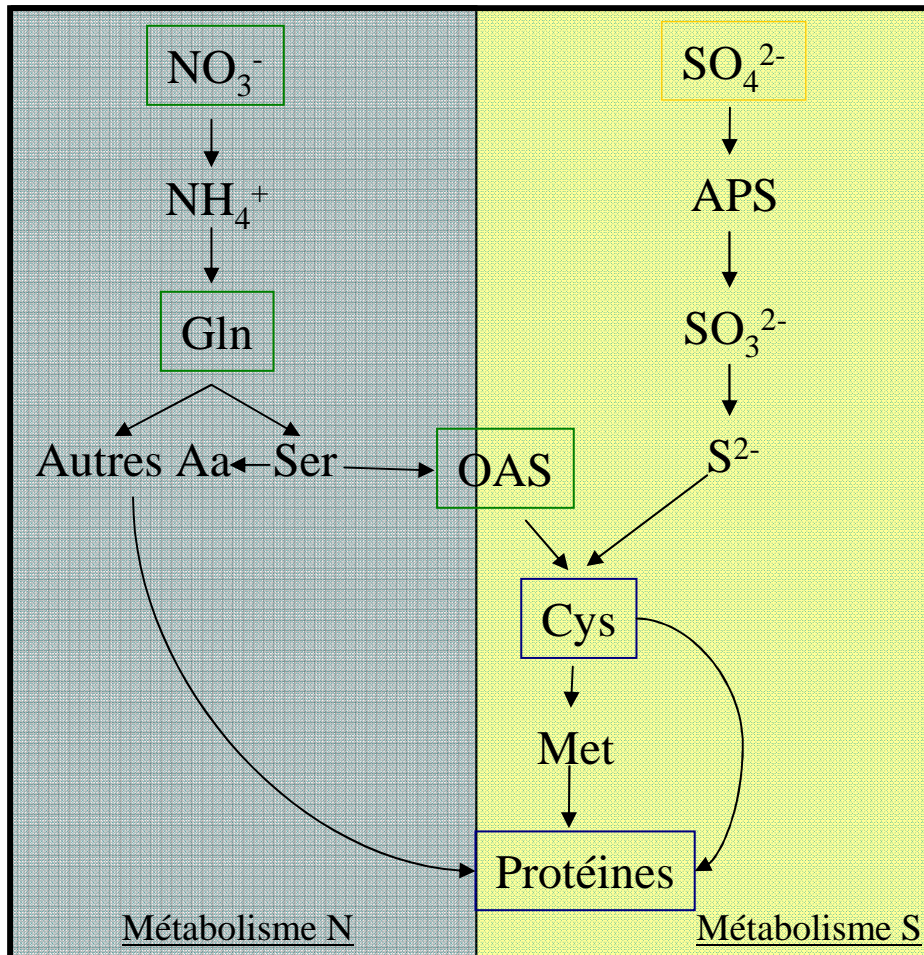


Figure 10 : Représentation schématique des interactions et régulations entre l'assimilation de l'azote et celle du soufre chez les plantes supérieures en conditions de carence en soufre (SO_4^{2-}) (d'après Smith *et al.* 1997 ; Kopriva & Rennenberg 2004).

B.4.2 Voie non réductrice

Dans le cytosol, la fixation d'un groupement phosphate en position 3' de l'APS sous l'action de l'APS kinase permet la formation du 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) (De Kok *et al.*, 2005 ; Rausch et Wachter, 2005). Le PAPS constitue une source de sulfate activé pour les sulfotransférases qui catalysent la sulfatation d'un certain nombre de composés à l'origine de flavonoïdes, de sulfolipides ou encore de glucosinolates (Leustek et Saito, 1999 ; Saito, 2004).

C. Interaction entre la nutrition azotée et soufrée

L'assimilation de l'N est fortement régulée par la disponibilité en S du milieu. Cette régulation intervient plus particulièrement au niveau des premières étapes de l'assimilation de l'azote telles que l'absorption et la réduction du nitrate (Figure 10) (Koprivova *et al.*, 2000 ; Prosser *et al.*, 2001 ; Kopriva et Rennenberg ; 2004). Cette régulation s'explique par l'importance des acides aminés soufrés dans le fonctionnement des enzymes. La diminution de l'absorption du nitrate a été observée chez l'épinard privé en sulfate (Prosser *et al.*, 2001). Chez cette espèce, les teneurs en glutamine, arginine, asparagine, lysine et thréonine augmentent dans les jeunes feuilles et ont tendance à diminuer dans les racines (Prosser *et al.*, 2001). Une rétro-inhibition de l'absorption du nitrate par ces acides aminés permettrait ainsi de co-réguler les deux métabolismes (Prosser *et al.*, 2001). L'accumulation très rapide de glutamine et d'asparagine a également été observée dans les racines d'orge, avant la diminution de la croissance ou de la synthèse de protéines (Karmoker *et al.*, 1991; Deboer et Duke, 1982). Dans les cellules de tabac privées en sulfate, l'activité de la nitrate réductase baisse fortement (Reuveny *et al.*, 1980). La transcription de la nitrate réductase est réduite dans les jeunes feuilles d'épinard lors de la privation en sulfate (Prosser *et al.*, 2001). L'O-acétyl sérine (OAS) (Figure 11) est un composé azoté à l'origine d'un grand nombre de composés soufrés organiques et plusieurs études montrent que cette molécule joue un rôle clef dans la co-régulation des métabolismes N et S (Hopkins *et al.*, 2005). Ainsi, la teneur en OAS augmente en cas de privation en S dans les racines de pomme de terre (Hopkins *et al.*, 2005), dans les cellules d'*Arabidopsis thaliana* (Wirtz *et al.*, 2004), et dans les racines et les parties aériennes du colza (Buchner *et al.*, 2004). De plus, une étude sur les siliques d'*A. thaliana* a montré que la teneur en OAS augmente lorsque le ratio azote/soufre dans la plante augmente (Kim *et al.*, 1999). Une application racinaire d'OAS provoque par ailleurs l'induction de la synthèse du transporteur à forte affinité *HvSultr1* chez l'orge (Smith *et al.*, 1997) et la stimulation de

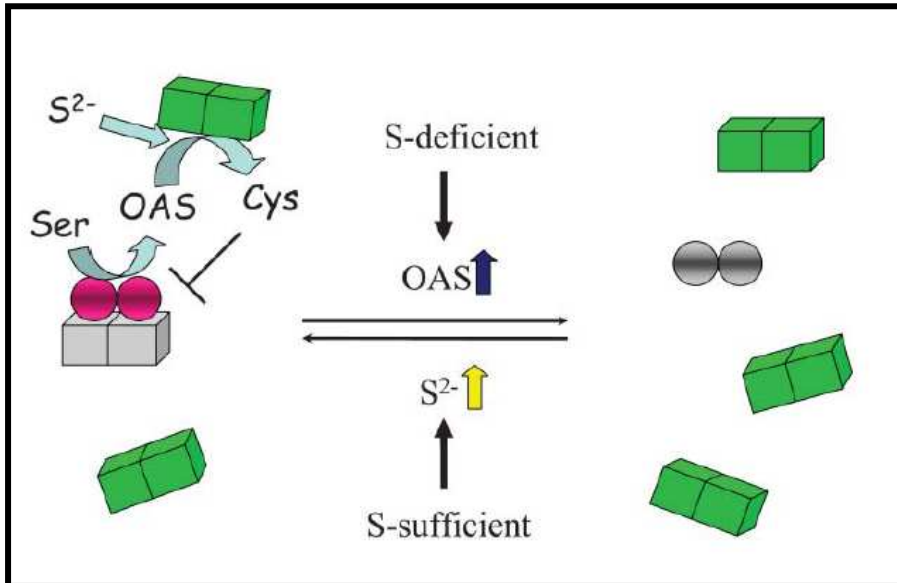


Figure 11: Circuit de régulation impliquant le complexe protéique de la Sérine acétyltransférase (sphères) et OAS(thiol)-lyase (carrés). Les concentrations en OAS(thiol)-lyase sont supérieures à celles de la Sérine acétyltransférase. Les OAS(thiol)-lyases liées sont positivement modulées par l'activité de la Sérine acétyltransférase présente dans le complexe protéique. La forme libre de l'OAS(thiol)-lyase catalyse la formation de la cystéine (Cys) par une répression de l'activité de la Sérine acétyltransférase. La déficience en soufre induit une augmentation de l'OAS ayant pour conséquence la dissociation du complexe protéique. La forme libre de la sérine acétyltransférase a une activité limitée. Par ailleurs, l'offre importante du soufre accumulé sous forme de sulfure (S_2) favorise la formation du complexe enzymatique. (Saito, 2004).

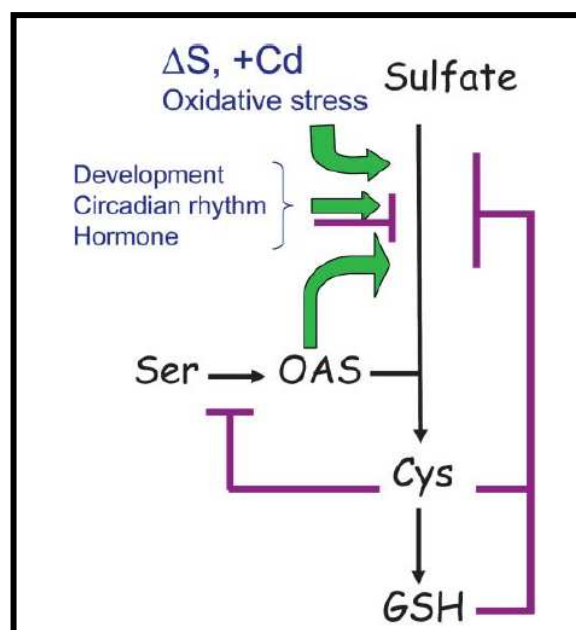


Figure 12: Schéma présentant la régulation positive et négative lors de l'assimilation du soufre. L'OAS agit en tant que facteur d'induction à effet positif. Le développement des plantes, les rythmes circadiens, et les hormones influencent le métabolisme du soufre de manière positive ou négative. La Cys et le GSH sont des régulateurs négatifs spécifiques de certaines étapes du métabolisme soufré. Les flèches indiquent un effet positif, et les barres indiquent un effet négatif. (Saito, 2004).

l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'assimilation du soufre chez *A. thaliana*. Le rôle de l'OAS en tant que régulateur de l'assimilation du soufre en relation avec le métabolisme azoté n'a cependant pas été confirmé chez la pomme de terre. Hopkins *et al.*, (2005) ont montré chez cette plante que les variations de la concentration interne en OAS sont trop faibles pour induire la synthèse des transporteurs du sulfate. Saito (2004) suggère que la transcription des transporteurs et de l'APS réductase est régulée par le S via les pools en cystéine, glutathion et OAS (Figure12).

D. Etat des lieux sur l'occurrence de carences en S

D.1. Les origines des carences en S

La carence en soufre est la conséquence de l'association de quatre phénomènes :

- (i) la diminution des retombées atmosphériques soufrées liées au contrôle et à la forte réduction des émissions atmosphériques,
- (ii) l'exportation croissante de biomasse soufrée issue de l'intensification de la production agricole, non compensée par une fertilisation.
- (iii) l'appauvrissement des engrais en S,
- (iv) la lixiviation du S des sols (Ceccotti et Messick, 1997 ; Scherer, 2001).

Ces déficits en S ont été rapportés en Afrique, Amérique, Asie et Europe de l'Ouest au niveau d'un grand nombre d'agrosystèmes (Figure 13) (Ceccotti, 1996a ; Ceccotti et Messick, 1997 ; McNeill *et al.*, 2005 ; Morris, 2007). Dans les pays développés, l'intensification des systèmes culturels, liée à une nécessité d'augmentation des rendements, s'est faite d'une part grâce à l'utilisation de fertilisants riches en N, P, K et pauvres voire dépourvus en S (Murphy et Boggan 1988) et, d'autre part, par l'utilisation de variétés à haut rendement. Cette intensification a augmenté les exportations soufrées non compensées par l'apport d'engrais soufrés lors des récoltes (Ceccotti et Messick, 1997) et par conséquent a entraîné des prélèvements accrus du soufre des sols (Ceccotti et Messick, 1997). Par exemple, en Irlande, une prairie de Ray-Grass a un rendement annuel de 10 t. ha⁻¹ de matière sèche. Lorsqu'elle est stimulée par une fertilisation azotée, cela peut conduire à une récolte induisant une exportation de 30 kg de S. ha⁻¹ (Murphy et Boggan 1988). Entre 1985 et 2000, la consommation mondiale d'engrais azotés seuls est montée de 73 à 87 millions de tonnes alors que celle du S est restée quasiment constante, aux environs de 10 millions de tonnes par an, principalement réservés aux grandes cultures (Pasricha et Abrol, 2001). Ceci a progressivement conduit à partir de 1980 à une

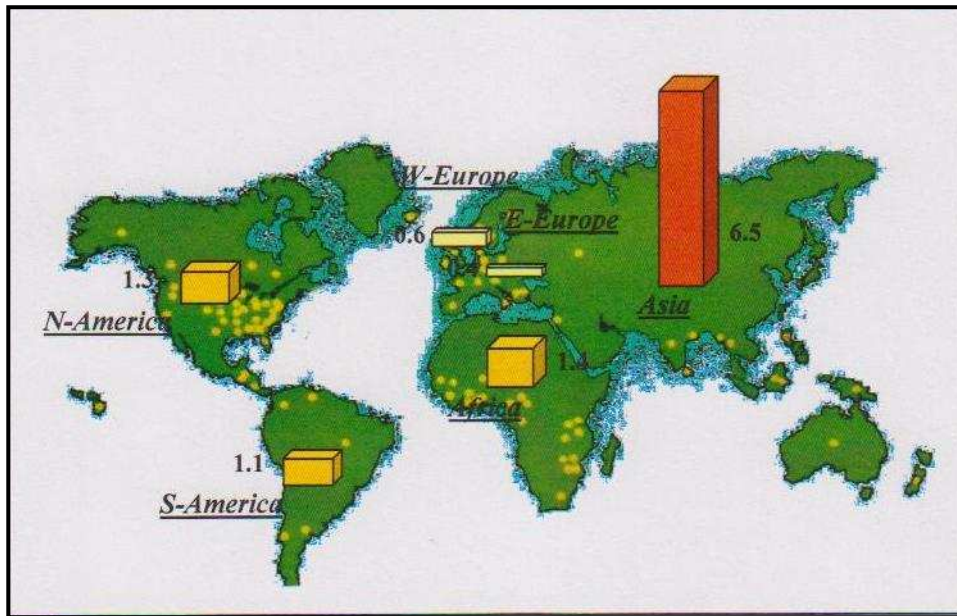


Figure 13: Estimation des déficits en soufre pour 2010 dans le monde, ● Zone d'apparition actuel de déficiences en soufre) ; (; Déficit < 1 Mt S/an; : Déficit > 1 MtS/an; : Déficit > 5Mt S/an). (d'après Ceccotti, 1996; Ceccotti et Messick, 1997; McNeill *et al.*, 2005; Morris., 2007).

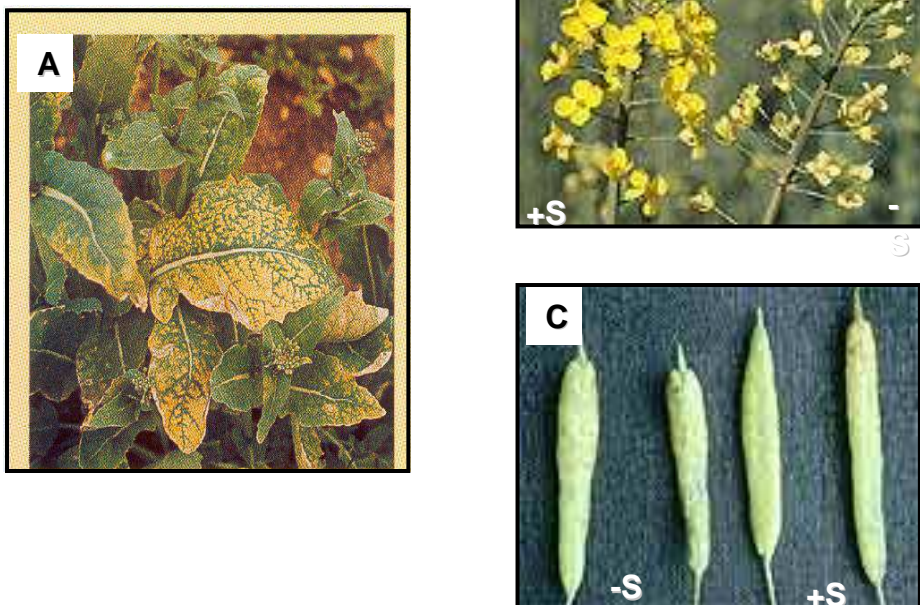


Figure 14 : (A) Décoloration caractéristique des feuilles de colza soumis à une carence en soufre (d'après Merrien *et al.* 1989). (B) Les fleurs de colza se décolorent puis avortent et donnent des siliques vides (C).

modification du rapport N/S des fertilisants en faveur de l'N. Ces différents facteurs ont entraîné une baisse des teneurs en S des sols et ont provoqué des besoins accrus en fertilisants soufrés dans les cultures exigeantes comme celle du Colza (Fismes *et al.*, 2000) (Figure 13). Or, l'intensification de la production agricole associée à une diminution des émissions de dioxyde de soufre entraîne des baisses de rendement et des diminutions de la qualité des récoltes (Ceccotti, 1996b, Scherer, 2001 ; Murphy *et al.*, 2002).

D.2. Impacts des carences en soufre à l'échelle des cultures

Durant ces 20 dernières années, plusieurs grandes cultures comme celles du colza et des céréales, ont développé des symptômes d'une carence en S (Figure 14A) avec pour conséquence une réduction de leur rendement en graines (McGrath et Zhao 1996 ; McGrath *et al.*, 1996 ; Schnug *et al.*, 2004) mais aussi une baisse de leurs qualités. En cas de carence soufrée, le rendement en graines du colza, la qualité de leur huile ainsi que la concentration en glucosinolate sont réduits (Fismes *et al.*, 2000 ; De Pascale *et al.*, 2007). La formation d'acides gras indésirables dans les huiles, tels que l'acide palmitique qui est hyper cholestéromique et l'acide érucique qui n'a aucune valeur nutritive, est favorisée (Ahmad et Abdin 2000b). Bien que les exigences en S des cultures céréalières soient moins importantes que celles du colza (Figure 15 ; Abrol et Ahmad, 2003), une importante baisse de qualité de la récolte, accompagnant celle du rendement, est également constatée en conditions de carence en S (Zhao *et al.*, 1999a). La qualité nutritionnelle du blé et la qualité boulangère des farines diminuent, par réduction du nombre de ponts disulfures essentiels dans le maintien de la fonctionnalité du gluten (Tabe *et al.*, 2002). La proportion des protéines polymériques riches en S et le gel protéique étant réduits, le gonflement, l'extensibilité et l'élasticité de la pâte sont affectés (Zhao *et al.*, 1999b ; Wieser *et al.*, 2004 ; Granvogl *et al.*, 2007). Qualitativement, les répercussions de la nutrition soufrée sur la betterave à sucre sont plus indirectes que chez les autres. En effet, le produit de récolte de la betterave à sucre, le saccharose, ne contient pas de composés soufrés. Cependant une carence en S peut affecter le taux de substrats assimilés et par conséquent le stockage de sucre dans les racines. De plus, une carence en S peut altérer le ratio Ntotal : Stotal (Hoffmann *et al.*, 2003) et provoquer le stockage d'acides aminés libres au niveau des racines. La qualité de la betterave à sucre décroît alors, ces composants azotés étant d'importantes impuretés affectant le rendement en sucre extractible.

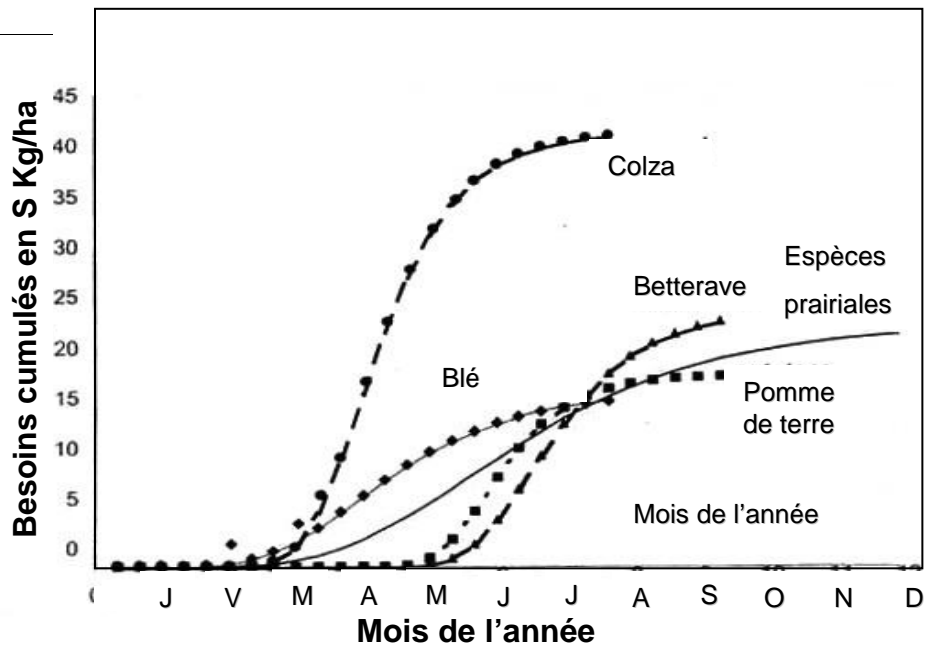


Figure 15 : Cumul des besoins annuels minimums en S (en $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) chez différentes espèces végétales : le colza (rond), la betterave sucrière (triangle), la pomme de terre (carré), le blé d'hiver (losange), et les espèces prairiales (traits continus). Le colza est très exigeant en S au cours de son développement ($\sim 40 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de S) contrairement aux espèces prairiales ($\sim 20 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). (Oenema et Postma; 2003, tiré de Abrol et Ahmad; 2003).

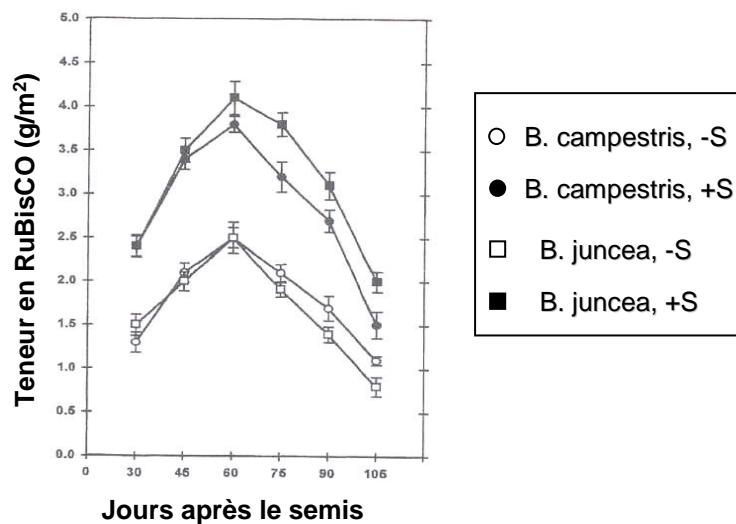


Figure 16: Evolution de la teneur en RuBisCO dans les feuilles de *Brassica juncea* (carrés) et *Brassica campestris* (cercles) cultivés en présence (+S, symboles noirs) ou absence de sulfate (-S, symboles blancs). Les barres indiquent les erreurs standards ($n = 9$). En réponse à une privation en sulfate, la quantité de RuBisCO par unité de surface diminue et ce quelque soit le génotype (d'après Ahmad et Abdin, 2000).

D.3 Effets physiologiques d'une carence en soufre

D.3.1 Sur la photosynthèse

Les deux stratégies adoptées lors d'une carence en soufre sont la stimulation des systèmes d'absorption et le contrôle des flux de soufre dans l'assimilation réductrice (Marayuma-Nakashita *et al.*, 2003). Le soufre est un élément très présent dans le chloroplaste et il entre dans la composition de la ferredoxine, la thioredoxine, la sulfate réductase, la nitrite réductase et de certaines protéines de la chaîne de transfert des électrons localisée dans la membrane des thylakoides. Celle-ci est constituée pour 5% d'un sulfolipide qui lui confère une très grande fluidité et favorise les réactions photochimiques de la photosynthèse. Cependant, la majeure partie du soufre chloroplastique est contenue dans la ribulose 1.5 bis phosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCo ; Figure 16) dont la synthèse est réduite par une carence en S. La carence en soufre se manifeste notamment par une chlorose, en engendrant une inhibition de la photosynthèse dans toutes les feuilles, particulièrement les plus jeunes accentuée par une baisse de la teneur en chlorophylles (symptôme de chlorose, Figure 17) (Dietz, 1989 ; Gilbert *et al.*, 1997 ; Ahmed et Abdin, 2000b ; Zhao *et al.*, 2001). L'intensité de cette inhibition est principalement due à la dégradation de métabolites soufrés secondaires dont les sulfolipides (Marayuma-Nakashita *et al.*, 2003 ; Hirai *et al.*, 2003), à la perte du photosystème II et à une baisse de la teneur en chlorophylle et en Rubisco. Chez *Arabidopsis thaliana* ou *Clostridium reinhardtii*, la réduction importante de la photosynthèse serait due à la perte du photosystème II. En effet, le statut redox et les teneurs en glutathion (GSH) et en thiorédoxine interviennent dans la lutte contre les stress oxydatifs et dans le contrôle de la synthèse d'une protéine du photosystème II (Giordano *et al.*, 2000 ; Hirai *et al.*, 2003). Lors de la carence, la perturbation de ce statut entraîne la génération d'espèces réactives de l'oxygène responsables de dommages oxydatifs (Marayuma-Nakashita *et al.*, 2003) et conduit à la destruction du photosystème II (May *et al.*, 1998). Chez le blé, cette baisse de la photosynthèse s'accompagne d'une baisse de la teneur en chlorophylle et surtout d'une baisse de l'activité de la Rubisco qui correspond à la dégradation et à la diminution de la synthèse de cette enzyme (Gilbert *et al.*, 1997). Les jeunes feuilles de colza sont atteintes de chlorose et présentent une diminution de l'activité photosynthétique (Abrol et Ahmad, 2003). Plus tardivement dans le développement, les feuilles passent au vert pâle au jaune pâle puis au rouge, pour devenir enfin violettes en réponse à la production de flavonoïdes de type anthocyanines.

D.3.2 Sur la synthèse des composés carbonés

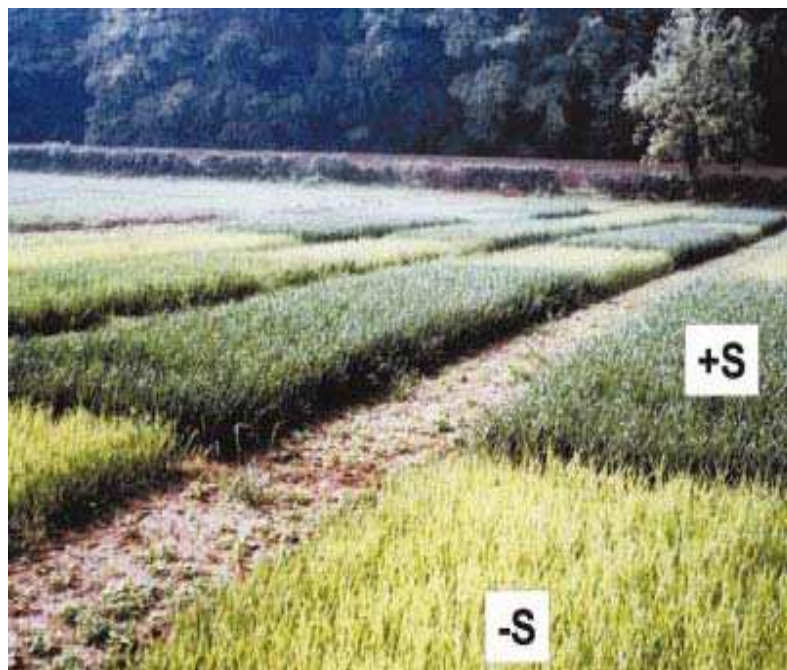


Figure 17 : Symptômes de la déficience en soufre chez le blé sur une culture aux champs. (Zhao *et al.*, 2001).

En général, la carence en soufre engendre des modifications importantes de l'activité des enzymes clé des métabolismes de l'azote, du soufre et du carbone. La synthèse des acides aminés dépend de la disponibilité en squelettes carbonés produit lors de la photosynthèse. Afin d'assurer l'équilibre entre la croissance et le développement, la répartition du carbone entre la synthèse des acides aminés et la synthèse des sucres est régulée par un système modulant de façon synchrone les activités de la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEP carboxylase) et de la sucrose phosphate synthase (SPS) (Foyer *et al.*, 2001). Chez *Dunaliella salina*, l'activité de l'ATP sulfurylase est multipliée par 4 tandis que celle de la nitrate réductase est divisée par 4 et celle de la PEP carboxylase par 11. La synthèse d'une isoforme spécifique de cette dernière est également induite (Giordano *et al.*, 2000). Du plus, l'augmentation de la teneur en ammonium dans les cellules limitées en soufre est beaucoup plus forte que celle des acides aminés. Cette accumulation de nitrate et d'ammonium suggère que les cellules manquent de squelette carbonés pour la synthèse des acides aminés. L'inhibition de l'activité PEP carboxylase aurait pour but d'empêcher l'allocation du carbone réduit à la synthèse des acides aminés

Chez *Arabidopsis thaliana*, l'expression du gène de l'UDP-glucose pyrophosphorylase est inhibée par la carence en soufre tandis que l'expression des gènes de la sous-unité C de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, une enzyme de la glycolyse, et de la fructose biphosphate aldolase, une enzyme de la néoglucogénèse, est induite. Ceci laisse suggérer que la synthèse de saccharose est inhibée alors que la glycolyse est induite pour générer de l'énergie (Hirai *et al.*, 2003).

En conclusion, la carence en sulfate engendrerait une réorientation du métabolisme du C vers une production d'énergie (*via* l'inhibition de la synthèse de saccharose et d'amidon, l'induction de la glycolyse et de certaines réactions du cycle de Krebs). Selon Nikiforova *et al.*, (2005), cette réorientation du métabolisme C permettrait à la plante de survivre et éventuellement de produire des graines. Une accumulation de malate associée à une baisse des teneurs en SO_4^{2-} vacuolaire est observée et à même été proposée comme indicateur de carence en S (perte de rendement probable pour un ratio malate/sulfate > 1,5) par Blake-Kalff *et al.*, (2002) chez le colza cultivé au champ, en réponse à une fertilisation limitée en sulfate. Toutefois cette accumulation de malate n'est pas une caractéristique retrouvée par les études métaboliques menées plus récemment *in vitro* chez *Arabidopsis* (Nikiforova *et al.*, 2005 et 2006).

D.3.3 Sur l'absorption et transport de l'azote

La première réponse à la privation en soufre chez l'épinard ou l'orge est une diminution de l'absorption et de la translocation du nitrate (Karmoker *et al.*, 1991 ; Clarkson *et al.*, 1989 ; Prosser *et al.*, 2001). Pour les deux espèces, la baisse de l'absorption nette du nitrate est suivie ou est concomitante d'une augmentation de la capacité d'absorption du sulfate tandis que l'absorption du phosphate n'est pas affectée. Cette baisse de l'absorption nette du nitrate est due à une baisse de l'influx et à une augmentation de l'efflux.

Chez l'orge, l'utilisation de ^{15}N a permis de montrer que le transfert du nitrate et de l'ammonium vers les parties aériennes est très altéré (Clarkson *et al.*, 1989). En effet, chez cette espèce, la privation en soufre engendre une diminution importante de la conductance hydraulique des racines, de la conductivité stomatique et de la transpiration (Karmoker *et al.*, 1991). Ces changements dont la cause n'a pas été trouvée feraient intervenir l'acide abscissique. Ils sont associés à une augmentation de la teneur en asparagine et en glutamine dans les racines (Clarkson *et al.*, 1989). Il a été proposé que l'accumulation d'amides dans les racines, certainement due à la baisse du flux d'eau, moteur du transfert xylémique, réprime l'influx de nitrate (Karmoker *et al.*, 1991 ; Clarkson *et al.*, 1989).

D.3.4 Sur les enzymes d'assimilation de l'azote, la synthèse des acides aminés et des protéines

Chez les espèces étudiées, dont l'épinard (Prosser *et al.*, 2001), le tabac (Migge *et al.*, 2000) ou l'algue *Dunaliella salina* (Giordano *et al.*, 2000), l'activité de la nitrate réductase (NR) ne varie pas de la même façon lors de la carence en soufre. Chez l'épinard, l'activité de la NR diminue dans les jeunes feuilles parallèlement à la baisse de la teneur en transcrits NR qui est elle-même proportionnelle à la baisse en ARNm total. La carence en soufre n'aurait pas d'effet direct spécifique ni au niveau transcriptionnel ni au niveau traductionnel (Prosser *et al.*, 2001). Chez le tabac soumis à une carence prolongée en soufre, la diminution de la teneur en transcrits NR est beaucoup plus importante que la diminution de la teneur en ARNm d'autres enzymes telles que la GS plastidiale ou de la sous unité β de l'ATP synthase mitochondriale qui diminuent de façon proportionnelle à la teneur en ARNm total. La privation en sulfate aurait un effet inhibiteur sur l'activité NR via une répression de la transcription. Cette inhibition pourrait être engendrée par l'accumulation des produits d'assimilation de l'azote tels que l'ammonium ou les acides aminés (Migge *et al.*, 2000). L'activité de la NR reste positivement contrôlée par la photosynthèse, elle même fortement inhibée par une carence en soufre, et plus

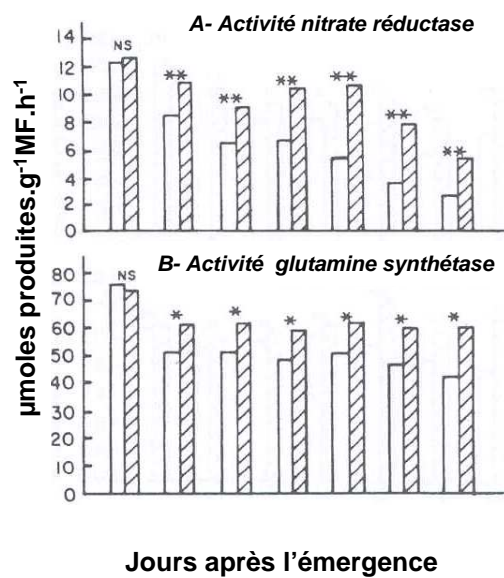


Figure 18 : Effets de la privation en S sur l'activité de la NR **(A)** et de la GS **(B)** dans les limbes foliaires de maïs en conditions de privation (histogramme blanc) ou non (histogramme hachuré) en soufre à différentes dates après l'émergence. * et ** indiquent une différence significative entre traitements soit une probabilité égale à 0,05 et 0,01 respectivement. NS : non significatif. (D'après Friedrich & Schrader, 1978)

spécifiquement à l'échelle transcriptionnelle et post traductionnelle par la disponibilité en squelettes carbonés .

Chez le colza, une carence en S provoque une inhibition de l'absorption du NO_3^- et une répression de l'activité de la NR (Kopriva et Rennenberg 2004). En outre, Kopriva et Rennenberg (2004) suggèrent qu'en situation de carence S, les plantes sont capables de synthétiser des isoformes protéiques pauvres en acides aminés soufrés. Des travaux menés chez *Arabidopsis thaliana* conduits par des approches métabolomiques (Figure 18) montrent que le métabolisme N est fortement affecté par une carence en sulfate et aboutit (i) à une accumulation de nitrate, de sérine, de tryptophane et d'OAS et (ii) à une diminution des teneurs en cystéine (Nikiforova *et al.*, 2005). La cystéine, produit final de l'assimilation réductrice du S résultant de l'incorporation du sulfide (S^{2-}) à l'OAS, apparaît comme le point de convergence des métabolismes N et S (Figure 10). La chute de la teneur en cystéine en réponse à une carence en S aura des répercussions sur les deux types de métabolismes. De plus, selon Kopriva et Rennenberg (2004), l'OAS agirait comme un régulateur transcriptionnel intervenant dans le contrôle du transport et de l'assimilation du SO_4^{2-} . Ainsi, en conditions limitantes en S, l'accumulation de l'OAS exercerait un contrôle positif sur la capacité d'absorption du SO_4^{2-} et l'expression de gènes codant l'APR, l'OAS-TL ou encodant la SAT.

Comme pour le soufre, la majorité de l'azote organique des plantes se trouve sous forme d'acides aminés et de protéines. Lors de la carence en soufre, le contenu en azote total de la plante diminue. Par exemple, il est divisé par deux dans l'ensemble des feuilles d'épinards cultivés sur un milieu dépourvu de soufre pendant deux semaines (Prosser *et al.*, 2001). En effet, la teneur en protéines diminue considérablement notamment dans les jeunes feuilles. La teneur en acides nucléiques diminue également (Prosser *et al.*, 2001 ; Dietz, 1989). La majorité des protéines végétales contiennent des acides aminés soufrés. Lors d'une carence en soufre, la teneur en cystéine et en méthionine diminue et la plante ne peut pas assurer le renouvellement du contenu en protéines. La synthèse de certaines protéines va donc être stimulée au détriment d'autres protéines, telle que la Rubisco, qui vont être dégradées.

Suite à la carence en S, l'accumulation très rapide de glutamine et d'asparagine a été observée dans les racines d'orge, avant une diminution de la croissance ou de la synthèse de protéines (Karmoker *et al.*, 1991). Chez les espèces étudiées, la glutamine et l'asparagine sont les deux acides aminés dont la teneur augmente le plus lors de la carence en soufre. Il apparaît que les acides aminés accumulés, lors d'une expérience de carence en soufre sur des cellules de *Nicotiana tabacum*, sont issus d'une synthèse de

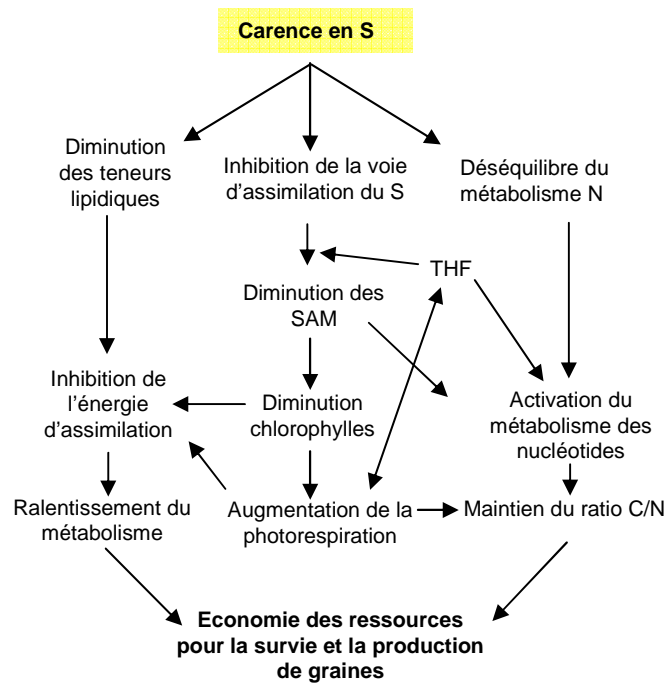


Figure 19 : Schéma résumant les modifications conduisant à une réorientation du métabolisme chez *Arabidopsis thaliana*, d'après Nikiforova *et al.* (2005). SAM : composé contenant du S, THF : tétrahydrofurane.

novo (Klapheck *et al.*, 1982). Chez l'épinard, les acides aminés sont répartis en trois groupes. Un groupe constitué par l'alanine, la méthionine, l'acide glutamique et la thréonine n'est pas affecté, tandis que la teneur de tous les autres acides aminés augmente, et particulièrement le groupe constitué par l'arginine, l'histidine, la leucine et la lysine. Ces acides aminés, sauf la leucine, portent plusieurs groupements azotés et pourraient être synthétisés pour stocker l'azote (Dietz, 1989). L'oxaloacétate, qui dérive du cycle des acides tricarboxyliques, est le précurseur de la méthionine et de l'aspartate. La forte augmentation de la concentration en asparagine pourrait être en partie expliquée par la réorientation du carbone et de l'azote non utilisé pour la synthèse de méthionine (Migge *et al.*, 2000).

D.3.4 sur le métabolisme soufré

Une diminution de la disponibilité en SO_4^{2-} du sol provoque une baisse des teneurs en SO_4^{2-} dans les racines, une augmentation de l'expression des gènes codant les transporteurs de SO_4^{2-} (notamment du groupe 1, Tableau II) ainsi qu'une chute des teneurs en lipides (Figure 19). De plus, chez *Arabidopsis thaliana* carencé en S, la production de flavonoïdes de type anthocyanines augmente et conduit à la couleur rouge/violette des feuilles (Nikiforova *et al.*, 2003). Parallèlement, ces travaux ont mis en évidence une forte augmentation de l'expression d'un gène codant un homologue de l'isoflavonoïde réductase (X 28), enzyme intervenant dans la synthèse des flavonoïdes. Il a donc été proposé d'utiliser ce gène comme indicateur moléculaire de la perception de la carence en S par la plante. De plus la diminution de la teneur en S-adénosyl-méthionine (SAM), un composé notamment impliqué dans les étapes finales de la synthèse des chlorophylles, entraîne une baisse de la photosynthèse d'une part et provoque une activation du métabolisme des nucléotides d'autre part (Figure 19).

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

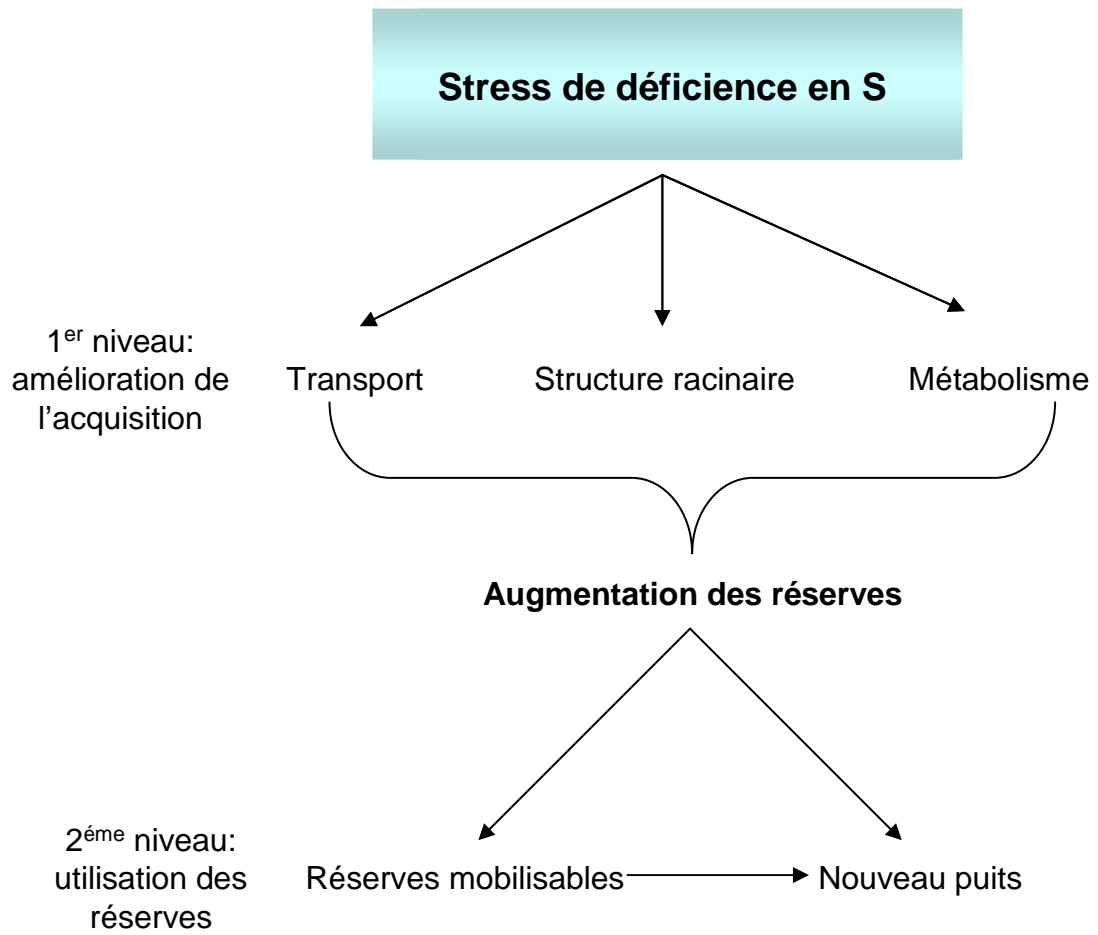


Figure 20 : Les deux stratégies d'amélioration de l'utilisation du S proposée par Hawkesford (2000)

E. Stratégies d'amélioration de l'Efficiencia d'Utilisation du Soufre

Au stade végétatif, la vitesse relative de croissance (Relative Growth rate ; RGR) observée chez les plantes limitées en S, en comparaison avec des plantes bien alimentées, détermine essentiellement l'EUS. Au stade reproducteur, ce dernier est principalement estimé à partir des composantes de rendement : indice de récolte en S (IRS) et production, teneurs en huile et en protéines des graines (Balint et Rengel, 2009). Ces derniers ont ainsi montré chez 12 génotypes de colza une variabilité génétique importante de l'EUS, soulignant ainsi l'importance de l'amélioration variétale pour l'optimisation de l'EUS.

Cependant, parmi les stratégies d'amélioration de l'EUS envisagées, Hawkesford (2000) a proposé deux pistes principales, qui seront ensuite développées au sein de cette partie :

- **La première stratégie vise à améliorer l'acquisition du sulfate** *via* (i) des modifications architecturales au niveau racinaire, (ii) des régulations transcriptionnelles et (iii) des modifications métaboliques (Figure 20).

- **La deuxième stratégie consiste à optimiser l'utilisation des réserves S** par un contrôle de i) la force puits et ii) de la mobilisation des réserves au sein des organes sources (elle-même étroitement liée au niveau de disponibilité en N ; Figure 20).

E.1. par l'optimisation du prélèvement du soufre minéral

E.1.1 via le contrôle de l'expression des transporteurs de sulfate

Des transporteurs à forte affinité pour le sulfate (K_m voisins du μM , Smith *et al.*, 1995, 1997) impliqués dans l'absorption ont été caractérisés chez le colza (Buchner *et al.*, 2004b). C'est donc vers une optimisation de leur expression et non de leurs activités (déjà optimale pour de faibles concentrations en sulfate) que les recherches se portent depuis la dernière décennie (Hawkesford, 2000 ; Katoaka *et al.*, 2004 ; Saito, 2004). L'expression des transcrits codant ces transporteurs est régulée au niveau transcriptionnel par le niveau de disponibilité en S (Takahashi *et al.*, 1997 ; Hawkesford, 2000 ; Leustek *et al.*, 2000 ; Saito, 2000 ; Hesse *et al.*, 2004).

En réponse à un stress nutritionnel soufré, le colza semble donc potentiellement capable d'améliorer la gestion de ces ressources *via* l'optimisation du prélèvement du sulfate.

E.1.2 via une modification architecturale des racines

Chez le colza, une croissance racinaire insuffisante limite la zone de prospection du sol pour les ressources en S, ce qui augmenterait les risques de symptômes précoces de carence en S en période automno-hivernale. Une voie d'amélioration possible consisterait alors à contrôler la structure racinaire et sa prolifération (Hawkesford, 2000, Figure 20). Toutefois, le sulfate, tout comme le nitrate, est un composé soluble très mobile dans la solution du sol. L'accroissement de la biomasse racinaire pourrait alors permettre une colonisation de zones potentiellement plus riches en cas d'hétérogénéité du sol en S et pourrait constituer une bonne voie d'amélioration de l'EUS.

E.1.3 via des modifications métaboliques

L'OAS est un régulateur positif de l'expression des gènes codant les transporteurs de sulfate et les enzymes de l'assimilation végétale dont la teneur augmente en situation limitante en S et diminue en situation limitante en N (Kim *et al.*, 1999 ; Hawkesford, 2000 ; Leustek *et al.*, 2000 ; Saito, 2000). L'absorption du sulfate est également liée à la disponibilité de cet anion dans le sol, à la demande en S des organes en croissance et également à la fourniture des squelettes C/N. L'acquisition du S atmosphérique (SO₂ et H₂S, De Kok, 2005) est aussi possible, mais dans le contexte actuel de diminution du S atmosphérique, il est cependant peu raisonnable d'envisager une amélioration de cette voie d'assimilation subsidiaire.

Compte tenu du fait que l'expression des gènes codant les transporteurs de sulfate est très fortement augmentée en cas de limitation en S, modifier ou stimuler le métabolisme S pour utiliser efficacement le sulfate en optimisant les processus de mobilisation du S des tissus sources vers les tissus puits constitue alors une voie particulièrement intéressante pour améliorer l'EUS.

E.2. Par l'optimisation de l'utilisation des réserves soufrées endogènes

E.2.1. via le contrôle de la demande en S

Hawkesford (2000) a suggéré une deuxième stratégie qui vise à augmenter la demande en S en faisant exprimer par les tissus puits de plantes transformées des

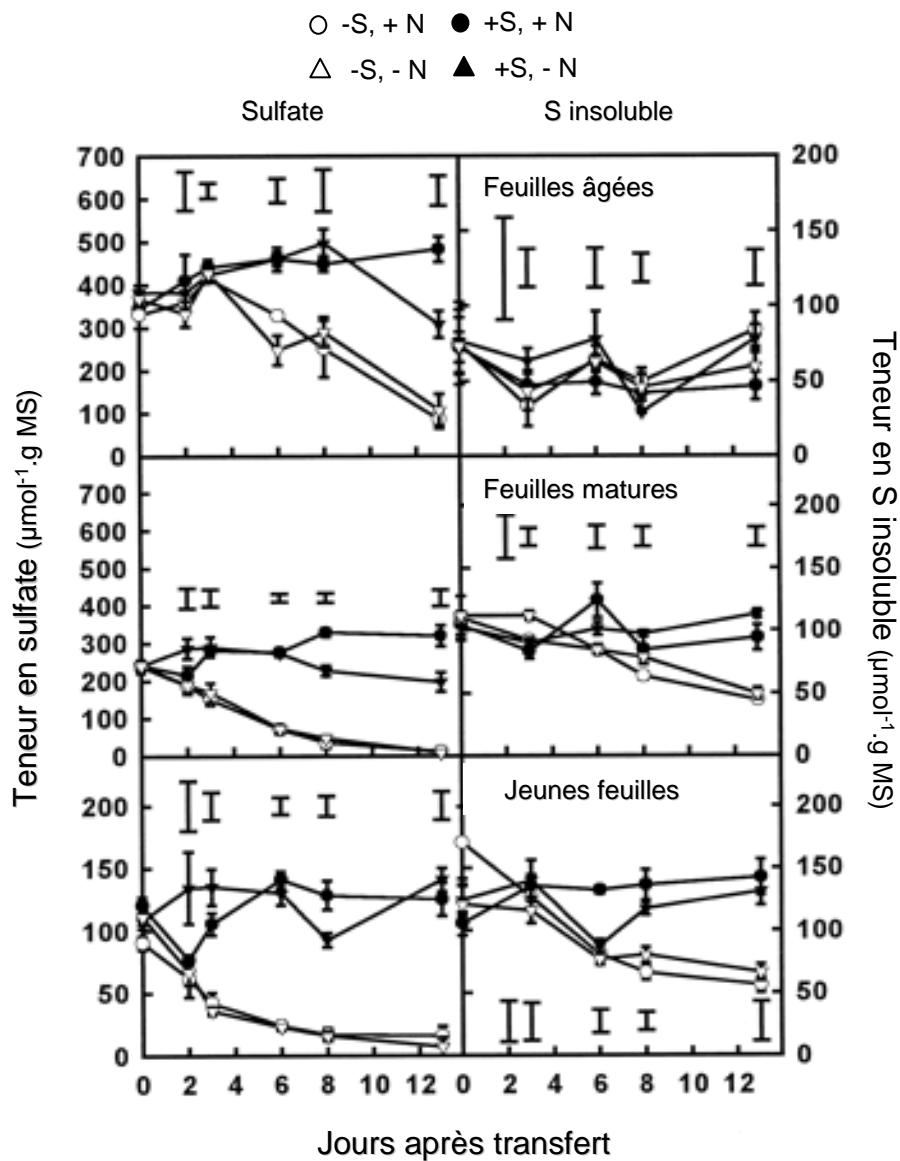


Figure 21 : Evaluation des teneurs en sulfate et S insoluble (essentiellement protéique) dans les feuilles âgées, matures et jeunes de plantes de colza cultivées en présence de 4 traitements: Absence en SO_4^{2-} et 7 mM NO_3^- (-S,+N), 1 mM SO_4^{2-} et 7 mM NO_3^- (+S,+N), Absence en SO_4^{2-} et 0.25 mM NO_3^- (-S,-N) et 1 mM SO_4^{2-} et 0.25 mM NO_3^- (+S,-N) (d'après Blake – Kalff et al., 1998).

protéines à forte teneur en S (Figure 20). Il s'agit d'une stratégie également favorable à l'amélioration de la qualité nutritionnelle des produits récoltés. Cette possibilité a été testée par une équipe de chercheurs australiens (Hagan *et al.*,) en 2003 en réalisant la construction d'un riz transgénique exprimant au sein des grains de riz un gène codant une protéine riche en S (SSA pour Sunflower seed Albumin). Les résultats se sont révélés décevants puisque les teneurs en S des grains n'ont pas été augmentées.

La faible EUS du colza au stade reproducteur (Balint et Rengel, 2009) pourrait également être améliorée par l'optimisation de l'utilisation des réserves accumulées aussi bien au stade végétatif qu'au stade reproducteur.

E.2.2 via une mobilisation accrue des réserves soufrées

Une meilleure compréhension des processus de mobilisation des réserves S au sein de la plante au cours de son cycle de culture apparaît alors comme étant un préalable indispensable à l'optimisation de la gestion du S. La limitation des processus de remobilisation du S, en particulier l'apparente séquestration des réserves S vacuolaires sont à examiner. Le faible EUS engendre un retour au sol conséquent qui pourrait s'expliquer par un défaut de vidage en S des feuilles du colza. Une ablation de la moitié des feuilles de colza au stade végétatif provoque une diminution de la biomasse des siliques de 30% (Noquet *et al.*, 2004), confirmant ainsi l'importance de la remobilisation des éléments issus de ces organes.

En ce qui concerne le soufre, les principaux composés qui pourraient être mobilisés seraient le sulfate potentiellement largement accumulé (Figure 21), les acides aminés et des peptides soufrés comme le glutathion ou bien les protéines foliaires potentiellement largement dégradées durant la sénescence. Considérée inefficace chez le colza, la remobilisation endogène du sulfate ne suffirait pas à couvrir les besoins en S des jeunes feuilles, organes présentant les premiers symptômes de chlorose (Blake-Kalff *et al.*, 1998). Cette conclusion est toutefois surprenante si l'on considère d'une part l'accumulation de sulfate dans les feuilles et d'autre part, la plasticité potentielle de cette accumulation comme l'illustre la figure 20. En conséquence, le S protéique des feuilles matures peut être mobilisé afin de compléter les besoins en S des organes en croissance. Cependant, la baisse des teneurs en protéines consécutive à une carence en S est relativement tardive et elle est uniquement observée, de façon surprenante, dans les feuilles matures ou en cours de maturation (Figure 21). Comparativement aux plantes de colza seulement carencées en S, des limitations en S et N sur une courte période (14

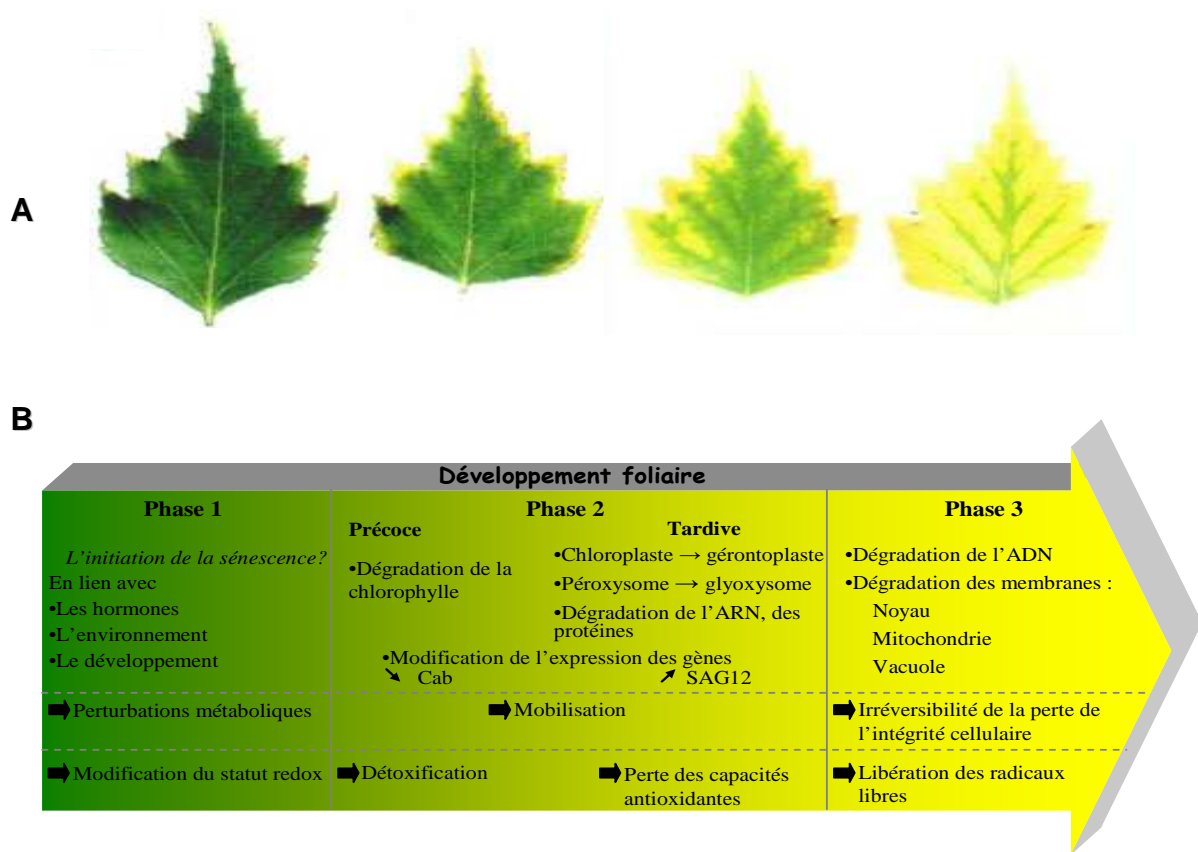


Figure 22: (A) Progression de la sénescence au niveau d'une feuille. Les tissus proches des nervures sont touchés plus tardivement que les autres (d'après Gan et Amasino, 1997). (B) Différentes phases de la sénescence foliaire et leurs caractéristiques (d'après Zimmermann et Zentgraf, 2005).

jours) ne semblent pas modifier le taux de mobilisation du S endogène (SO_4^{2-} et S-protéique, (Figure 21). Chez d'autres espèces, en revanche, il a été montré que le taux de mobilisation du S pouvait varier en fonction du niveau d'alimentation en N minéral (Sunarpi et Anderson, 1997b).

En ce qui concerne l'azote, il est actuellement largement évoqué que la valorisation médiocre de l'élément N serait liée à une mauvaise remobilisation du N foliaire au cours du processus de sénescence séquentielle intervenant lors du stade végétatif (Malagoli *et al.*, 2005a). La sénescence marque le stade ultime de développement foliaire et se caractérise au niveau macroscopique par un jaunissement de la feuille.

La sénescence est un processus génétiquement contrôlé, résultant de la succession d'évènements biochimiques et physiologiques coordonnés au niveau cellulaire et tissulaire qui conduisent à la mort de la plante ou d'un organe de la plante. Différents types de sénescence sont distingués : foliaire, florale, associée aux fruits. Dans le cadre de cette thèse, la brève analyse bibliographique qui va suivre sera centrée sur la sénescence foliaire qui marque l'étape ultime du développement de la feuille. Au cours de la sénescence, les feuilles s'engagent dans un processus de dégradation massive de leurs macromolécules (lipides, glucides, acides nucléiques, protéines). Les éléments issus de ces dégradations (C, N, S, P...) sont ensuite redistribués (phénomène qualifié de remobilisation) vers les organes en croissance (jeunes feuilles, graines) (Gan et Amasino, 1997). Au niveau macroscopique, la sénescence foliaire se caractérise par le jaunissement (résultant de la dégradation des chlorophylles) et aboutit au dessèchement complet et au final à l'abscission de la feuille. De profondes modifications sont observées au niveau tissulaire, cellulaire, métabolique et génétique (Smart, 1994). Les cellules du mésophylle sont les premières touchées par ce processus alors que les tissus vasculaires sont touchés plus tardivement (Figure 22 A ; Gan et Amasino, 1997). En effet, les tissus proches des nervures seraient préservés dans le but d'assurer le transport des éléments issus de la dégradation.

Au niveau cellulaire, les phénomènes de sénescence se manifestent dans un ordre très précis. Les différentes phases du processus de sénescence foliaire et leurs caractéristiques sont résumées dans la Figure 22B (Zimmermann et Zentgraf, 2005) : **une phase** d'initiation de la sénescence pouvant être modulée par différents facteurs externes (nutrition, lumière, sécheresse) suivie d'une phase où la dégradation des chlorophylles

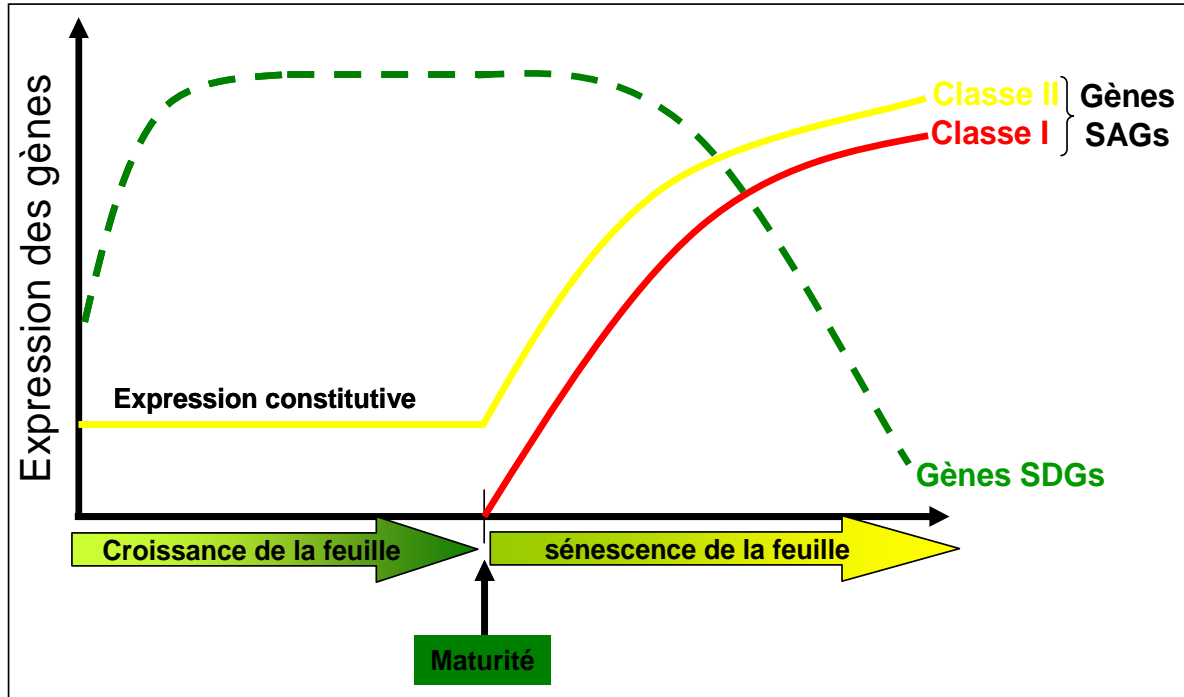


Figure 23: Schéma de l'expression différentielle des gènes SAGs et SDGs durant le développement de la feuille. SDGs : *Senescence Down-regulated Genes*. SAGs : *Senescence Associated Genes*. Les SAGs se décomposent en deux classes : classe I et classe II. (D'après Gan et Amasino, 1997).

constitue le premier symptôme visuel de sénescence ; enfin elle s'achève par la dégradation tardive de l'ADN, et la désorganisation des mitochondries et du noyau.

A l'échelle moléculaire, le processus de sénescence foliaire est associé à de profondes modifications de l'expression des gènes du génome nucléaire. Le **noyau**, requis pour la transcription des gènes nécessaires à la mise en place de la sénescence (par exemple ceux codant des protéases, des RNases, des glutamines synthétases...), est un des derniers constituants cellulaires à être dégradé. Les ARN sont rapidement dégradés alors que l'ADN nucléaire reste intact. Plusieurs méthodes de criblage ont été utilisées afin d'identifier les gènes activés ou réprimés au cours de la sénescence. La création d'une banque d'ADNc issue de feuilles sénescentses d'*Arabidopsis thaliana* a permis d'isoler 2491 gènes induits (Guo *et al.*, 2004). Toutefois, un système de classification basé sur l'expression différentielle des gènes au cours de la sénescence a été élaboré (Buchanan-Wollaston et Ainsworth, 1997). Parmi ces groupes, il existe les *Senescence Down-regulated Genes* (SDG's) qui se caractérisent par une diminution de leur expression au fur et à mesure que la sénescence progresse (Figure 23). Parallèlement, certains gènes appelés *Senescence Associated Genes* (SAG's) induits pendant le processus de sénescence, sont répartis en deux classes (Figure 23) : les **SAGs de la classe 1** regroupant les gènes qui ne sont exprimés qu'au cours de la sénescence, **et les SAGs de la classe 2** réunissant les gènes dont les transcrits sont détectables dès les premiers stades du développement (expression constitutive) mais augmentant lors de la sénescence (Gan et Amasino, 1997).

La majorité des gènes SAGs codent des hydrolases telles que des RNases, des DNases, des protéases (ex : SAG12, une protéase à cystéine), ou des phospholipases (ex : SAG 101) permettant la dégradation des macromolécules. D'autres gènes codent des facteurs de transcription potentiellement impliqués dans les cascades de signalisation de la mise en place de la sénescence (ex : WRKY 6). Cependant, la fonction d'une grande proportion de ces gènes (31%) n'a pas encore été étudiée (Guo *et al.*, 2004).

Finalement, il apparaît que l'impact d'une carence en S sur la sénescence foliaire n'est que peu connu, alors que ce processus est à même de permettre la remobilisation d'un certain nombre d'éléments susceptibles de contribuer à maintenir, en situation de contrainte, la croissance des tissus les plus jeunes.

F. Objectifs de recherche

L'ensemble de cette analyse bibliographique, permet d'émettre un certain nombre d'hypothèses qui ont motivé nos démarches expérimentales. Parmi celles-ci :

-Il apparaissait nécessaire d'évaluer à l'échelle de la plante entière l'impact d'une restriction de la nutrition soufrée sur le potentiel de remobilisation des différents organes, en déterminant lesquels devenaient alors prioritaires pour l'allocation du S. Nous avons donc entrepris cette démarche en utilisant un double marquage isotopique ^{15}N et ^{34}S , technique qui pour la dernière n'est maîtrisée que par relativement peu d'Unités de recherche. A cette approche isotopique était couplée une démarche plus analytique visant à déterminer quels composés soufrés sont les plus mobilisables et les plus importants quantitativement, ainsi que des analyses moléculaires relatives aux transporteurs racinaires et xylémiques du sulfate. L'ensemble a permis d'identifier quelques indicateurs de l'état de nutrition soufrée du végétal.

- En appliquant des situations de carence en S plus contrastées, nous avons cherché à obtenir des plantes présentant des niveaux de réserves en S potentiellement variables afin de déterminer si leur disponibilité initiale était susceptible d'affecter le taux de croissance de la plante dans des situations d'alimentation en S contrastées. A ces approches isotopiques, ce sont ajoutées des analyses plus détaillées des différents transporteurs de soufre du nitrate, ainsi que de certains indicateurs moléculaires de la progression de la sénescence foliaire.

- Enfin, les résultats acquis progressivement nous ont conduit à collaborer dans le cadre d'une expérimentation en condition de plein champ (réseau d'exploitations agricoles), afin d'utiliser un certain nombre d'indicateurs de la nutrition soufrée identifiés préalablement afin de déterminer s'il était possible d'identifier des facteurs de risque d'apparition de carence en S. Cette démarche nous a par ailleurs permis de confronter un certain nombre de données acquises en conditions contrôlées afin de vérifier leur pertinence en conditions réelles. Ces derniers travaux, n'étant pas totalement finalisés, ne sont pas intégrés dans le manuscrit de thèse mais font l'objet d'une publication en cours de soumission.

CHAPITRE I

Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetative growth of Brassica napus L.

M. ABDALLAH ¹; L. DUBOUSSET ¹; F. MEURIOT ^{1,2}; P. ETIENNE ¹; J-C. AVICE ¹; A. OURRY ¹

¹ Univ Caen, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N, C, S (EVA), INRA, F-14032 Caen, FRANCE

² Corresponding author: F. MEURIOT
Phone (33) 231 565 166
Fax : (33) 231 565 360
Email: frederic.meuriot @ unicaen.fr

Number of figures : 7

Résumé

Le colza est particulièrement sensible à une limitation en soufre (S) en raison de sa forte demande pour cet élément. Toutefois, les effets physiologiques d'une limitation en S restent peu connus, en particulier au cours du stade rosette. Dès lors, une étude a été menée afin de déterminer les effets de la limitation en S minéral sur l'absorption et la remobilisation de l'azote (N) et du S au cours de la croissance végétative du colza à l'échelle de la plante entière et à celle des feuilles pour des plantes cultivées pendant 35 jours avec 300 μM de $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ (plantes témoins; + S) ou avec 15 μM de $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ (plantes limitées; -S).

Les résultats mettent en évidence que les plantes limitées en S n'ont montré aucune différence significative de production de biomasse (plante entière ou feuilles) ou d'absorption de N, par rapport aux plantes témoins. Toutefois, le S total et le contenu en ^{34}S (*i.e.* dérivant du S absorbé) ont été considérablement réduits dans la plante entière et les feuilles après 35 jours, et une plus grande redistribution du ^{32}S endogène des feuilles vers les racines a été observée. L'expression relative des transporteurs de sulfate tonoplastiques et plasmalemmiques a été également fortement induite dans les racines.

En conclusion, même si les plantes limitées en S avaient été alimentées avec 20 fois moins de $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ que les plantes témoins, leur développement est resté étonnamment stable. Sous l'effet d'une limitation en S, le colza est en mesure de recycler ses composés S endogènes (principalement le sulfate) des feuilles vers les racines. Cependant, cette adaptation physiologique ne peut être efficace que sur une courte échelle de temps (*i.e.* lors de la croissance végétative).

Mots-clés: Marquage ^{15}N , marquage ^{34}S , limitation soufrée, transporteurs S, sulfate.

Abstract

Because it has a high demand for sulphur (S), oilseed rape is particularly sensitive to S limitation. However, the physiological effects of S limitation remain unclear, especially during the rosette stage of the plant. As a consequence, we studied the effects of mineral S limitation on N and S uptake and remobilization during vegetative growth of oilseed rape at both whole plant and leaf rank level for plants grown during 35 days with 300 μM $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ (control plants; +S) or with 15 μM $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ (S limited plants; -S).

Our results highlight that S limited plants showed no significant differences either in whole plant and leaf biomass, or on N uptake, when compared to control plants. However, total S and ^{34}S (*i.e.* deriving from S uptake) contents were greatly reduced for whole plant and leaf after 35 days, and a greater redistribution of endogenous S from leaves to the benefit of roots was observed. The relative expression of tonoplast and plasmalemma sulphate transporters was also strongly induced in the roots.

In conclusion, although S limited plants had 20 times less mineral S than control plants, their development remained surprisingly unchanged. During S limitation, oilseed rape is able to recycle endogenous S compounds (mostly sulphate) from leaves to roots. However, this physiological adaptation may be effective only over a short time scale (*i.e.* vegetative growth).

Key Words: ^{15}N labelling, ^{34}S labelling, Sulphur limitation, S transporter, sulphate

Introduction

Winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) has become a plant of major agro-economic importance with 47 millions tons yielded worldwide in 2007 (FAO) and has a wide range of uses (oil production, animal feeding, alternative fuel, etc). Moreover, winter oilseed rape is also considered as an excellent rotation crop for cereals as it enhances suppression of soil-borne pathogens either by the release of biocidal compounds or by improvements in subsoil macroporosity caused by its deep taprooting system (Kirkegaard *et al.*, 1997). As for other large cropping systems, its intensive culture requires important amounts of N, S, P and K fertilizers. Amongst these fertilizers, nitrogen (N) plays a major role. Even if oilseed rape is characterized by a high capacity of N uptake (Lainé *et al.*, 1993), which makes it suitable as a catch crop species to limit N leaching in the aquifer during the autumn-winter season, oilseed rape requires large amounts of N. Therefore, high N availability is strongly correlated to high yield and seed quality. For example, depending on site conditions, the optimum seed yield occurs in the range of 180 to 220 kg N ha⁻¹ (Jackson, 2000). The main effects of increasing N status in oil seed rape have been shown to increase leaf number and area (Gammelvind *et al.*, 1996; Leleu *et al.*, 2000; Svecnjak and Rengel, 2006), leaf chlorophyll content (Ogunlela *et al.*, 1989) and pod number and area (Gammelvind *et al.*, 1996; Hocking *et al.*, 1997; Leleu *et al.*, 2000).

Sulphur (S) is also an essential element for plant growth because it is present in major metabolic compounds like amino-acids (methionine and cysteine), glutathione, proteins or sulfo-lipids. However, sulphur availability has been decreasing in many areas of Europe during the last two decades (Schnug, 1991; McGrath *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1999). Oilseed rape, as with most brassicaceae, has greater S requirements than other large-crop species such as wheat or maize. For example, the production of one ton of rape seeds requires about 16 kg of S (McGrath and Zhao, 1996; Blake-Kalff *et al.*, 2001), compared with 2-3 kg for each ton of grain in wheat (Zhao *et al.*, 1999).

Therefore, oilseed rape is particularly sensitive to S deficiency or limitation, which reduces both seed quality (Asare and Scarisbrick 1995, De Pascale *et al.*, 2008) and yield by about 40% (Scherer, 2001). Such S deficiencies can be the result of a combination of processes. S-containing fertilizers such as superphosphate have been superseded by fertilizers containing little or no S (Zhao *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1999), while a massive decrease of S inputs from atmospheric deposition has been recorded during the last three decades. Moreover, it can also be suggested that the S requirements of many crops have

increased as a result of intensive agriculture and optimization during plant breeding programs.

Sulphur requirement and metabolism in plants are closely related to N nutrition (Reuveny *et al.*, 1980), and N metabolism is also strongly affected by the S status of the plant (Janzen and Bettany, 1984; Duke and Reisenauer, 1986). A deficiency in S supply has been shown to depress the uptake of nitrate and the activity of nitrate reductase in maize and spinach (Friedrich and Schrader, 1978; Prosser *et al.*, 2001), and to result in transient or steady-state nitrate accumulation in maize, wheat and oilseed rape (Dietz, 1989; Gilbert *et al.*, 1997; McGrath and Zhao, 1996). Fismes *et al.*, (2000) have shown using field grown oilseed rape that sulphur deficiency can reduce nitrogen use efficiency (NUE: ratio of harvested N to N fertilization) and that nitrogen deficiency can also reduce sulphur use efficiency (SUE).

During the fall-winter period, oilseed rape is in a vegetative stage, with the shoot present as a rosette of leaves (*i.e.* rosette stage). During this early development, leaves represent a major store of nutrients which can be remobilized from old to younger leaves or from senescing leaves to early reproductive tissues as shown more specifically for N (Malagoli *et al.*, 2005a). Therefore, the leaves appearing during the rosette stage play a crucial role for seed filling and contribute to the maintenance of grain yield. For example, because of a reduced N uptake occurring after flowering (Malagoli *et al.*, 2004), nearly 75 % of N content in reproductive tissues of oilseed rape is derived from N mobilization occurring mostly from leaves and stems (Malagoli *et al.*, 2005b). Noquet *et al.* (2004) reported that removal of 50 % of the leaves present at the end of the rosette stage resulted in a 30% decrease in seed yield in oilseed rape. Initiation and dynamics of foliar senescence depends on leaf age but can also be modulated by different biotic or abiotic factors (Weaver *et al.*, 1998; Noh and Amasino, 1999; He and Gan, 2002; Pourtau *et al.*, 2004). For instance, environmental factors such as mineral N limitation (Gombert *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007) or drought conditions (Thomas and Stoddart, 1980) may accelerate the initiation of leaf senescence and lead to many sub cellular changes, including an increase in protease activities (Matile 1982) which could be the result of disappearance of protease inhibitors in older leaves (Desclos *et al.*, 2008). In leaves, senescence may result in the mobilization of more than 70% of leaf proteins with a preferential proteolysis of plastidial proteins such as Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase oxygenase (Rubisco) (Srivalli *et al.*, 2001). In *Brassica oleracea* L. (broccoli), 44% of the total proteolytic activities of senescent tissues were dependent on cysteine and serine proteases (Coupe *et al.*, 2003).

Developing leaves are the first ones to show symptoms of S deficiency (Blake-Kalff *et al.*, 1998). In the later stages of oilseed rape development, sulphur deficiency can slow growth and fewer leaves. Young leaves can become chlorotic and have reduced photosynthetic activity. Ahmed and Abdin (2000) demonstrated that high S fertilization increases Rubisco, chlorophyll, and protein contents in fully expanded upper leaves of *Brassica juncea* L. (mustard) and *Brassica campestris* L., which implies a better photosynthetic activity in comparison with plants grown without S. Rubisco contains 120 cysteines and 168 methionines per molecule (Miziorko and Lorimer, 1988). Therefore, Rubisco seems to be an obvious target for mobilization when S amino acid synthesis is restricted by S deficiency (Ahmed and Abdin, 2000). Whilst any decrease of Rubisco affects the photosynthesis rate, the decline of chlorophyll also contributes to the breakdown of photosynthesis when S is deficient. Chlorophyll degradation has been observed by Blake-Kalff *et al.*, (1998) in oilseed rape particularly in the youngest leaves of plants grown on nutrient solution containing minus S and high N, but not in leaves of plants grown on minus S and low N. They also observed that when sulphate is removed from the nutrient solution, glutathione concentration decreased rapidly in the middle and youngest leaves. The uptake and subsequent distribution of sulphate to the leaves is closely regulated in response to demand (Blake-Kalff *et al.*, 1998). For instance, developing leaves are strong S sinks, but show a net loss of S after full expansion (Sunarpi and Anderson, 1996).

Because the appearance of S deficiency is fairly recent in European agriculture, research on crop S nutrition still lags far behind than that on other major nutrients like N. For instance, the way plants cope with reduced N availability through increased senescence of older leaves, which induce proteolysis leading to increased N remobilization to sink tissues has been described in many plant species. However, the physiological effects of S limitation are less clear at the plant level. As a consequence, the objective of the present study was to examine the effects of mineral S limitation in oilseed rape on N and S uptake and remobilization during vegetative growth at both whole plant and leaf rank levels, using simultaneous ^{34}S and ^{15}N labelling, in order to determine how plants compensate for a reduced S availability.

Materials and Methods

Hydroponic Experiment

Seeds of oilseed rape (*Brassica napus* L. cv. Capitol) were sterilized by exposure to 80% ethanol for 30 s followed by 20% sodium hydrochlorite for 20 min. After several

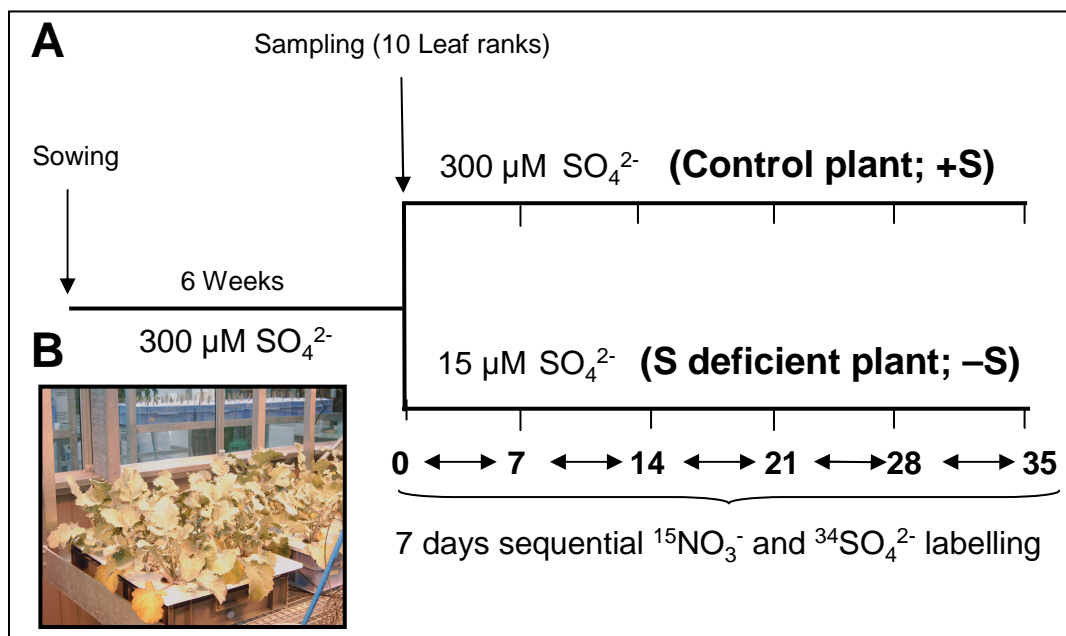


Figure 24: (A) Cultural conditions and experimental design used to provide two contrasting levels of S nutrition. Six weeks before the start of the experiment (*i.e.* Day 0), the plants were grown on optimal S solution (300 $\mu\text{M SO}_4^{2-}$). On Day 0 and after subsequent sampling, half the plants were supplied with 300 $\mu\text{M SO}_4^{2-}$ (control plant; +S) and half with 15 $\mu\text{M SO}_4^{2-}$ (S limited plants; -S) with sequential double labelling during the 7 days preceding each harvest (B) Inset shows a picture of oilseed rape plants growing in aerated hydroponic solution in the greenhouse.

washes in demineralized water, seeds were placed on moist filter paper in plastic tanks under dark conditions for two days. Just after first leaf emergence, seedlings were transferred to hydroponic solution (18 seedlings per 12 L-plastic tank) in a greenhouse with a thermoperiod of 20°C (day) and 18°C (night). Natural light was supplemented with phytol lamps (450 $\mu\text{moles m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ of photosynthetically-active radiation (PAR) at canopy height) for 16h. The basic nutrient solution contained 0.40 mM KH_2PO_4 , 0.15 mM K_2HPO_4 , 2 mM KCL, 3.0 mM CaCl_2 , 0.20 mM Fe Na EDTA, 14 μM H_3BO_3 , 5 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.7 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0.7 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.1 μM CoCl_2 . This basic nutrient solution was renewed weekly and supplemented twice a week with KNO_3 and MgSO_4 to a concentration of 1mM and 300 μM respectively (Figure 24), in order to be in optimal S conditions for growth for non-vernalized rosette plants. After 6 weeks, the plants were transferred to 4 L plastic pots (one plant per pot), and were then divided into two groups for the application of two contrasting levels of mineral S.

Application of S treatments and tissue sampling

Half the plants (Control plants; +S) were supplied with 300 μM SO_4^{2-} and the remaining plants (S limited plants; -S) with twenty fold less S (15 μM SO_4^{2-}). Mineral S treatments were applied during 35 days with 1 mM KNO_3 (Figure 1) and nutrient solution was renewed every week. Seven days before each harvest, plants were supplied with a labelled nutrient solution containing, $^{15}\text{NO}_3^-$ (2,5% atom excess) and $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ (1% atom excess). Four plants (*i.e.* replicates) of both sets (control and S limited plants) were harvested at day 0 and after 7, 14, 21, 28 and 35 days of treatment. Whole root system, stem, leaf blades (LB) and leaf petioles were separated and weighed for determination of their fresh matter. Leaves were separated based on the date of their ontogenic appearance (defined as the leaf rank number). The leaf rank number was ordered from the oldest to the youngest leaves (*i.e.* from base to canopy). For each leaf, the leaf-greenness content was measured using a SPAD-502 (Minolta, Tokyo, Japan) apparatus (Rossato *et al.*, 2001), and leaf area was determined with a LI-COR 300 area meter (LI-COR, Inc. Lincoln, Nebraska, USA). Leaves as well as other plant tissues were frozen in liquid N_2 and stored at -80°C until further IRMS, biochemical and molecular analysis.

Preparation of ^{34}S :

Elemental S enriched in ^{34}S (98 % atom excess) was obtained from Trace Sciences international, France. A digestion procedure using 16.5 N HNO_3 was used to convert

elemental S to sulphate (Zhao *et al.*, 1996). Briefly, 100 mg of elemental S were weighed into a Pyrex digestion tube. Ten mL of HNO₃ were then added. Digestion was carried out in a programmable heating bloc with temperature slowly rising up to 200°C, and then kept at this temperature for 2h. The tube was then cooled and the solution (called S1) was conserved. The remaining elemental S in the tube was washed with demineralized water and the washing solution was pooled with the previous solution (S1). These operations were repeated a second time. The different solutions were then recovered and K₂CO₃ was added.

The remaining solution was transferred to a 100-mL volumetric flask. Analysis of nitrate and sulphate concentrations in this stock solution was carried out using ion chromatography (Dionex DX100, CA USA, with conductivity detector). The eluent consisted of 1.8 mM Na₂CO₃ and 1.7 mM Na₂HCO₃, and was pumped isocratically over an AS17 guard column. The analysis of the stock solution presented a final recovery of about 82 % of ³⁴SO₄²⁻ and both nitrate and sulphate concentrations were taken into account during plants N and S treatments.

Determination of total N and S content

An aliquot of each plant organ (roots, stems, leaf blade and leaf petioles) was freeze-dried, weighed for dry matter (DW) determination, ground to a fine powder, and placed into tin capsules for isotopic analysis. The total N (¹⁴N, ¹⁵N) and S contents (³²S, ³⁴S) in plant samples were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, United Kingdom) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy):

Total N (N_{tot}) content in a tissue “i” at a given time “t” was calculated as:

$$N_{tot\ i,t} = \%N_{i,t} \times DW_{i,t} / 100$$

Natural ¹⁵N abundance (0.3663 % ± 0.0004) of atmospheric N₂ was used as a reference for ¹⁵N analysis. Nitrogen derived from current N uptake (N_{upt}) in a given organ was calculated as follows:

$$N_{upt} = N_{tot} \times (E (\%) / ES (\%))$$

Where, E (%) is the atom % ¹⁵N excess in a given organ

And, ES is the nutrient solution atom % ¹⁵N excess (2.5%)

As for N, total S (S_{tot}) content in a tissue “i” at a given time “t” was calculated as:

$$\text{Stot}_{i,t} = \%S_{i,t} \times \text{DW}_{i,t}$$

For ^{34}S enrichment, the natural isotope abundance of 4.255% was withdrawn to the value from sample ^{34}S abundance, and sulphur derived from current S uptake (Supt) in a given organ was then calculated as follows:

$$\text{Supt} = \text{Stot} \times (\text{E} (\%) / \text{ES} (\%))$$

Where, E (%) is the atom % ^{34}S excess in a given organ

And, ES is the nutrient solution atom % ^{34}S excess (1%)

Determination of S mobilization and partitioning of S derived from uptake or mobilization within tissues

The mobilized S content (Smob) from or towards each tissue between two dates (*i.e.* Day 35 – Day 0) and presented in fig. 4 was calculated by subtracting the cumulated S derived from uptake between these two dates (Supt) from the change in total S content ($\text{Stot}_{t_2} - \text{Stot}_{t_1}$) according to the following equation:

$$\text{Smob} (t_2-t_1) = (\text{Stot}_{t_2} - \text{Stot}_{t_1}) - \text{Supt}$$

Therefore, positive values of mobilized S represent S that is mobilized to this tissue, while negative values correspond to a net mobilization of S from this tissue. The addition of all values corresponding to mobilized S from tissues (*i.e.* exported) was then considered to represent 100% and the mobilization of S towards the sink tissues (*i.e.* imported) was calculated as a percent of the total S mobilized. The same calculation was carried out for total S taken up

Determination of SO_4^{2-} content

Sulphate was measured by extracting 30 mg of freeze-dried plant material in 1.5 mL of 50% ethanol solution at 40°C for 1h. After centrifugation (20 min; 10 000 g) the supernatant (called S1) was recovered and 1.5 mL of 50% ethanol were added to the pellet. After a new incubation (1h; 40 °C) and centrifugation (20 min; 10 000 g), the remaining supernatant was taken up and added to the previous supernatant (S1). All these operations (*i.e.* incubation and centrifugation) were repeated twice but now with 1.5 mL ultra-pure water and incubation at 95 °C. All super natants were finally pooled then air-dried for 16h without heating. The dry residues containing both nitrate and sulphate were

solubilized in 1 mL of ultra-pure water. Thereafter, nitrate and sulphate concentrations in the extracts were determined by using ion chromatography (Dionex DX100, with conductivity detector). The eluent solution consisted of 1.8 mM Na₂CO₃ and 1.7 mM Na₂HCO₃ and was pumped isocratically over an AS17 guard column.

RNA extraction

Total RNA was extracted from 200 mg of leaf blade fresh matter. Frozen samples were ground to a powder with a pestle in a mortar containing liquid nitrogen. The resulting powder was suspended in 750 µL extraction buffer (0.1 M Tris, 0.1 M LiCl, 0.01 M EDTA, 1% SDS (w/v), pH 8) and 750 µL of hot phenol (80°C, pH 4). This mixture was vortexed for 30 sec. and after addition of 750 µL of chloroform/isoamylalcohol (24:1), the homogenate was centrifuged at 15 000 g (5 min, 4°C). The supernatant was transferred into 4 M LiCl solution (w/v) and incubated overnight at 4°C. After centrifugation (15 000 g, 30 min, 4°C), the pellet was suspended in 250 µL of sterile water. Fifty µL of 3 M sodium acetate (pH 5.6) and 1 mL of 96% ethanol were added to precipitate the total RNA for 1 h at -80°C. After centrifugation (15 000 g, 20 min, 4°C), the pellet was washed with 1 mL of 70% ethanol, then centrifuged at 15 000 g for 5 min at 4°C. The resulting pellet was dried for 5 min at room temperature and re-suspended in sterile water containing 0.1% SDS and 20 mM EDTA. Quantification of total RNA was performed by spectrophotometer at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before Reverse Transcription (RT), and quantitative PCR (Q-PCR) analyses.

RT and Q-PCR analysis of *BnSultr* genes

For RT, 1 µg of total RNA was converted to cDNA with an 'iScript cDNA synthesis kit' according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). For Q-PCR amplification, primers of *BnSultr1* and *BnSultr4* encoding vacuolar sulphate transporters in *Brassica napus* L. were designed from the *BnSultr1;1* sequence (Accession no: AJ416460), the *BoSultr1;2* sequence (Accession no: AJ311388), the *BnSultr4;1* sequence (Accession no: AJ416461), and from the *BoSultr4;2* sequence (Accession no: AJ555124) previously published by Parmar *et al.*, (2007). Q-PCR amplifications were performed by using *BnSultr1;1* forward primer: 5'agatattgcatcgaccag-3' and reverse primer: 5'gaaaacgccagcaaagaaag-3' and *BnSultr1;2* forward primer: 5'ggtgtagtcgctggaatggt-3' and reverse primer: 5' aacggagtgaggaagagcaa-3' and *BnSultr4;1* forward primer: 5'gaccagaccggttaaggtca-3' and reverse primer: 5'ttgaatccatgtgaagcaa-3' and *BnSultr4;2* forward primer: 5' agcaagatcagggattgtgg-3' and reverse primer: 5'

tgcaacattgtgggtgtct-3'. *EF1- α* gene (Accession no: DQ312264), was used as an internal control gene and was amplified using the primers described above. Q-PCR reactions were performed with 4 μ L of 100x diluted cDNA, 500 nM of primers, and 1x SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad) in a ChromoFour System (Bio-Rad). For each pair of primers, a threshold value and PCR efficiency have been determined using a cDNA preparation diluted over 10-fold. For both pairs of primers, PCR efficiency was around 100%. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the presence of the single peak in the melting curves after Q-PCR reactions and by sequencing the Q-PCR product to confirm that the correct amplicons were produced from each pair of primers (Biofidal). In addition, Blastn analysis (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) was performed in order to check the correct amplification of the target cDNA, for the four different sulphate transporters (*BnSultr1* and *BnSultr4* families). For each sample, the subsequent Q-PCR reactions were performed in triplicate and the relative expression of the four different sulphate transporters in each sample was compared to the control sample (corresponding to control plants (+S) at day 0) and was determined with the delta-delta Ct method using the following equation (Livak and Schmittgen, 2001):

$$\text{Relative expression} = 2^{-[\Delta\text{Ct sample} - \Delta\text{Ct control at day 0}]}$$

$$\text{With, } \Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{BnSultr1.1, 1.2, 4.1 or 4.2}} - \text{Ct}_{\text{EF1-}\alpha}$$

where, Ct refers to the threshold cycle determined for each gene in the exponential phase of PCR amplification. Using this analysis method, relative expression of the different sulphate transporter genes in the control sample at day 0 of the experiment were equal to one (Livak and Schmittgen, 2001), and the relative expressions of other treatments were then compared to the control at day 0, on this basis.

Statistical analysis

Results are presented as mean values \pm s.e. for four replicates ($n = 4$). The effects of mineral S were determined by ANOVA method, and according to a comparison of the means (Tukey t-Test), with MINITAB13 on windows (Minitab Inc, State College, PA, USA). When the normality law of data was not respected, the non- parametric test of Kruskal - Wallis was used. Statistical significance was postulated for $P < 0.05$ and different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments.

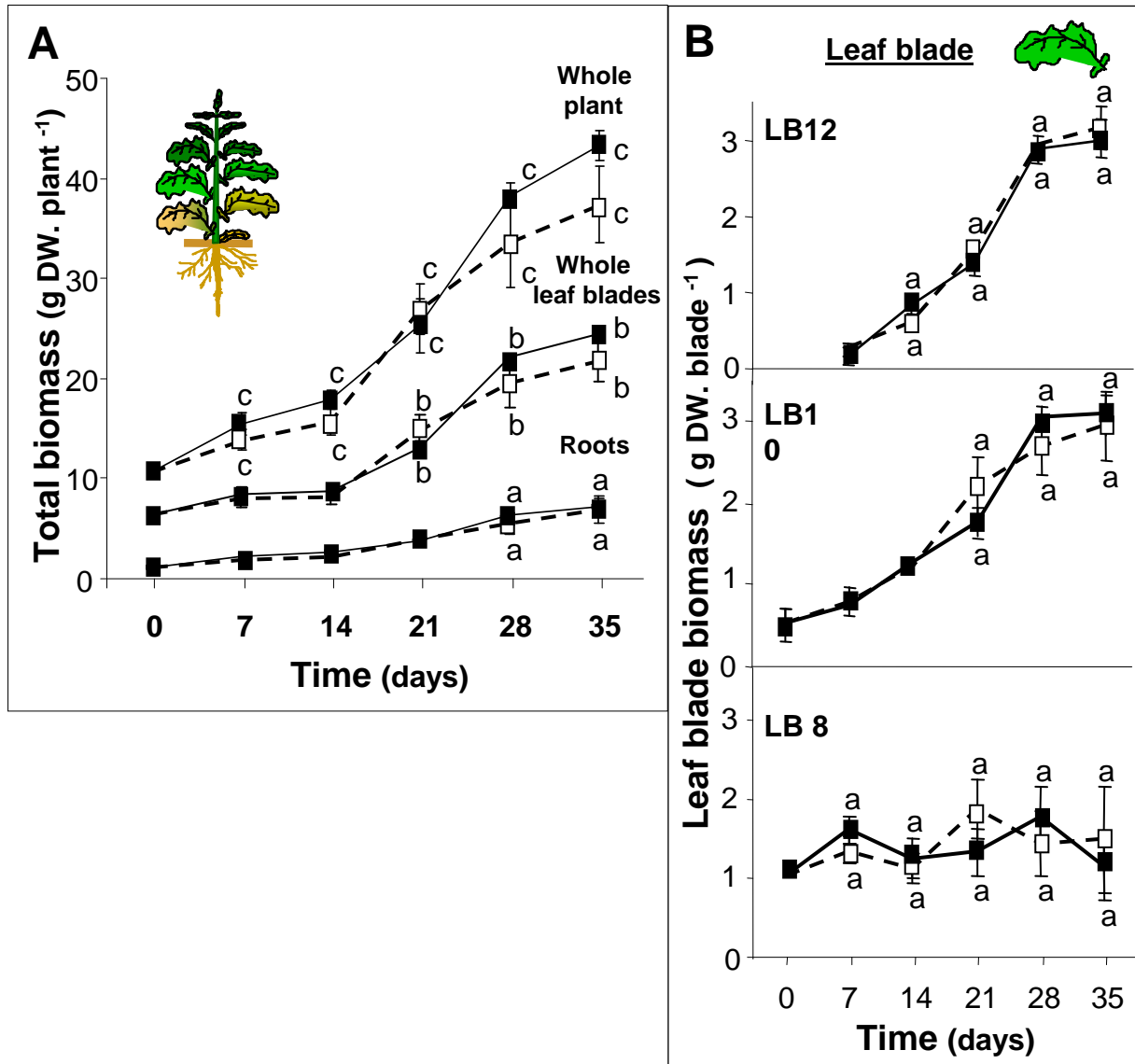


Figure 25: Changes of (A) whole plant, whole leaf-blade and root biomass and (B) leaf-blade (LB) biomass of leaf ranks 8, 10 and 12 of oilseed rape for control plants (+ S; closed symbols) and S limited plants (- S; open symbols) during the 35 days of treatment. Vertical bars indicate \pm s.e. ($n=4$) when larger than the symbol. Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments ($P < 0.05$).

Results

Plant biomass analysis:

Figure 25A presents the influence of sulphur availability on the growth of whole plant, whole leaf blade and root for control plants (+S) and S limited plants (-S). The dynamic of biomass production remained similar in +S and -S plants either for whole plant, whole leaf-blade or roots, where progressive increases were observed for both treatments. For example, at the end of the experiment (*i.e.* day 35), whole plant biomass reached 39 ± 3 g DW. plant⁻¹ for +S and -S plants. At this date, leaf-blade and root biomass represented about 60% and 15% respectively of whole plant biomass.

Leaf-blade (LB) biomass of three different leaf-ranks, corresponding to old, mature and young leaves (*i.e.* LB 8, 10 and 12, respectively) was also monitored in response to S availability (Figure 25B). For control plants (+S), LB 8 biomass increased from day 0 to day 7 and then remained relatively constant until day 35. For both LB 10 and 12, biomass progressively increased until the end of the experiment. No significant difference ($P > 0.072$) was observed in leaf-blade biomass production between mineral S treatments (*i.e.* +S or -S).

N, S and cumulated ¹⁵N and ³⁴S contents:

Whole plant N and ¹⁵N contents (*i.e.* derived from uptake) increased at a constant rate during the experiment and were not affected by S nutrition (Figure 26A). Whole plant N content reached $440 \text{ mg} \pm 10 \text{ mg. plant}^{-1}$ at the end of the experiment for both treatments, with about 50% derived from N uptake (¹⁵N).

Whole plant S and cumulated ³⁴S contents (*i.e.* derived from uptake) are presented in (Figure 26B). For +S plants, whole plant S and ³⁴S contents greatly increased during the experiment. At day 35, S derived from uptake represented about 84% of total S. For -S plants, whole plant S and ³⁴S contents remained relatively constant during the overall experiment. Due to the reduced S availability, not more than 6 ± 2 mg of S were taken up throughout the experiment. As a consequence, the S deriving from uptake was less than 5% of that taken up by control plants.

S partitioning and remobilization:

Figure 27 represents the partitioning of S taken up (determined on the basis of ³⁴S enrichment, see Materials and methods for details) and remobilized S (estimated from the unlabelled endogenous S present on day 0) through the main plant tissues (leaves,

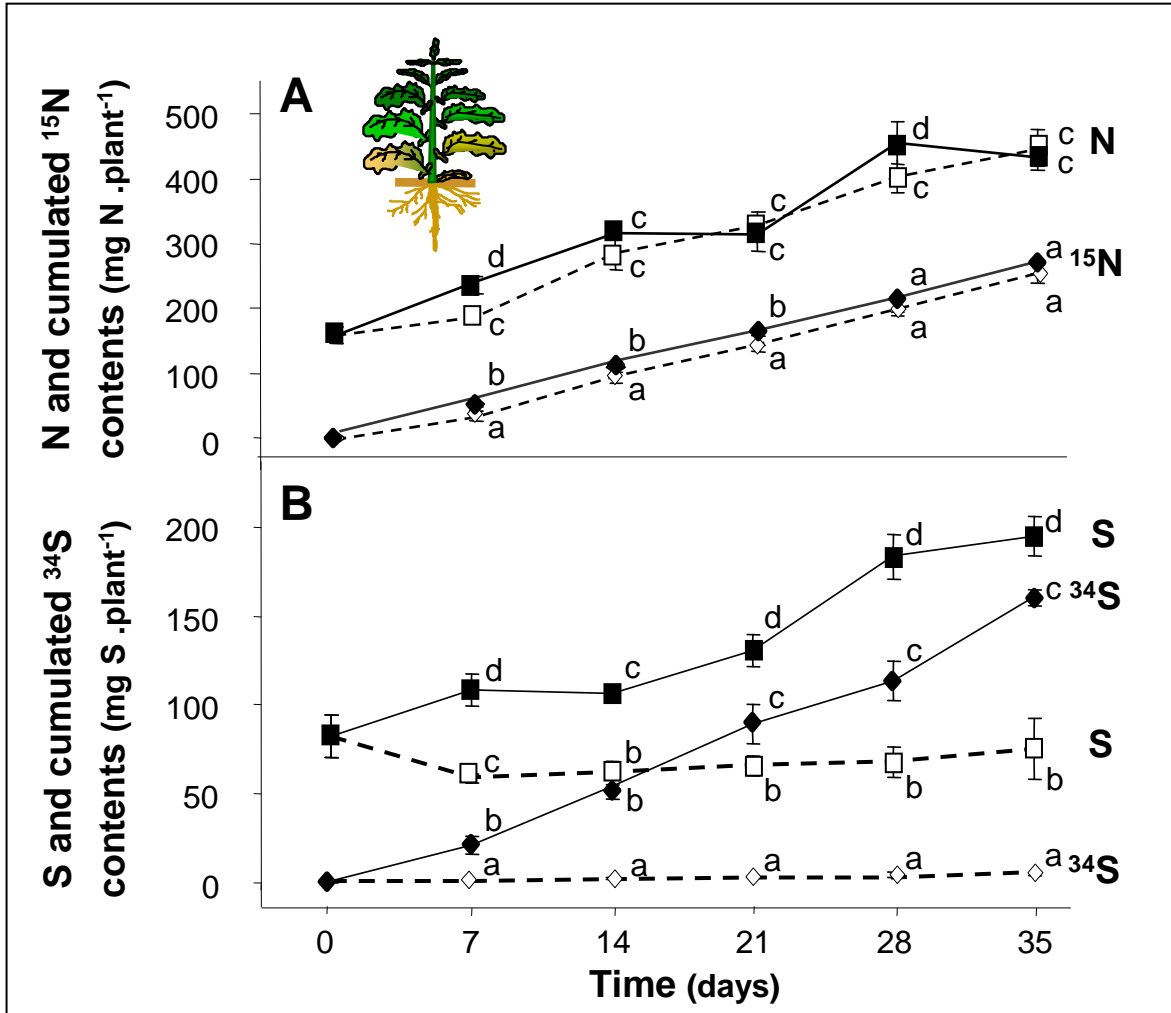


Figure 26: Changes of (A) whole plant N and ^{15}N (i.e. deriving from uptake) and (B) whole plant S and ^{34}S (i.e. deriving from uptake) of oilseed rape for control plants (+ S; closed symbols) and S limited plants (- S; open symbols) during the 35 days of treatments. Vertical bars indicate \pm s.e. ($n=4$) when larger than the symbol. Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments ($P < 0.05$).

petioles, stems and roots) between day 0 and 35. For +S plants (Figure 27A), the S taken up was mostly allocated to the leaves (55%) and to the roots (27%). The limitation of S availability greatly reduced total S uptake (-95%) and changed the ^{34}S partitioning within the different plant tissues (Figure 27B). For -S plants, about 65% of S taken up was found in the roots, whereas less than 23% was found in leaves. The remobilization of endogenous S was also studied. For +S plants (Figure 27A), 26.8 mg of S were remobilized from leaves between day 0 and day 35, and exported mainly to the stem (79%), and to a lesser extent to the roots (13%). The amount of S remobilized from -S plants, was the same as for +S plants ($P > 0.062$) and leaves represented the major source organ (88%) while petioles contributed 12% (Figure 27B). However, reduced S availability strongly modified the partitioning of endogenous S and, unlike for control plants, most remobilized S was supplied to the roots (60%), which, as with ^{34}S uptake, appeared as the main S sink. When compared to control plants, five times more of the remobilized S was partitioning to the roots in -S plants. Despite the roots being such a strong sink in -S plants quantitatively, they had 2 fold less total S than +S plants while having the same dry matter, as seen previously (Figure 25A).

S and cumulated ^{34}S dynamics of leaf-blade (LB) and roots:

Leaf-blade and root S contents were also studied on a kinetic basis in response to S availability (Figure 28A). For +S plants, the S content of LB 8 rapidly increased to 6.6 ± 0.9 mg at day 7 and then decreased to less than 4 mg S. tissue $^{-1}$ thereafter. For LB 10, the S content remained stable from day 0 until day 14 ($P < 0.023$) then increased by about 44% at day 35. For LB 12, the S content was increased by about 28% at day 14 and then continues to increase until the end of the experiment (Figure 28A).

For -S plant, the S content of LB8 and 10 were significantly affected after 7 days of treatment (Figure 28A). They rapidly decreased by 4.2 ± 1 mg and 2.73 ± 0.3 mg from day 0 to 7 respectively, then the S content slowly decreased until day 21 and remained stable thereafter. For LB 12, which appeared during the first week after application of S limitation (*i.e.* at day 7), S content remained stable throughout the experiment ($P < 0.046$; Figure 28A).

The S content in the roots of +S plants increased steadily during 35 days. More surprisingly, but to a lesser extent, root S content also increased during 35 days in -S plants despite a strong S limitation (Figure 28A).

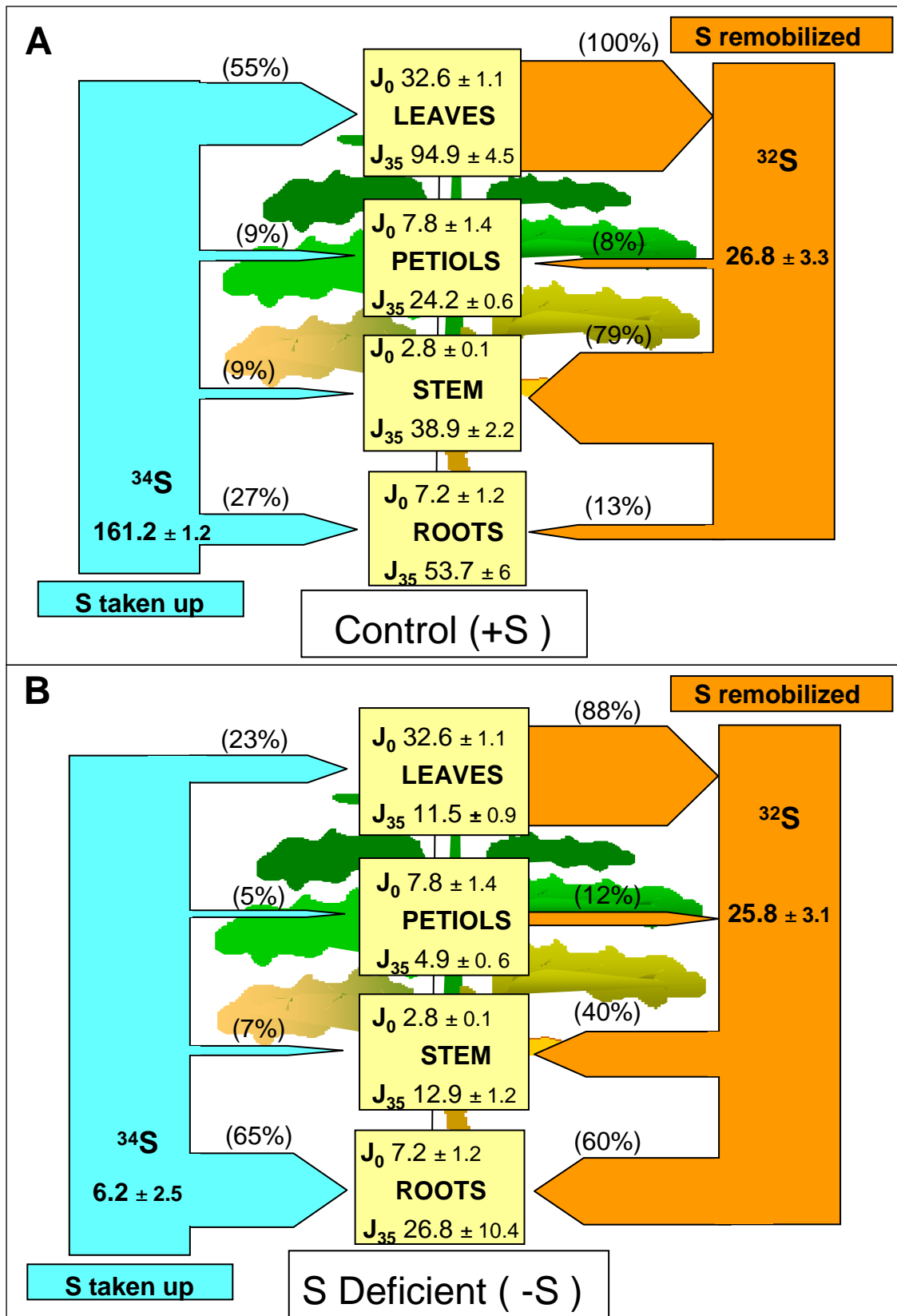


Figure 27: Partitioning (in %) of total S taken up (³⁴S) and total remobilized S (³²S, present on Day 0) in leaves, petioles, stem and roots of oilseed rape for control plants (+ S; **A**) and S limited plants (- S; **B**) between Day 0 and Day 35. Values are given as the mean ± s.e. (*n* = 4). The thickness of the arrows represent the relative importance (in % of the total S taken up or the total mobilized S) of each flux for cumulated total S taken up or total remobilized S (for details, see material and methods section, p12).

Analysis of cumulated ^{34}S content in plant tissues (Figure 28B) showed a steady increase in all plant tissues (roots, leaf-blades 8, 10 and 12) of +S plants, while it remained to a very low level in –S plants.

Remobilization of endogenous S content of leaf blade and roots:

The remobilization of endogenous S from or to different plant tissues is given in Figure 28C. For older leaves (LB 8 and 10), it clearly showed that they act as source tissues, exporting S, whatever the S supply, and with similar contributions. However, S limitation slightly increased ^{32}S remobilization during the first 7 days. In the meantime, younger leaves (LB 12) and roots clearly acted as sink tissues throughout the experiment as their ^{32}S content increased whatever the S supply. However, S limitation decreased the remobilization of S to younger leaves, while greatly increasing it to the roots, which became the main sink tissue. Overall results showed that during S limitation, S remobilization was maintained from older leaves, but it was mostly used by roots instead of being used by young leaves. Nevertheless, the small amount of endogenous S allocated to LB 12 was sufficient and crucial to maintain its growth rate (Figure 25B), especially during its early development (*i.e.* leaf expansion) at the beginning of the experiment.

N / S ratio, N organic / S organic ratio and sulphate contents:

The effect of S availability on N/S ratio was presented in (Figure 29 A). The N/S ratio in S sufficient plants reached about 5 in leaves and about 4 in roots, and then decreased with time for both tissues. When submitted to S limitation, the N/S ratio increased significantly since day 7 in the older leaves (LB8) and (LB10). However, in roots, this ratio was maintained in a much narrower range, reaching about 6 after 35 days of S limitation. When just organic compounds were considered (*i.e.* difference between total N or S and mineral N or S, like nitrate and sulphate, respectively; Figure 29B), the N organic / S organic ratio fluctuated very slightly in roots whatever the S supply, while it was 2 to 3-fold increased in leaves of plants with large S supply, and was slightly decreased with S limitation ($P < 0.038$).

The difference in the change of these ratio (N/S and N organic / S organic) can be fully explained by the fact that nitrate represents a very small proportion of total N, while sulphate was the main form of S, accounting for more than 86% of total S in these tissues. Therefore, sulphate-S contents usually increased in all plant tissues according to their

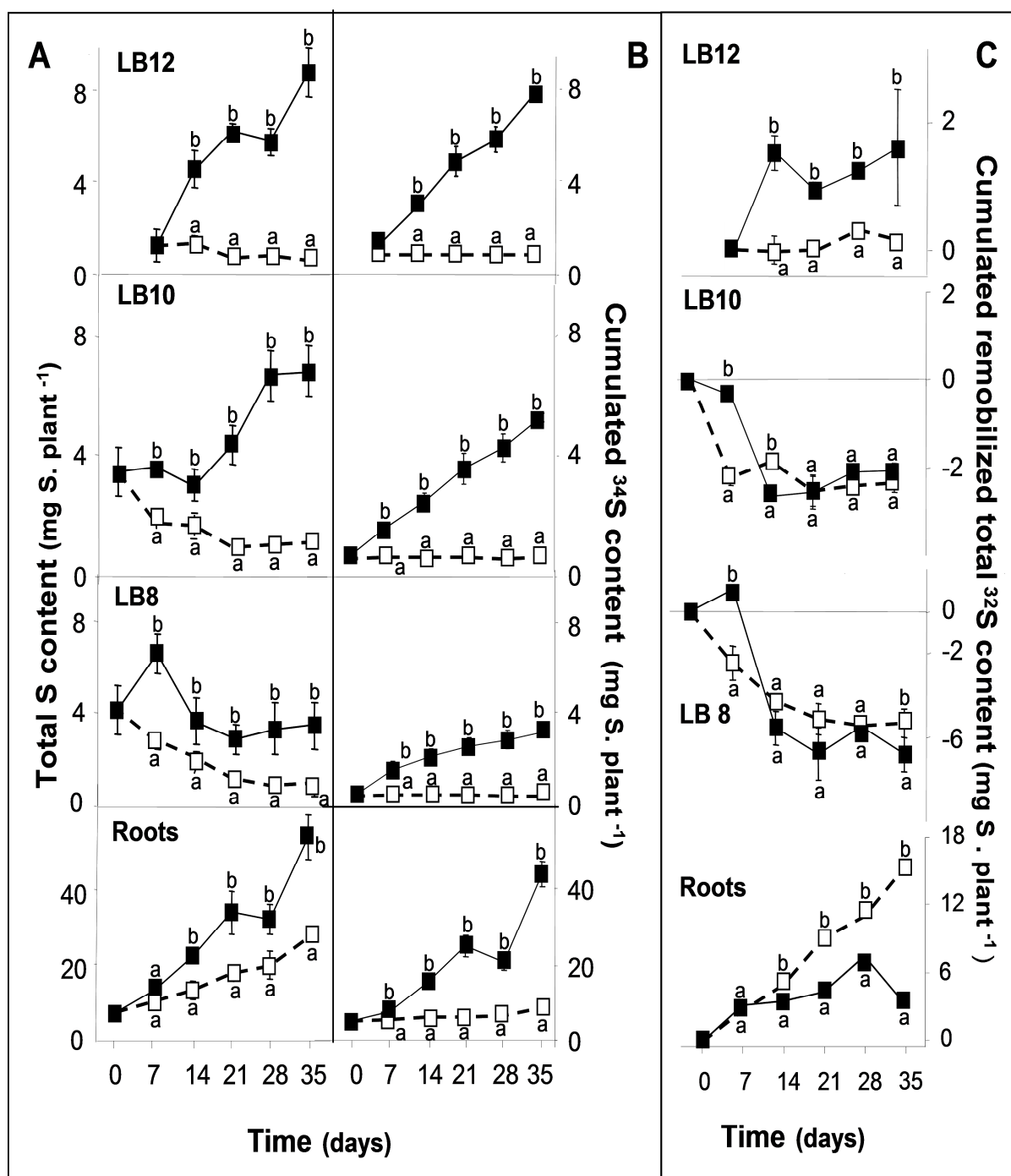


Figure 28: Evolution of (A) total S , (B) cumulated ³⁴S taken up and (C) cumulated remobilized ³²S contents in leaf-blade (LB) of leaf ranks 8, 10, 12 and roots of oilseed rape for control plants (+ S; closed symbols) and S limited plants (- S; open symbols) during 35 days of treatments. Vertical bars indicate ± s.e. (n =4) when larger than the symbol. Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments (P<0.05).

growth rate under sufficient S nutrition, except for older leaves (LB8) for which sulphate contents decreased with time (Figure 29C). Moreover, no sulphate was detected after 3 weeks of S limitation in leaf blades, while about 2 mg of sulphate-S were retained in roots, even after 35 days of treatment. If sulphate concentration is expressed in mg S-sulphate.g⁻¹ DW, it appears that during early leaf-blade development there is an accumulation of sulphate followed by a progressive decline of sulphate content, along with senescence processes. S limitation reduced this content to very low values after 3 weeks in leaf-blades, while in root a steady sulphate content of about 0.5 mg S-SO₄²⁻.g⁻¹ DW was achieved after 14 days.

Relative expression of Sulphate transporters

Figure 30 presents the relative expression of plasmalemma (*BnSultr 1;1* and *BnSultr1;2*) and tonoplast (*BnSultr 4;1* and *BnSultr 4;2*) sulphate transporters in the roots of +S and -S plants. *BnSultr 1;1* was strongly induced in the -S treatment, reaching values of 300 before declining at 35 days. *BnSultr 4;2* was also strongly induced until 35 days. The other two transporters were induced to a lesser extent.

Discussion

Under field conditions, the availability of mineral S for plant growth and development would be mainly dependent upon soil availability, autumn/winter rainfall patterns and atmospheric depositions of SO₂ and H₂S. However, S availability has been decreasing in many areas of Europe during the last three decades (Schnug, 1991; McGrath *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1999). Oilseed rape, as with most brassicaceae, has greater S requirements than other large-crop species such as cereals. Therefore, the main objective of the present study was to examine the influence of S limitation on plant biomass and on the processes of S uptake, distribution and remobilization during vegetative growth of oilseed rape at the rosette stage. In addition, we studied the uptake and allocation of ³⁴S (*i.e.* deriving from recent ³⁴S uptake) and the remobilization of endogenous S (*i.e.* deriving from initial ³²S reserves, present at day 0) in old and maturing leaves, which are considered to export large amounts of S (Parmar *et al.*, 2007) to growing tissues.

According to Hawkesford and De Kok, (2006) in response to a limitation of S availability, the hypothetical initial responses involve optimization of S uptake and utilization of sulphate, accompanied by an increase in remobilization of inorganic S reserves from vegetative tissues and subsequent redistribution towards growing tissues. In the case of transient mineral S limitation perceived at the rosette stage, the present study

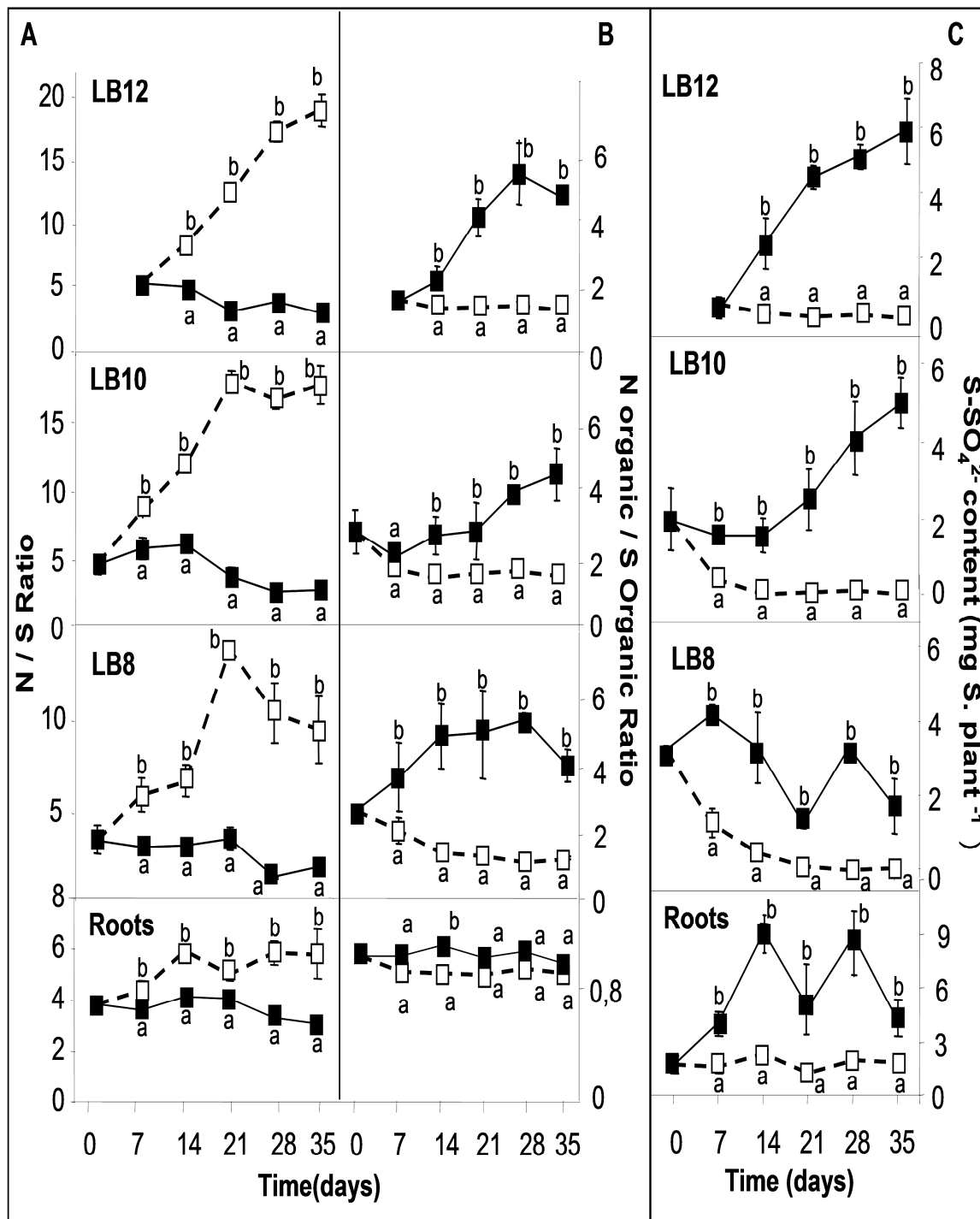


Figure 29: Changes in (A) N/S ratio, (B) N organic / S organic ratio and (C) S-SO₄²⁻ content in leaf-blade (LB) of leaf ranks 8, 10, 12 and roots of oilseed rape for control plants (+ S; closed symbols) and S limited plants (- S; open symbols) during 35 days of treatments. Organic N (or S) is represented by the difference between total N (or S) and nitrate (or sulphate). Vertical bars indicate ± s.e. (n =4) when larger than the symbol. Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments (P<0.05).

revealed that sulphate limitation (15 μM vs 300 μM SO_4^{2-}) applied for 35 days had no significant effect on whole plant, whole leaf-blade or root biomass production (Figure 25A). These results are in agreement with field studies conducted by Zhao *et al.*, (1993) where it was shown that there were no significant differences in dry matter accumulation for two different genotypes (Bienvenu and double low variety Cobra) grown with 0 or 100 kg S. ha⁻¹. Moreover, in *Brassica oleracea*, Koralewska *et al.*, (2007) reported that biomass allocation is not affected by low concentrations of sulphate in the root environment but only by the complete absence of S.

It is generally considered that S availability may influence N use efficiency (NUE) of oilseed rape and *vice-versa* (Schnug *et al.*, 1993; Fismes *et al.*, 2000), indicating that mineral S and N availabilities interact on S and N management by the plant (Janzen and Bettany, 1984; Kopriva and Rennenberg, 2004). At the rosette stage of oilseed rape, however, the present study also revealed that sulphate limitation had no significant effect on plant total N content nor on N uptake (Figure 26A). However, as expected, reduced S availability curtailed S accumulation and uptake in comparison with control plants, which continued to accumulate S as normal. The sulphate limitation treatment started after a period of 51 days during which plants were supplied with optimal levels of sulphate. This period of pre-culture almost certainly resulted in plants with a high initial S status, according to the high initial S-sulphate contents within the leaves which represents the main S source at plant level at Day 0 (and with up to 86% of S as sulphate; data not shown). Therefore it may be hypothesized that the remobilization of endogenous S compounds was sufficiently efficient to maintain the growth of S limited plants at a similar level to the control plants. However, oilseed rape samples collected in field conditions and grown with recommended level of S fertilization (60-80 kg S. ha⁻¹) also revealed quite high sulphur content in leaves (up to 0.97% DW, by comparison with leaves of our experiment with 1.03% DW), of which 75% were in a sulphate form (data not shown). These data suggest that plants used for the present experiment (86% of foliar S as sulphate) were very close in term of S status to plants that are grown in field conditions under a conventional fertilization regime (63-76% of S as sulphate). It also suggests that oilseed rape is able to compensate for a S limitation over a short time scale (*i.e.* in comparison with its whole development cycle) through the fine management of N and S metabolisms. This particular behaviour of oilseed rape to a limitation of S availability should be particularly relevant for the *brassicaceae* (*i.e.* known to be sensitive to S limitation), and will be more clearly assessed in further studies.

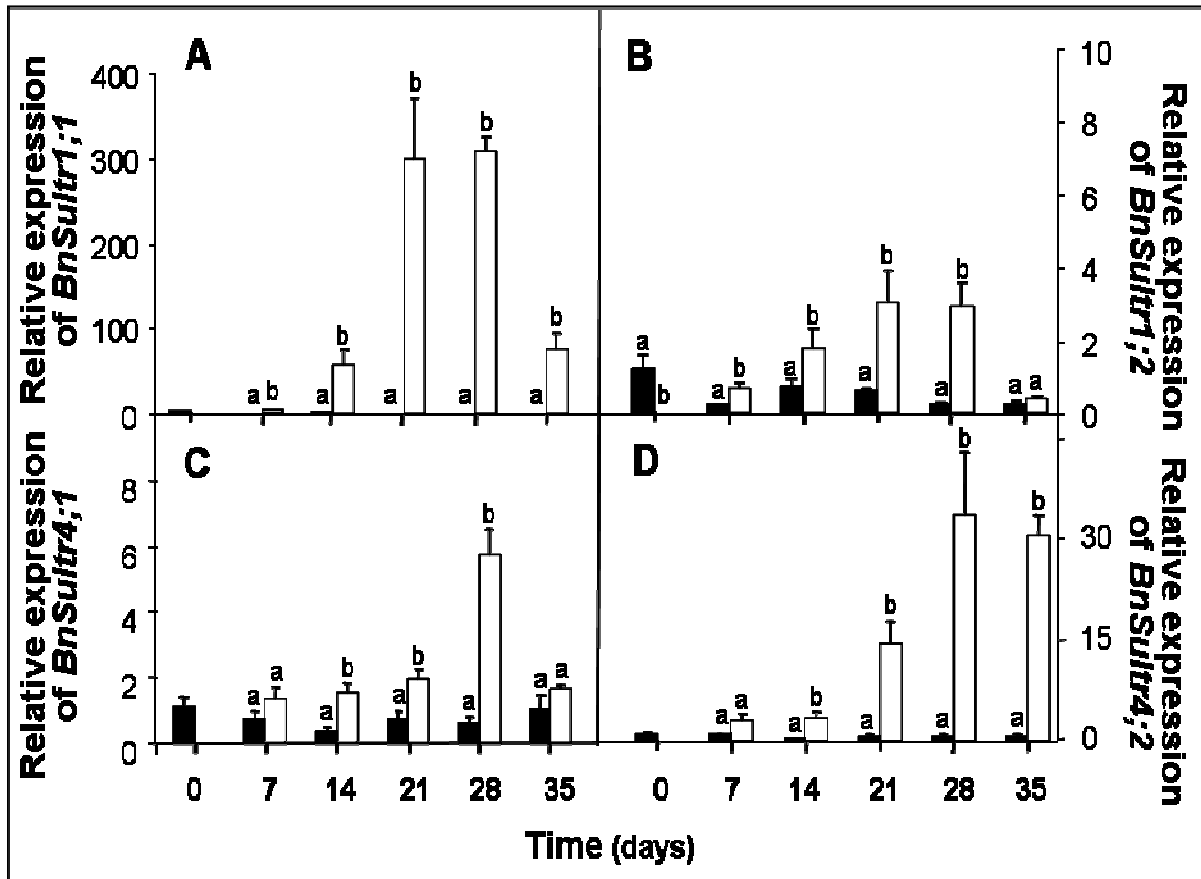


Figure 30: Relative expression of root plasmalemma (A) *BnSultr1.1*, (B) *BnSultr1.2* and tonoplast (C) *BnSultr4.1*, (D) *BnSultr4.2* sulphate transporters in oilseed rape for control plants (+ S; dark bars) and S limited plants (- S; open bars) during 35 days of treatment. Relative expression for each gene is the average \pm s.e. ($n = 4$) of Q-PCR analysis and is expressed relative to the day 0 initial control expression level for that gene. Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments ($P < 0.05$).

For +S plants (Figure 27A), almost 27 mg of ^{32}S were remobilized between day 0 and day 35. Leaves represented the sole export tissue, while the main sink tissues were stem (79%) and root (13%). For –S plants, leaves also represented the major source organ (Figure 27B). However, petioles also contributed a little to the supply of mobilized S to sink tissues. The reduction of S availability also strongly modified the partitioning of mobilized S and unlike for control plants, most of remobilized S was supplied to the root (60%). When compared to control plants, five times more remobilized S was distributed to the root in –S plants. Despite this, quantitatively, roots of -S plants had two fold less total S than roots of +S plants. When remobilization fluxes (Figure 27, 26.8 and 25.8 mg S.plant⁻¹) are compared to the reduction of S-SO₄²⁻ content after 35 days in –S plants (from 19.97±3.07 at day 0 to 7.19±0.71 mg S-SO₄²⁻.plant⁻¹ at day 35), it appears that sulphate alone may account for about 59% of total S remobilization, the rest involving organic S.

According to Kopriva and Rennenberg, (2004), the O-acetyl serine (OAS) may be required for the transduction of the signal involved in the increase in expression of transporters and enzymes involved in SO₄²⁻ uptake and assimilation. Nevertheless, the increase of OAS can be blocked when N is limiting (Kim *et al.*, 1999). Thus, in limiting conditions of S fertilization, the OAS may act as a signal of insufficient sulphide production and would exert a positive control on the expression of genes which encode enzymes of sulphate assimilation like adenosine 5' –phosphosulphate reductase (APR) and on the capacities of SO₄²⁻ uptake (Rouached *et al.*, 2008). Our results are in agreement with these findings because in conditions of S limitation there was a higher expression of both *BnSultr4;1* and *BnSultr4;2* (high affinity sulphate transporters suspected to be implicated in the sulphate uptake by roots; Figure 30), as Maruyama-Nakashita *et al.*, (2004) also reported.

These results also suggest that redistribution of S within the plant took place in response to limited S availability (Figure 27). For +S plants (Figure 27A), the S taken up was mostly allocated to the leaves (55%) and to the roots (27%). The limitation of S availability greatly reduced total S uptake and changed the ^{34}S partitioning within the different plant tissues (Figure 27B). For –S plants, 65% of S taken up was thus found in the roots, while only 23% was found in leaves, with most of the latter distributed to young leaves (data not shown). Moreover; the total S content of LB8 and LB10 strongly decreased (Figure 28), indicating a large remobilization of S compounds from the soluble fraction, principally as sulphate (Figure 29C), which was reported to be mainly stored within the vacuole (Smith and Lang, 1988; Bell *et al.*, 1990, 1995; Cram, 1990; Sunarpi and Anderson, 1996, 1997; Eriksen *et al.*, 2001). In a parallel study, performed with the

same genotype grown under the same conditions, Dubousset *et al.*, (2009) reported that vacuolar sulphate is specifically remobilized from mature leaves and that this mobilization is related to an up-regulation of *BnSultr4;1* and/or *BnSultr4;2* gene expression. These authors also indicated that the relationship between sulphate mobilization and up-regulation of expression of *BnSultr4* genes is specifically dependant on the N availability. Moreover, this redistribution of S compounds to young developing leaves and roots was without any acceleration of leaf senescence processes (Dubousset *et al.*, 2009). The authors hypothesized that this would maintain photosynthetic capacities of shoot tissues and subsequent metabolic activities within the whole plant (*i.e.* including uptake processes in the root).

In conclusion, the present study provides evidence that in the case of a transient mineral S limitation perceived at the rosette stage, oilseed rape, which is considered to be a high S requiring plant, is able to maintain its growth by an optimization of N uptake and by the recycling of endogenous foliar S compounds (particularly SO_4^{2-}) predominantly from mature leaves (LB 8 and 10). Our results also demonstrate that under S limitation, the main ecophysiological strategy of oilseed rape is to maintain its root growth rate not by increasing S mobilization from leaves, but rather by re-orientating more of the S fluxes (uptake and remobilization) to the roots. However, it is not known whether S is transported as an inorganic form as sulphate. In the later case, the study of phloemic sulphate transporter (*BnSultr 1.3*) could be relevant, but we were unable yet to clone this gene in oilseed rape. Overall, plants under S limitation appear to optimize soil S capture by maintaining plant growth through targeted S remobilization to the roots and by increasing the expression of root S transporters.

Acknowledgements :

This work was supported by ANR project Cosmos (ANR-05-JC-05-51097), and by a PhD grant to Abdallah M. from the Egyptian government. Authors are grateful to Marie Paule Bataillé, Josette Bonnefoy, Jean Bernard Cliquet, Anne Sophie Desfeux, Julie Gombert, Raphael Segura and Sandrine Rezé for their skillfull help with isotopic mass spectrometry, ^{34}S preparation, plant culture and molecular analysis. We also acknowledge help with English corrections from Dr Tony Gordon, former Plant Biochemist and Physiologist (retired) at the Institute of Grassland and Environmental Research, UK.

CHAPITRE II

*Fluctuations of S availability affect growth, S reserves,
¹⁵N and ³⁴S uptake in Brassica napus L.*

M. ABDALLAH ^{1,2}; A. OURRY ¹; F. MEURIOT ^{1,3}

¹ Université de Caen Basse-Normandie, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N, C, S (EVA), INRA, F-14032 Caen, FRANCE

² Laboratory of Plant Physiology Botany Dept. National Research Centre
31 Al-Beho st., 12622 Dokki, Cairo, EGYPT

³Corresponding author: F. MEURIOT

Phone : (33) 231 565 166

Fax : (33) 231 565 360

Email: frederic.meuriot @ unicaen.fr

Number of figures: 6

Number of tables: 1

Résumé

Le colza est sensible à une limitation en soufre (S) alors qu'il est confronté de façon permanente à des changements de la disponibilité en S, résultant de l'activité de minéralisation des sols et des régimes de fertilisation S, qui peuvent affecter l'absorption, le stockage et la remobilisation de l'azote et du S. Par conséquent, la présente étude visait à évaluer l'influence de l'état initial en S des plantes et de la disponibilité en S minéral sur i) la production de biomasse, ii) l'absorption du ^{15}N et du ^{34}S , iii) l'expression relative des gènes codant des transporteurs de nitrate ou de sulfate et iv) la remobilisation du ^{14}N et du ^{32}S précédemment accumulés. Les plantes avec de forts ou de faibles niveaux initiaux de S (HS_i ou LS_i) ont ensuite été cultivées pendant 28 jours, avec une forte ou une faible disponibilité en S minéral (HS ou LS).

Les résultats ont montré que les plantes ayant un faible statut initial en S, mais ensuite alimentées en S, étaient capables d'augmenter l'absorption du S et N *via* une dérépression de l'expression des gènes de leurs systèmes d'absorption. Elles ont ainsi atteint une croissance similaire à celle des plantes témoins (HS_i -HS). Avec de fortes réserves initiales en S, principalement sous forme de sulfate, les plantes étaient encore en mesure de compenser la limitation S en augmentant la mobilisation du S vers les racines, et elles ont également atteint une croissance similaire à celle des plantes témoins. C'est seulement avec un état initial et une disponibilité en S faibles (LS_i -LS ; *i.e.* limitation à long terme) que la croissance des plantes a été réduite, alors que l'expression du transporteur de nitrate a été constamment réprimée en raison d'une accumulation plus élevée d'acides aminés dans les racines.

Les résultats montrent que le colza est capable de faire face aux fluctuations de la disponibilité en S, notamment par la mobilisation des réserves S préalablement accumulées sous forme de sulfate, ou encore d'augmenter l'absorption du S. En conclusion, notre étude confirme que les réserves S initiales jouent un rôle crucial pour l'adaptation du colza à une limitation en S.

Mots-clés: Azote, soufre, marquage ^{15}N , marquage ^{34}S , mobilisation des réserves, transporteurs de nitrate, transporteurs de sulfate.

Abstract

Oilseed rape is sensitive to sulphur (S) limitation and is confronted to permanent changes of S availability, resulting from soil activity and S fertilization regimes, which may affect N and S uptake, storage and remobilization. Therefore, the present study aimed to assess the influence of initial S status and mineral S availability on i) biomass production, ii) ^{15}N and ^{34}S uptake, iii) relative expression of genes encoding N or S transport systems and iv) ^{14}N and ^{32}S remobilization. As a consequence, plants with High or Low Initial S status (HS_i or LS_i) were grown during 28 days either with High or Low S mineral availability (HS or LS).

The results showed that with a low initial S status, plants were able under ample S supply to increase N and S uptake by de-repressing gene expression of their uptake systems, and reached similar growth as control plants. With high S reserves, mostly as sulphate, plants were yet able to compensate transient S limitation by increasing S mobilization towards the roots, and reached similar growth as control plants. Only with low S initial status and low S availability (*i.e.* long term S limitation), plant growth was reduced while nitrate transporter gene expression was steadily down-regulated probably as a result of amino acid accumulation in the roots.

Overall results showed that plants are able to cope with fluctuating S availability, through mobilization of S reserve when previously accumulated as sulphate, or alternatively, to increase S uptake. As a conclusion, our study supports that initial S reserves play a crucial role for oilseed rape adaptation to S limitation.

Key-words: Nitrogen, Sulphur, Uptake, ^{15}N labeling, ^{34}S labeling, Reserve mobilization, Nitrate transporters, Sulphate transporters

Introduction

Sulphur (S) is an essential nutrient for crops worldwide which is mainly available as sulphate (SO_4^{2-}) within the soil. Sulphate is further taken up by roots and translocated *via* the xylem to shoot tissues where it is reduced in cysteine (Cys) and either converted to methionine (Met) or incorporated into proteins or Cys-containing peptides such as glutathione (Saito, 2000; Saito, 2004). Sulphur is also important for chlorophyll synthesis (and subsequent plant photosynthetic capacities) and is incorporated in numerous secondary metabolites involved in plant defence against pathogens (SDC; Sulphur-containing Defence Compounds) like thionins, defensins, glucosinolates or crucifer phytoalexins (Hell, 1997). Oilseed rape (*Brassica napus* L.), as most *brassicaceae*, presents greater S requirements than other large-crop species (McGrath and Zhao, 1996), and is therefore quite sensitive to S limitation (Scherer, 2001). However, the risk of soil S limitation has increased during the last three decades as a result of the decline of industrial emissions and the subsequent reduction of S deposition on agricultural lands (McNeill *et al.*, 2005). Consequently, crops submitted to S limitation present reduced photosynthetic capacities and growth (Bouranis *et al.*, 2006), which has negative consequences on agronomic performances like seed quality and yield (Janzen and Bettany, 1984; Scherer, 2001).

In response to a limitation of S supply, the hypothetical initial plant physiological responses involve an optimization of sulphate uptake and its subsequent utilization (Hawkesford and De Kok, 2006), in order to increase sulphate uptake efficiency (SUE) at the whole plant level (Davidian *et al.*, 2000). For example, Buchner *et al.*, (2004) and Parmar *et al.* (2007) reported that S limitation in *Brassica oleracea* L. and *Brassica napus* L. resulted in an overall increase of the relative transcript levels of several sulphate transporters (*i.e.* Sultr). Moreover, numerous genes involved in the S assimilatory pathway, like ATP sulphurylase (ATPS), are also positively regulated in response to S limitation (Hirai *et al.*, 2005; Maruyama- Nakashita *et al.*, 2004; Nikiforova *et al.*, 2003) in order to maximize the reduction of sulphate for the synthesis of S-containing amino-acids required for protein biosynthesis.

S limitation is also accompanied by an increase of the remobilization of endogenous S reserves from vegetative tissues and their subsequent redistribution towards young growing tissues (Hawkesford and De Kok, 2006; Abdallah *et al.*, 2010). In oilseed rape, Blake-Kalff *et al.*, (1998) reported that under optimal S supply, 70 to 90% of the total S in mature and oldest leaves is accumulated as sulphate, which would be remobilized during S limitation. Similarly, within rosette leaves, Noquet *et al.*, (2004) also reported that N

remobilization plays a crucial role because the ablation of half of the rosette leaves present at the end of the vegetative stage results in a 30% decrease of seed yield. Lastly, Abdallah *et al.*, (2010) also reported for oilseed rape that a transient mineral S limitation (up to 28 days) occurring during the rosette stage could lead to a transient maintenance of growth related to an optimization of the recycling of endogenous foliar S compounds (particularly sulphate) from old to young leaves and roots. Despite a close interconnection between N and S metabolisms (Reuveny *et al.*, 1980; Saito 2004), this was reported to be mainly achieved without any apparent modification of N uptake or N remobilization or without any acceleration of leaf senescence processes, which is usually required for N reserve mobilization efficiency (Desclos *et al.*, 2008; Dubousset *et al.*, 2009).

However, and even if it has been recently reported that S limitation is accompanied by an increase of the remobilization of endogenous initial S reserves (Abdallah *et al.*, 2010), the question assessing the hypothetical impact of depleted initial S reserves on growth, N and S uptake and utilization was not, to our knowledge, clearly assessed in literature. In other words, and because N and S metabolisms are closely linked at the whole plant level, with depleted initial S reserves and/or under S limitation, can growth, N and S uptake or mobilization patterns be reduced? With depleted initial S reserves and if supplied with optimal S, can N and S uptake be increased and will plants replenish their reserves and/or grow as control plants? These two questions also have particular relevance in the current context of sustainable agriculture and the concomitant reduction of fertilizers inputs.

As a consequence, the main aim of our study was to evaluate the influence of initial S reserves and mineral S availability on biomass production as well as on ^{15}N and ^{34}S uptake. For this purpose; a continuous ^{15}N and ^{34}S double-labeling method was therefore designed and the expression of genes encoding relevant nitrate and sulphate transporters (*i.e.* *BnNrt* and *BnSultr*, respectively) was studied within the roots of oilseed rape. Moreover, and because a previous study revealed that there is a great reorientation of S fluxes towards the roots and that they became the main sink organ for S in case of transient S limitation (Abdallah *et al.*, 2010), we specifically studied N and S partitioning and remobilization patterns within this tissue in order to determine how plants can compensate for a reduced S availability and cope with their requirements for their vegetative growth and development.

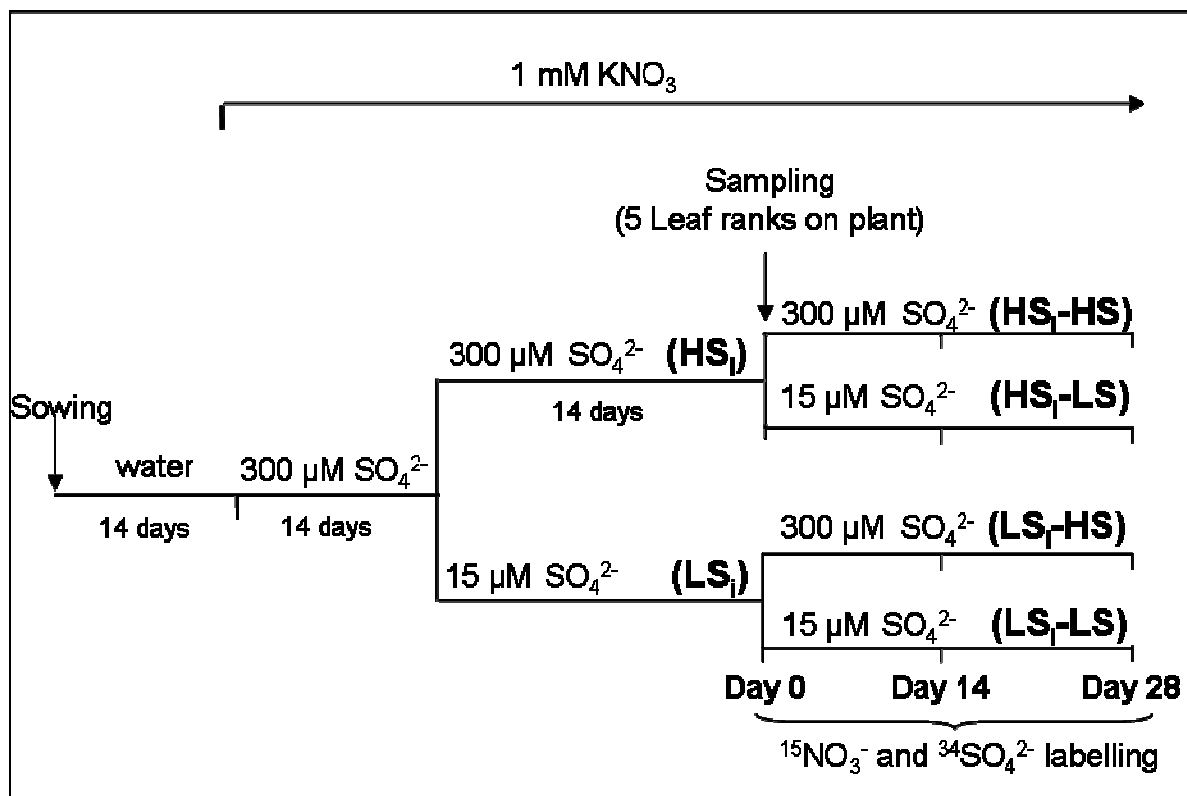


Figure 31: Experimental design: After one week on demineralized water, plants were grown during two weeks on high S solution (300 μM SO₄²⁻) and were then divided in two groups during two additional weeks. They were initially supplied either with 300 μM SO₄²⁻ (HS_i) or 15 μM SO₄²⁻ (LS_i). On Day 0, every group was again divided in two groups and treatments were applied during 28 days with either High S solution (300μM SO₄²⁻; HS) or Low S solution (15μM SO₄²⁻; LS), thus generating four treatments : HS_i-HS; HS_i-LS; LS_i-HS and LS_i-LS. In the meantime, overall treatments were continuously labelled with ¹⁵N and ³⁴S and plants were finally harvested at Day 0, 14 and 28.

Materials and Methods

Application of S treatments and tissue sampling

Seeds of oilseed rape (*Brassica napus* L. cv. Capitol) were sterilized by exposure to 80% ethanol for 30 sec followed by 20% sodium hydrochlorite for 20 min. After several washes in demineralized water, seeds were disposed on plastic tanks with a moist filter paper under dark conditions. Just after first leaf emergence, seedlings were transferred on demineralized water for two weeks, (18 seedlings per 12 L-plastic tank) in a greenhouse with a thermoperiod of 20°C (day) and 18°C (night). Natural light was supplemented with phytol lamps (450 $\mu\text{moles m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ of photosynthetically-active radiation (PAR) at canopy height) for 16h. For two additional weeks, seedlings were transferred on hydroponic solution (18 seedlings per 12 L-plastic tank). The basic nutrient solution contained 0.4 mM KH_2PO_4 , 0.15 mM K_2HPO_4 , 2 mM KCL, 3 mM CaCl_2 , 0.2 mM Fe Na EDTA, 14 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 3 μM ZnSO_4 , 0.7 μM CuSO_4 , 0.7 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.1 μM CoCl_2 . This basic nutrient solution was renewed weekly and supplemented twice a week with 1mM KNO_3 and 300 μM MgSO_4 (Figure 31), in order to be in optimal S conditions for growth for non-vernalized rosette plants (*i.e.* vegetative stage). After four weeks, plants were then transferred to 4 L plastic pots (one plant per pot), and were divided in two groups in order to modify the level of their initial S reserves. They were thus initially supplied either with 300 μM SO_4^{2-} (HS_i) or 15 μM SO_4^{2-} (LS_i) for 14 days. At this date (*i.e.* Day 0; Fig. 31), every set was again divided in two groups and treatments were applied during 28 days with either High S solution (300 μM SO_4^{2-} ; HS) or Low S solution (15 μM SO_4^{2-} ; LS), thus generating four treatments: HS_i -HS; HS_i -LS; LS_i -HS and LS_i -LS. In the meantime, overall treatments were continuously double-labeled with ^{15}N (2.51% atom excess) and ^{34}S (2.03% atom excess)

Four plants (*i.e.* replicates) of each of the four treatments were harvested on Day 0 and after 14 and 28 days of treatment. The whole root system, stems, leaf blades and leaf petioles were separated and weighed for determination of their fresh matter. All plant tissues were then frozen in liquid N_2 and stored at -80°C until further isotopic ratio mass spectrometry, biochemical and molecular analysis. They were then finally freeze-dried and ground to a fine powder for dry weight determination (Figure 32)

Preparation of ³⁴S:

Elemental S enriched in ³⁴S (98 % atom excess) was obtained from Trace Sciences international, France. A digestion procedure using 16.5 N HNO₃ was used to convert elemental S to sulphate according to Zhao *et al.*, (1996) and modified by Abdallah *et al.*, (2010). Briefly, 100 mg of elemental S were weighed into a Pyrex digestion tube. Ten mL of HNO₃ were then added. Digestion was carried out in a programmable heating bloc with temperature rising up to 200°C for 2h. This operation was repeated two times. The different solutions were then recovered and K₂CO₃ was added.

The remaining solution was transferred to a 100-mL volumetric flask. Analyses of nitrate and sulphate concentrations in this stock solution were carried out using ion chromatography (Dionex DX100, CA USA, with conductivity detector). The analysis of the stock solution presented a final recovery of about 82 % of ³⁴SO₄²⁻ and both nitrate and sulphate concentrations were taken into account during plants N and S treatments.

Determination of total N and S content

An aliquot of each freeze-dried plant organ (roots, stems, leaf blade and leaf petioles) was placed into tin capsules for isotopic analysis. The total N (¹⁴N, ¹⁵N) and S contents (³²S, ³⁴S) in plant samples (Figure 33) were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, United Kingdom) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy):

Total N (N_{tot}) content in a tissue “i” at a given time “t” was calculated as:

$$N_{tot\ i,t} = \%N_{i,t} \times DW_{i,t} / 100$$

Natural ¹⁵N abundance (0.3663 % ± 0.0004) of atmospheric N₂ was used as a reference for ¹⁵N analysis. Nitrogen derived from current N uptake (N_{upt}) in a given organ was calculated as follows:

$$N_{upt} = N_{tot} \times (E_N (\%) / E_{N\ SOI} (\%))$$

where E_N (%) is the atom % ¹⁵N excess in a given organ

and E_{N_{SOI}} is atom % ¹⁵N excess (2.51%) in the nutrient solution

As for N, total S (S_{tot}) content in a tissue “i” at a given time “t” was calculated as:

$$S_{tot\ i,t} = \%S_{i,t} \times DW_{i,t} / 100$$

For ³⁴S enrichment, the natural isotope abundance of 4.255% was withdrawn to the sample ³⁴S abundance, then sulphur derived from current S uptake (S_{upt}) in a given organ was calculated as follows:

$$\text{Supt} = \text{Stot} \times (\text{ES} (\%) / \text{EsSol} (\%))$$

where ES (%) is the atom % ^{34}S excess in a given organ

and EsSol is atom % ^{34}S excess (2,03%) in the nutrient solution

Determination of S and N partitioning and mobilization

On Day 28, N and S partitioning derived from uptake of labeled sources in whole leaf-blades and roots was expressed as a percentage of whole plant (roots+stems+leaf blade+leaf petioles) total N or S, respectively (Table III).

Thereafter, the remobilized N content (Nmob) from or towards each tissue between two dates (*i.e.* Day 28 - Day 0) was calculated by subtracting the N derived from uptake between these two dates (Nupt) to the change in total N content ($\text{Ntot}_{\text{Day 28}} - \text{Ntot}_{\text{Day 0}}$) according to the following equation:

$$\text{Nmob}_{(\text{Day 28}-\text{Day 0})} = (\text{Ntot}_{\text{Day 28}} - \text{Ntot}_{\text{Day 0}}) - \text{Nupt}$$

Therefore, positive values of mobilized N represent N that is mobilized towards this tissue (*i.e.* imported), while negative values correspond to a net mobilization of N from this tissue (*i.e.* exported; Table III).

As for N, the mobilized S content (Smob) from or towards each tissue between two dates (*i.e.* Day 28 - Day 0) was calculated by subtracting the S derived from uptake between these two dates (Supt) to the change in total S content ($\text{Stot}_{\text{Day 28}} - \text{Stot}_{\text{Day 0}}$) according to the following equation:

$$\text{Smob}_{(\text{Day 28} - \text{Day 0})} = (\text{Stot}_{\text{Day 28}} - \text{Stot}_{\text{Day 0}}) - \text{Supt}$$

Therefore, positive values of mobilized S represent S that is mobilized towards this tissue (*i.e.* imported), while negative values correspond to a net mobilization of S from this tissue (*i.e.* exported; Table III).

Determination of NO_3^- and SO_4^{2-} contents

Nitrate and sulphate contents (Figure 35) were measured by extracting 30 mg of freeze-dried plant material in 1.5 mL of 50% ethanol solution at 40°C for 1h. After centrifugation (20 min, 10 000 g) the supernatant (called S1) was recovered and 1.5 mL of 50% ethanol were added to the pellet. After a new incubation (1h, 40 °C) and centrifugation (20 min, 10 000 g), the remaining supernatant was taken up and added to

the previous supernatant (S1). All these operations (*i.e.* incubation and centrifugation) were repeated twice but now with 1.5 mL ultra-pure water and incubation at 95 °C. All supernatants were finally pooled then air-dried for 16 h without heating. The dry residues containing both nitrate and sulphate were solubilized in 1 mL of ultra-pure water. Thereafter, nitrate and sulphate contents in the extracts were determined by using ion chromatography (Dionex DX100, with conductivity detector; Figure 35). The eluent solution consisted of 1.8 mM Na₂CO₃ and 1.7 mM Na₂HCO₃ and was pumped isocratically through a AS17 guard column.

RNA extraction

Total RNA was extracted from 200 mg of root fresh matter. Frozen samples were grounded to a fine powder with a pestle in a mortar containing liquid nitrogen. The resulting powder was suspended in 750 µL extraction buffer (0.1 M Tris, 0.1 M LiCl, 0.01 M EDTA, 1% SDS (w/v), pH 8) and 750 µL of hot phenol (80°C, pH 4). This mixture was vortexed for 30 sec. and after addition of 750 µl of chloroform / isoamylalcohol (24:1), the homogenate was centrifuged at 15 000 g (5 min, 4°C). The supernatant was transferred into 4 M LiCl solution (w/v) and incubated overnight at 4°C. After centrifugation (15 000 g, 30 min, 4°C), the pellet was suspended in 250 µL of sterile water. Fifty µL of 3 M sodium acetate (pH 5.6) and 1 mL of 96% ethanol were added to precipitate the total RNA for 1 h at - 80°C. After centrifugation (15 000 g, 20 min, 4°C), the pellet was washed with 1 mL of 70% ethanol, then centrifuged at 15 000 g for 5 min at 4°C. The resulting pellet was dried for 5 min at room temperature and re-suspended in sterile water containing 0.1% SDS and 20 mM EDTA. Quantification of total RNA was performed by a spectrophotometer at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before Reverse Transcription (RT) and quantitative PCR (Q-PCR) analysis.

Relative expression of *BnNrt.1;1*, *BnNrt.2;1* and *BnSultr.1* and *BnSultr.4* genes using Q-PCR

Q-PCR amplification and relative expression of *BnNrt.1.1* and *BnNrt.2.1* genes which are supposed to encode root high and low affinity nitrate transporters, respectively, were performed as previously described by Leblanc *et al.*, (2008).

Q-PCR amplification and relative expression of plasmalema (*i.e.* *BnSultr.1.1* and 1.2) and tonoplasmic (*i.e.* *BnSultr.4.1* and 4.2) sulphate transporters were performed as previously described by Dubousset *et al.*, (2009) and Abdallah *et al.*, (2010).

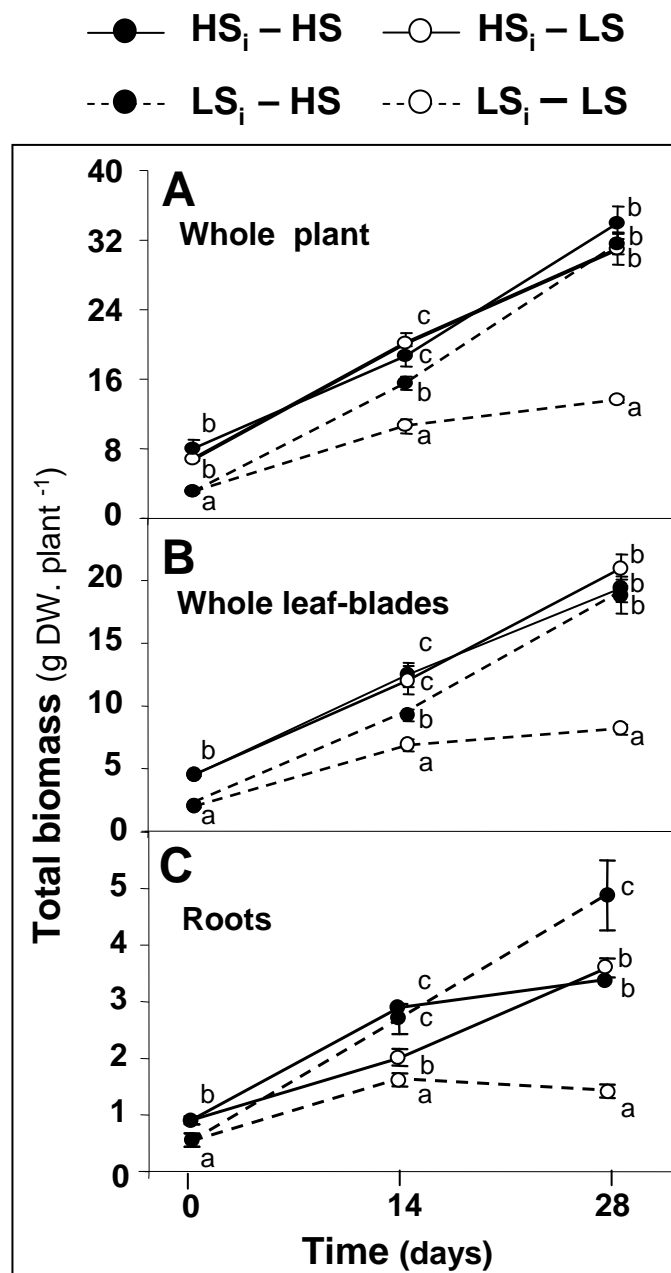


Figure 32: Changes of (A) whole plant, (B) whole leaf blades and (C) roots total biomass of plants initially grown either with High S (HS_i; solid line) or Low S (LS_i; dotted line) and submitted during 28 days to High S (HS; closed circles) or Low S (LS; open circles) treatments. Vertical bars indicate ± s.e. of the mean for $n = 4$ when larger than the symbol. Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments ($P < 0.05$).

EF1-α gene (Accession no: DQ312264) was used as an internal control gene. For each sample, the subsequent Q-PCR reactions were performed in triplicate and the relative expression of the different nitrate or sulphate transporters in each sample were compared to the control sample (corresponding to control plants (+S) at Day 28) and were determined with the delta-delta Ct method using the following equation (Livak and Schmittgen, 2001):

$$\text{Relative expression} = 2^{-[\Delta\text{Ct sample} - \Delta\text{Ct control at Day 28}]},$$

with $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{BnNrt1.1 or 2.1 or BnSultr.1.1; 1.2; 4.1; 4.2}} - \text{Ct}_{\text{EF1-}\alpha}$

Where, Ct refers to the threshold cycle determined for each gene in the exponential phase of PCR amplification. Using this analytic method, relative expression of the different nitrate or sulphate transporter genes in the control sample at Day 0 was equal to one (Livak and Schmittgen, 2001), and the relative expressions of other treatments were then compared to the control at Day 0, on this basis (Figure 36).

Statistical analysis

Results are presented as mean values \pm S.E. for four replicates ($n = 4$). The effects of initial S status and mineral S limitation were determined by ANOVA method, and according to a comparison of the means (Tukey t-Test), with MINITAB13 on windows (Minitab Inc, State College, PA, USA). When the normality law of data was not respected, the non-parametric test of Kruskal - Wallis was used. Statistical significance was postulated for $P < 0.05$ and letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments.

Results

Whole Plant analysis:

Plant biomass analysis:

Figure 32 presents the influence of initial S status and sulphur availability on whole plant, whole leaf-blade and root biomasses for High initial S - High S ($\text{HS}_i\text{-HS}$), High initial S - Low S ($\text{HS}_i\text{-LS}$), Low initial S - High S ($\text{LS}_i\text{-HS}$) and Low initial S - Low S ($\text{LS}_i\text{-LS}$) plants during the 28 days of the experiment. On Day 0, overall biomasses of LS_i plants were significantly decreased when compared to HS_i plants. During the experiment, whole plant, whole leaf blade and roots biomasses progressively increased for overall

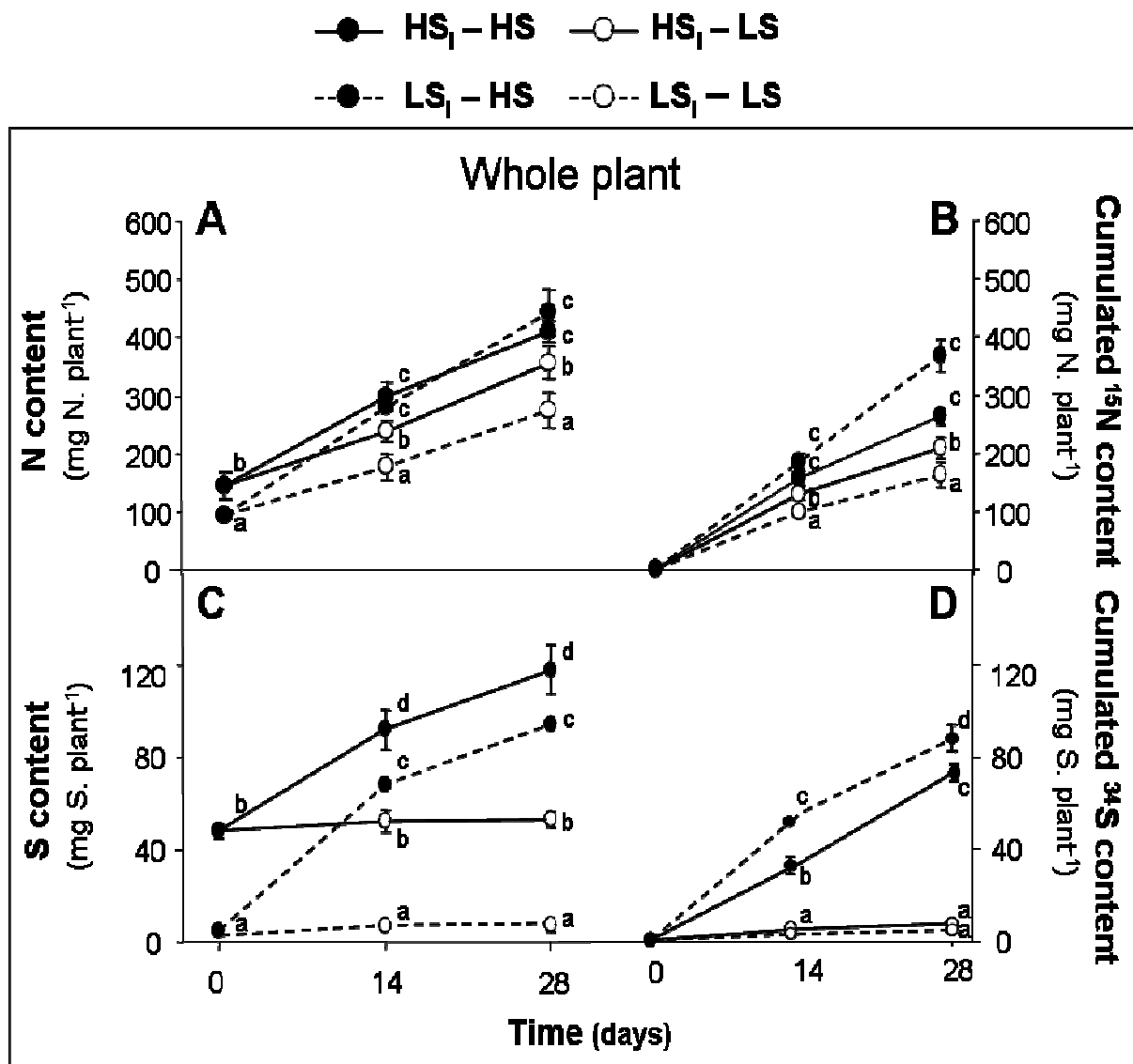


Figure 33: Changes of (A) whole plant N and (B) cumulated ¹⁵N uptake and (C) whole plant S and (D) cumulated ³⁴S uptake of plants initially grown either with high S (HS_i ; solid line) or low S (LS_i ; dotted line) and submitted during 28 days to High S (HS ; closed circles) or Low S (LS ; open circles) treatments. Vertical bars indicate \pm s.e. of the mean for $n = 4$ when larger than the symbol. Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments ($P < 0.05$).

treatments, but LS_i-HS whole plant biomass was much more increased and finally reached values close to that of control plants (*i.e.* HS_i-HS) on Day 28 with 32±1.6 g DW.plant⁻¹ in average. By contrast, and even if overall biomasses of LS_i-LS plants were slightly increased during the experiment, these biomasses were however significantly reduced by about 4 fold in average on Day 28, when compared to control plants. At this date, roots represented 25.6% of whole plant biomass for overall treatments, and were even the largest for LS_i-HS plants.

Whole plant N and ¹⁵N uptake:

The influence of initial S status and sulphur availability on total N and ¹⁵N cumulated uptake was presented in figures 3A and B, respectively. On Day 0, total N content was significantly lower for LS_i plants, when compared to HS_i plants (figure 3A). During the experiment, but to a lower extent for LS_i-LS plants, total N content was greatly increased for overall treatments and reached about 375 mg. plant⁻¹ in average on Day 28. This increase was however greater for LS_i-HS plants than for control plants. By contrast, total N content of LS_i-LS plants was only slightly increased during the experiment and was thus reduced by one third, when compared to control plants on Day 28.

For overall treatments, the whole plant cumulated ¹⁵N uptake was greatly increased during the first 14 days of experiment (Figure 33B). Thereafter, the cumulated ¹⁵N uptake solely progressed at the same rate for LS_i-HS plants while it was significantly reduced for all of the other treatments (HS_i-HS, HS_i-LS and LS_i-LS) in the meantime. Nevertheless, on Day 28, the whole plant cumulated ¹⁵N uptake was greater for HS plants than for LS plants, irrespective of their initial S status.

Whole plant S and ³⁴S uptake:

Figures 33C and D present the influence of initial S status and sulphur availability on whole plant total S and ³⁴S cumulated uptake, respectively. On Day 0, total S content was approximately 50 mg S. plant⁻¹ for HS_i plants, against solely about 5 mg S. plant⁻¹ for LS_i plants. Thereafter, total S content was increased as a function of mineral S availability. Grown on low S, total S content was very slightly increased (Figure 33C). This was due to a negligible ³⁴S uptake of less than 3.7 mg S. plant⁻¹ in average, as shown in figure 3D. Conversely, when plants were grown on high mineral S, their total S content was greatly increased, according to a massive cumulated ³⁴S uptake throughout the experiment

		Day 28				
		HS _i -HS	HS _i -LS	LS _i -HS	LS _i -LS	
Whole leaf-blades	Partitioning (%)	N _{tot}	59.5±2.6 ^c	38.0±1.5 ^a	54.1±2.6 ^b	50.0±3.2 ^b
		S _{tot}	58.2±1.6 ^b	38.3±2.5 ^a	61.0±2.9 ^b	37.1±4.9 ^a
	Remobilization (mg. plant ⁻¹)	¹⁴ N	-1.75±0.1 ^c	-20.8±0.2 ^a	1.7±0.1 ^d	-14.9±0.1 ^b
		³² S	-11.9±0.3 ^c	-14.4±2.2 ^c	-9.2±0.3 ^b	-3.9±0.3 ^a
Roots	Partitioning (%)	N _{tot}	24.3±1.8 ^{ab}	32.3±5.6 ^b	31.9±2.9 ^b	19.6±1.8 ^a
		S _{tot}	15.6±1.6 ^a	26.5±2.7 ^b	25.2±1.0 ^b	30.2±1.6 ^{bc}
	Remobilization (mg. plant ⁻¹)	¹⁴ N	14.6±0.1 ^c	5.4±0 ^b	21.9±0.2 ^d	-19.2±0.3 ^a
		³² S	3.2±0.7 ^a	7.3±1.0 ^b	10.5±0.3 ^c	2.1±0.8 ^a
Whole plant	Total N content (mg. plant ⁻¹)	411.2±18.1 ^c	357.6±28.8 ^c	443.2±38.9 ^b	274.1±29.9 ^a	
	Total S content	116.8±10.3 ^c	53.1±3.2 ^c	93.6±0.7 ^b	8.8±2.3 ^a	
	Total remobilization (mg. plant ⁻¹)	¹⁴ N	-21.2±0.7 ^a	-20.8±0.2 ^a	-23.7±0 ^b	-34.2±2.0 ^c
	³² S	-11.9±0.2 ^b	-15.8±2.2 ^c	-13.4±0.9 ^b	-4.9±0.3 ^a	

Table III: Day 28 partitioning of ¹⁵N or ³⁴S uptake in whole leaf-blades and roots as % of whole plant (roots, stems, leaf blade and leaf petioles) ¹⁵N or ³⁴S uptake, and total remobilized ¹⁴N (present on Day 0) and ³²S (present on Day 0) within whole leaf-blades and roots of oilseed rape plants, initially grown either with high S (HS_i) or low S (LS_i) and submitted during 28 days to High S (HS; closed circles) or Low S (LS; open circles) treatments. Values are given as the mean ± s.e. (n = 4). Different letters indicate that mean values are significantly different between treatments (P<0.05).

(Figure 33D). However, this increase was markedly more important for LS_i-HS plants where S content (Figure 33C) was increased by approximately 20 times against solely less than two times for HS_i-HS plants at the end of the experiment. As a consequence, S deriving from uptake represented 96.1 and 64.7% of total S content for LS_i-HS and HS_i-HS plants on Day 28, respectively, against less than 5.7% in average for LS plants.

Whole plant N and S partitioning and remobilization

Table III presents the influence of initial S status and mineral S availability on ¹⁵N and ³⁴S partitioning (derived from uptake) and ¹⁴N and ³²S (*i.e* deriving from initial endogenous N and S present on day 0) remobilization within whole leaf-blades and roots on Day 28, as well as total N and S amounts and total remobilized N and S at the whole plant level. Other tissues such as leaf petiols and stems are not given in Table III. Irrespective of the treatment, ¹⁵N and ³⁴S taken up were mainly partitioned within the leaf-blades, and secondly within the roots (both tissues thus represented 65 to 85% of whole plant total N or S). However, and except for N in LS_i-LS plants, both ¹⁵N and ³⁴S partitioning within the leaf-blades was severely reduced for LS plants, when compared to HS plants. This reduction was always accompanied by a parallel increase of the partitioning to the roots. For example, S partitioning in HS_i-LS roots reached 26.5%, against solely 15.6% within the roots of control plants.

Except for ¹⁴N in LS_i-HS, leaf blades also always acted as source tissues for ¹⁴N and ³²S (*i.e.* endogenous initial N and S). Moreover, irrespective of their initial S status, there was an average 10 fold increase of the ¹⁴N remobilization within the leaf-blades in LS plants, when compared to HS plants. Except for ¹⁴N of LS_i-LS plants, this greater remobilization was mainly at the benefit of the roots, which always acted as a sink tissue for ¹⁴N or ³²S. Moreover, 43 and even 100% of the total remobilized ¹⁴N at the whole plant level were recovered within the roots of LS_i-LS and HS_i-LS plants, against less than 8% for control plants. For ³⁴S, and irrespective of the treatment, almost all of the total remobilized S at the whole plant level was coming from leaf blades, and the main part of it was then recovered within the roots on Day 28. The S remobilization to the roots was then increased by previous (LS_i) or following N (HS_i-LS) deficiency.

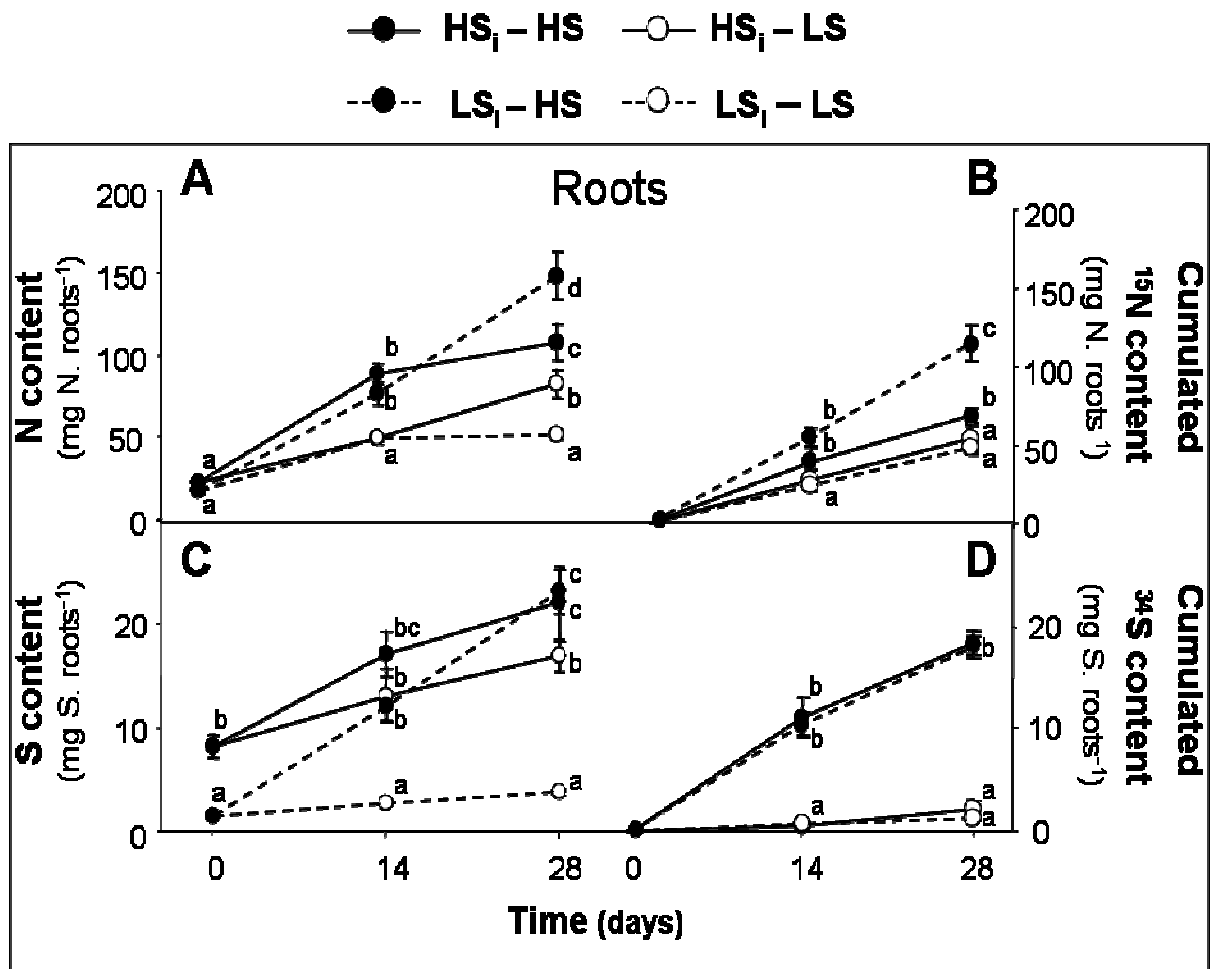


Figure 34: Changes of (A) roots total N and (B) cumulated ¹⁵N (*i.e.* deriving from uptake) and (C) roots total S and (D) cumulated ³⁴S (*i.e.* deriving from uptake) of oilseed rape plants, initially grown either with high S (HS_i; solid line) or low S (LS_i; dotted line) and submitted during 28 days to High S (HS; closed circles) or Low S (LS; open circles) treatments. Vertical bars indicate ± s.e. (*n* = 4) when larger than the symbol. Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments (*P* < 0.05).

Roots analysis

Total N, total S and cumulated ¹⁵N and ³⁴S contents:

Figure 34 presents the effect of initial S status and S availability on total N, total S and cumulated ¹⁵N and ³⁴S contents within the roots of oilseed rape plants during the 28 days of experiment. At the beginning of the experiment, total N content was 19 mg N roots⁻¹ in average for all treatments (Figure 34A). This content was then progressively increased for overall treatments but there was a faster and greater increase for HS plants than for LS plants during the first 14 days of experiment. Then, this increase remained greater for LS_i-HS plants than for other treatments. These overall results were confirmed by the dynamics of ¹⁵N content (*i.e.* deriving from recent N uptake), where it was significantly higher for plants grown on high S than on low S (Figure 34B). Moreover, more than 90% of total N found in the roots was finally deriving from recent N uptake for HS plants, against less than 60% for LS plants.

Roots S content was 6 fold lesser for LS_i plants than for HS_i plants on day 0. Thereafter, and except for LS_i-LS plants where it was kept rather constant over time, root S content was greatly increased for overall treatments during the experiment (Figure 34C). However, it was much more increased for LS_i-HS plants than for control plants and roots S content therefore reached values not significantly different from control plants.

As expected, roots ³⁴S content showed a positive and constant increase for plants grown with high mineral S, but there was no significant difference between HS_i or LS_i plants (Figure 34D). In the meantime, it remained to a negligible level for plants grown with low mineral S availability. Therefore, roots ³⁴S content was 13 fold greater for HS plants than for LS plants on day 28. Overall data from Figures 34C and D shows that the faster increase of S content in roots was achieved by internal S remobilization rather than by an increased ³⁴S uptake.

Nitrate, sulphate and amino acids content:

The influence of initial S status and S availability on the kinetics of both nitrate-N, sulphate-S and amino acids contents within the roots of oilseed rape are presented on Figure 35A, B and C, respectively. On Day 0, root nitrate-N content was almost 4 times greater for LS_i than for HS_i plants and represented less than 4% of total N (according to Figure 35A). Thereafter, and irrespective of the initial S status, roots nitrate-N content was

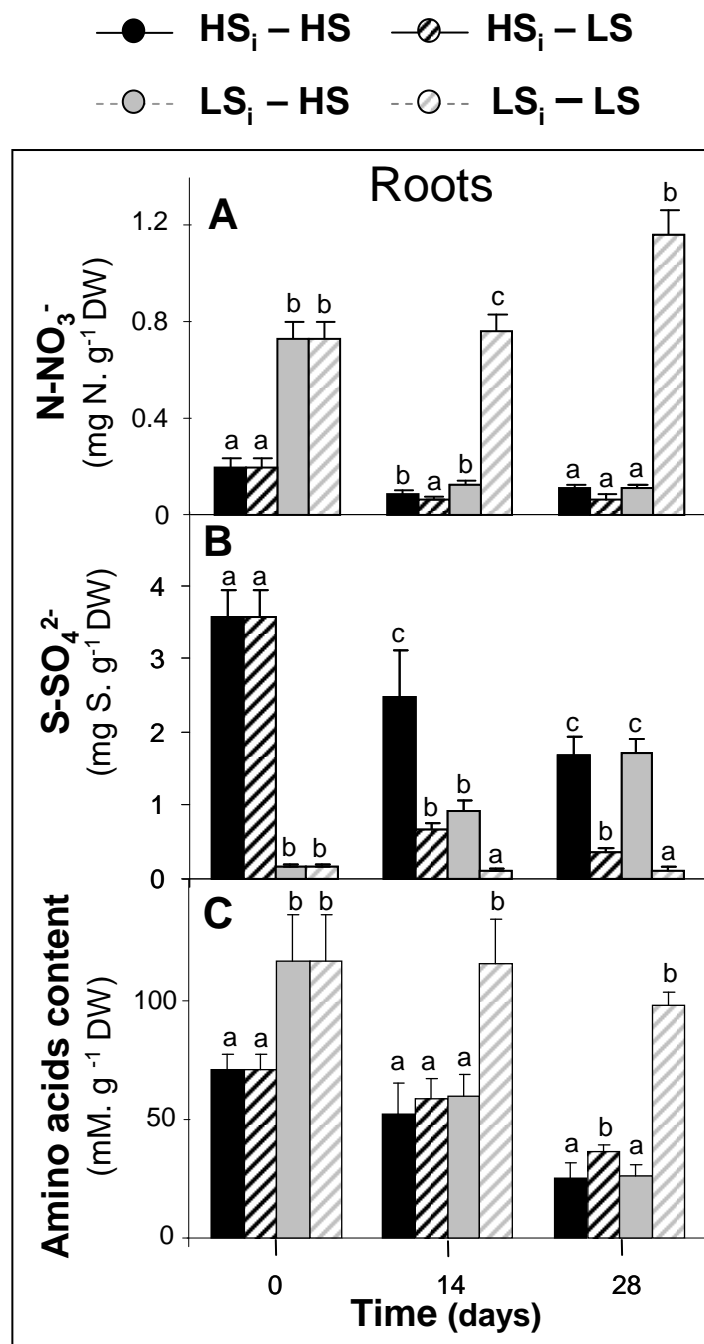


Figure 35: Changes of (A) nitrate-N, (B) sulphate-S and (C) amino acids contents in roots of oilseed rape plants initially grown either with high S (HS_i) or low S (LS_i) and submitted during 28 days to High S (HS; closed circles) or Low S (LS; open circles) treatments. Vertical bars indicate ± s.e. (*n* = 4) when larger than the symbol. Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments (*P* < 0.05).

fastly and severely reduced when plants were grown on high S. However, it was increased by 52.6% between Day 0 and Day 28 for LS_i-LS plants.

Conversely, and when compared to LS_i plants where it was close to negligible values, roots sulphate-S content was greater for HS_i plants on Day 0 (Figure 35B). On this date, sulphate-S content even represented 44% of root total S for HS_i plants, against solely 12% for LS_i plants. During the experiment and irrespective of the S availability, root sulphate-S content was reduced for HS_i plants but this decrease was greater for HS_i-LS plants. In the meantime, roots sulphate-S content was greatly increased for LS_i-HS plants, whereas it remained stable and close to negligible values for LS_i-LS plants. As a consequence, and despite very different initial values, roots sulphate-S content was similar for plants grown on HS on Day 28 with 1.7 mg S-SO₄²⁻.g⁻¹ DW on average. Overall, when all treatments are considered together, nitrate was accumulated in the roots at value higher than 0.3 mg N-NO₃⁻.g⁻¹ DW, only when sulphate concentrations were below 0.2 mg S-SO₄²⁻.g⁻¹ DW.

On Day 0, amino acids content was almost two fold greater for LS_i plants than for HS_i plants. Thereafter, and except for LS_i-LS plants where it remained constant, amino acids content was decreased during the experiment, and more particularly for LS_i-HS plants. On Day 28, despite greater initial values, it was therefore not significantly different from control plants. On this date, root amino acids content was greater for LS than for HS plants, irrespective of their initial S status.

Relative expression of nitrate and sulphate transporters

The influence of initial S status and mineral S availability on the kinetics of both nitrate (*BnNrt.1;1* and *BnNrt.2.1*) and sulphate plasmalema root transporters (*BnSultr.1;1* and *BnSultr.1;2*) as well as on sulphate tonoplastic root transporters (*BnSultr.4;1* and *BnSultr.4;2*) are reported on Figure 36. During the first 14 days of treatment, and except for control plants (*i.e.* HS_i-HS) where it remained significantly unchanged, there was a progressive decline in the expression pattern of *BnNrt.1;1* for overall treatments, when compared to values measured on Day 0 (Figure 36A). This decline was however more important for LS_i-HS plants where there was a 4 fold decrease, against less than one third in average for others. Thereafter, the relative expression of the root plasmalema nitrate transporter *BnNrt.1;1* was nearly constant for overall treatments.

On Day 0, the relative expression of the root plasmalema nitrate transporter *BnNrt.2;1* was decreased in LS_i plants. Then, except for LS_i-LS plants where it was nearly

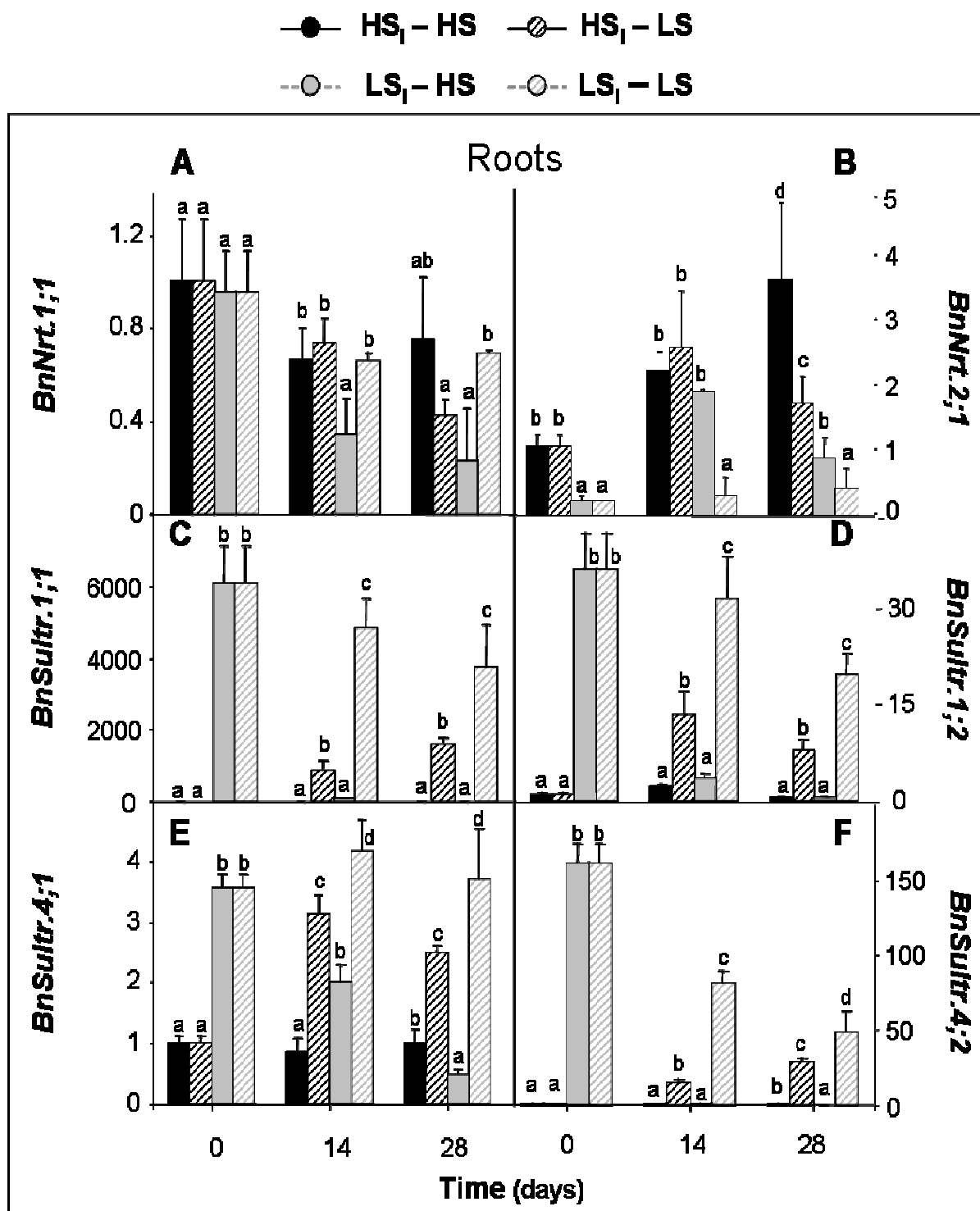


Figure 36: Relative expression of root nitrate transporters (**A**) *BnNRT1.1*, (**B**) *BnNRT1.2* and root sulphate transporters (**C**) *BnSultr1.1*, (**D**) *BnSultr1.2* (**E**) *Bnsultr4.1* and (**F**) *BnSultr4.2* in oilseed rape plants, initially grown either with high S (HS_i) or low S (LS_i) and submitted during 28 days to High S (HS; closed circles) or Low S (LS; open circles) treatments. Vertical bars indicate \pm s.e. ($n = 4$) when larger than the symbol. Values are given as the mean \pm s.e. ($n = 3$) of Q-PCR analysis and are expressed relatively to the Day 28 value observed for control plants (*i.e.* HS_i – HS). Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments ($P < 0.05$).

constant over time, there was an increase of the relative expression of *BnNrt.2;1* for overall treatments (Figure 36B). This increase was however far more important for LS_i-HS plants when compared to other treatments. When compared on Day 0, the relative expression of *BnNrt.2;1* was thus increased of more than 10 times after 14 days, against solely 2 to 3 times for HS_i-HS or HS_i-LS plants.

Lastly, when compared to the relative expression observed for HS_i plants on Day 0, there was a significant increase for overall sulphate transporters (Figures 36C, D, E and F). This increase was even close to 6000 times for *BnSultr.1;1*, which was the most induced sulphate transporter amongst all on Day 0. Thereafter, and except for *BnSultr.4;1* where it was nearly constant over time, there was a progressive decrease of the relative expression of overall sulphate transporters for LS_i-LS plants. Conversely, there was a significant and progressive induction of the relative expression of overall transporters for HS_i-LS plants. For example, *BnSultr.1;1* relative expression increased by nearly 2000 times between Day 0 and the end of the experiment (Figure 36C). Lastly, the relative expression of overall plasmalemic and tonoplastic sulphate root transporters was greatly and fastly reduced for LS_i plants grown on high S. As a consequence, and except for *BnSultr.4;1* where there was only a 50% decrease, the relative expression of overall root sulphate transporters was severely decreased to negligible values after only 14 days of experiment.

Discussion

It is generally admitted that S limitation has negative consequences on seed yield and quality (Janzen and Bettany, 1984; Scherer, 2001) in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) and induces a broad range of physiological and molecular adaptations (Parmar *et al.*, 2007; Koralewska *et al.*, 2009), like an optimization of both sulphate uptake and utilization (Hawkesford and De Kok; 2006), as well as an increase of S reserves remobilization from vegetative tissues (Dubousset *et al.*, 2009; Abdallah *et al.*, 2010). Soil S concentration fluctuation, also affected by S fertilizers, may generate situations where plants are confronted to variable S availability, that may be favourable or not to S uptake, storage and mobilization. Therefore, the present experiment was designed in order to obtain plants with high (HS_i) or low (LS_i) S reserve followed by a period of extended S limitation (LS) or sufficient S availability (HS). Biomass production, ¹⁵N and ³⁴S uptake and expression of genes encoding relevant root nitrate and sulphate transporters, as well as N and S partitioning and remobilization were assessed

S limitation modifies plant initial S status :

When plants were initially (*i.e.* two weeks before Day 0) grown with low sulphate availability, this resulted in a significant decrease of whole plant biomass (Figure 32) and whole plant total N and S contents (Figure 33), as previously reported (McGrath and Zhao, 1996; Blake-Kalff *et al.*, 1998; Fismes *et al.*, 2000; Hawkesford and De Kok, 2006). As a consequence, overall results clearly show that when oilseed rape plants were initially S-limited during two weeks, this resulted in a large modification of the initial plant S status, and more precisely of the initial level of S reserves (mainly as sulphate, which represents almost 85% of whole plant total S for control plants; Figures 33 and 35). In the meantime, both total S and sulphate-S contents were also severely decreased within the roots on Day 0 (sulphate accounting for 10.4% of root total S, against 52.3% for plants grown on High S; Figure 35). In these LS_i plants, all sulphate transporter genes were up regulated (Figure 36), while the root nitrate high affinity transporter was down-regulated, probably as a result of an increase of root amino acid contents (Figure 35C).

A low initial S status increased N and S uptake under ample supply

With depleted initial S reserves (*i.e.* LS_i plants), whole plant, whole leaf-blades and roots biomass production (Figure 32), as well as plant total N and S (Figure 33A and B) were significantly increased during the experiment when plants were grown on High S. This was mainly achieved according to the large increase of ¹⁵N and particularly ³⁴S uptake (Figure 33C and D), which was concomitant with higher gene expression levels of roots plasmalemma sulphate transporters (Figure 36C and D), This indicates a possible de-repression mechanism, probably mediated by O-acetyl-serine (OAS) as previously reported by Koralewska *et al.*, (2007). Conversely, genes encoding roots nitrate transporters were either unaffected (low affinity, Figure 36A) or repressed (high affinity, Figure 36B) in plants with depleted initial S reserves. This repression could be triggered by a higher root amino acid content. Several studies already demonstrated that amino acids, as end-products of the N assimilatory pathway, can repress the expression of high affinity nitrate transporters (Touraine *et al.*, 2001; Forde, 2002; Beuve *et al.*, 2004; Schachtman and Shin, 2007, Gojon *et al.*, 2009). Our study show that S deficiency increased root amino acid content and when S is again supplied, *BnNrt2.1* gene expression as well as nitrate uptake (Figure 33B) were then de-repressed, with a concomitant decrease of amino acid content in roots (Figure 35C).

Consequently, with low initial S status but grown on High S, oilseed rape has an increased S uptake capacity (Figure 33D), which allows maximum growth and

development as well as a rather complete replenishment of S reserves (mainly as sulphate, Figure 35B) within the different plant tissues. Moreover, most of the sulphate taken up by the roots was distributed within the shoot (Table III), where it represented more than 80% of total S in young leaf-blades (data not shown). Therefore, sulphate could be further used as a transient store of S for the future needs of the plant for example during reproductive development during which S is required for seed filling (Dubousset *et al.*, 2009).

The present study also revealed that plant total N content (Figure 33A), cumulated N taken up (Figure 33B) and *BnNrt2.1* de-repression were increased for plants which had depleted initial S reserves (Figure 33A and B) but further grown with ample S supply. It is usually reported that S availability may influence N use efficiency (NUE) of oilseed rape and *vice-versa* (Schnug *et al.*, 1993; Fismes *et al.*, 2000), indicating that mineral S and N availabilities closely interact on S and N management by the plant (Kopriva and Rennenberg, 2004). Hesse *et al.*, (2004) also reported that sulphur interacts with nitrogen in such a way that the lack of one reduces the uptake and assimilation of the other. Under these conditions, the increased S uptake and assimilation would have certainly led to an increased *de novo* synthesis of S-containing amino-acids and, as a consequence, of an increased proteic synthesis which thus led to decrease the root amino acids contents. This decrease of root amino acid concentration, according to their associated regulatory control on N uptake transporters, could explain the highest N uptake (Gojon *et al.*, 2009).

Low S availability can be compensated for by high initial S status

With High initial S status, the limitation of S supply led to a strong limitation of whole plant S uptake (Figure 33D) and to a concomitant induction of overall roots plasmalemma sulphate transporters (Figure 35), but without significant S uptake (Figure 33D). For example, *BnSultr.4;1* relative expression was increased from about 2000 times between day 0 and the end of the experiment (Figure 35C). Several authors already reported such de-repression of sulphate transporters genes in plants grown under S limited conditions (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004; Buchner *et al.*; 2004 and Parmar *et al.*, 2007). However, in our experimental conditions, plant growth remained surprisingly unchanged (Figure 31A). This was mainly achieved by a larger remobilization of S reserves at the whole plant level (Table III) and by the subsequent depletion of sulphate pools, for example from the roots (Figure 35B), when compared to control plants. However, despite sulphate depletion within the roots, there was a 2 fold increase of ^{32}S remobilization to the

roots until day 28 (Table III), in order to compensate for S limitation and biomass production.

As a consequence, our results clearly show that winter oilseed rape, with high initial S reserves, can easily compensate for a transient S limitation, mainly through a remobilization of S reserves and a redistribution of S fluxes towards growing tissues like young leaves (data not shown) or roots. This also allows an optimal growth like for control plants.

Low initial S status affects N metabolism when plants are S limited

With low initial S reserves and grown on low S, and despite an overall induction of S uptake transporters, there was few S uptake and overall S reserves, mainly sulphate, were already depleted in all plants tissues. As a consequence, whole plant total remobilized ^{32}S was 2 fold reduced and leaf blade remobilization towards the roots was also significantly reduced, when compared to control plants (Table III). These overall processes therefore severely affected whole plant biomass production. However, irrespective of their initial S status, there was an average 10 times greater increase of the ^{14}N remobilization within the leaf blades of S limited plants, when compared to HS plants (Table III). Our study also showed that the relative expression of *BnNrt.2;1*, a gene supposed to encode root plasmalemma high affinity nitrate transporter, is under permanent repression (Figure 36B) probably as a result of a root amino-acid concentration that was maintained to its highest value (Figure 35C). It could be easily suggested, even if individual amino-acids were not analyzed, that it was the result of an accumulation of non S-containing amino acids like glutamine or asparagine, related to a reduced protein synthesis.

It was also found that root nitrate-N content was almost 4 times greater for LS_i than for HS_i plants (Figure 35A). Thereafter, and irrespective of the initial S status, root nitrate-N content was fastly and severely reduced when plants were grown on High S. Conversely, it was increased by about 50% during the experiment for LS_i -LS plants. In *Brassicaceae*, it was demonstrated that a sub-optimal S nutrition results in large accumulations of nitrate (Schnug, 1990; McGrath and Zhao, 1996). Nitrate and sulphate concentrations in roots followed opposite changes, being increased and decreased by low S supply, respectively (Figure 35). To our knowledge, this has never been described previously but it could be the results of a compensatory process due to their involvement in the osmotic potential of root cells as shown for example in *Lolium perenne* L. between nitrate and chloride (Ourry *et al.*, 1989). Alternatively, this nitrate accumulation could be the result of a lower nitrate reductase activity, as already suggested by Reuveny *et al.*,

(1980), who reported that a deficiency of sulphur represses nitrate reductase activity even in the presence of an adequate supply of nitrate.

Acknowledgements

This work was supported by a PhD grant to Abdallah M. from the Egyptian government. Authors are grateful to Marie Paule Bataillé, Raphael Segura, Anne Sophie Desfeux, Marie Desclos and Sandrine Rezé for their skillfull help with isotopic mass spectrometry, plant culture and molecular analysis.

CHAPITRE III

*Do initial S reserves and mineral S availability alter leaf
S-N mobilization and leaf senescence in oilseed rape?*

M. ABDALLAH ^{1,2}; P. ETIENNE ¹; A. OURRY ¹ and F. MEURIOT ^{1,3}

¹ Univ. Caen, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N, C, S (EVA), INRA, F-14032 Caen, FRANCE.

² Laboratory of Plant Physiology Botany Dept. National Research Centre 31 Al-Beho st., 12622 Dokki, Cairo, EGYPT.

³ Corresponding author: F. MEURIOT

Phone (33) 231 565 166

Fax : (33) 231 565 360

Email: frederic.meuriot@unicaen.fr

Number of figures : 7

Number of tables : 1

Résumé

Bien que le colza soit une plante considérée comme sensible à une limitation en soufre (S), très peu d'études ont évalué l'impact du niveau initial en réserves S sur la remobilisation des composés N-S des feuilles et la dynamique de la sénescence foliaire. En conséquence, les impacts de fortes ou de faibles réserves initiales en S, combinées ensuite à de fortes ou de faibles disponibilités en S, ont été étudiées en utilisant une méthode de double marquage ^{15}N et ^{34}S associée à une étude de l'expression génique des transporteurs de sulfate tonoplastiques (*BnSultr4; 1* et *BnSultr4; 2*) et d'un indicateur moléculaire de la progression de la sénescence foliaire (*BnSAG12/BnCab*).

Les plantes avec un statut initial faible en S, alimentées de façon optimale en S, ont présenté une croissance optimale similaire aux plantes témoins (toujours alimentées de façon optimale en S). En outre, en réponse à une limitation en S, la teneur en protéines solubles, en S total, en S récemment absorbé (*i.e.* ^{34}S) et la teneur en sulfate dans les feuilles les plus âgées ont diminué alors que l'expression des gènes codant des transporteurs de sulfate tonoplastiques est induite. Toutefois, par rapport aux plantes témoin, la limitation en S a retardé la sénescence des feuilles (retard de l'expression de *BnSAG12* et *BnCab*, réduction plus lente de la teneur en protéines des feuilles). Ces données suggèrent qu'en réponse à une limitation en S, les plantes avec de forts niveaux initiaux en réserves S ont été en mesure de soutenir une croissance optimale des feuilles en augmentant la remobilisation de N et de S endogènes, indépendamment du processus de sénescence foliaire. En revanche, si ces plantes limitées en S n'avaient pas de réserves initiales en S suffisantes, la remobilisation foliaire de N et de S n'a pas été suffisante pour leur permettre une croissance optimale.

En conclusion, notre étude a montré que le colza est transitoirement en mesure de faire face à une limitation en S en augmentant la remobilisation du S et en retardant la sénescence des feuilles, alors que ces deux processus sont habituellement augmentés dans les feuilles âgées carencées en N.

Mots-clés : Soufre, Azote, Sénescence, Transporteurs de Sulfate, Mobilisation.

Abstract

Winter oilseed rape is sensitive to S limitation however, no or little studies clearly assessed the impact of initial S reserves on the remobilization of leaf N-S compounds and leaf senescence dynamics in S limited plants. As a consequence, the impacts of high or low initial S reserves, further cross-combined with either high or low S availabilities, were examined on these parameters using a ^{15}N and ^{34}S double-labelling method associated with a study of gene expression of relevant tonoplasmic sulphate transporters (*BnSultr4;1* and *BnSultr4;2*) and leaf senescence indicator (*BnSAG12/BnCab*).

Plants with high initial S status under S limitation showed an optimal growth similar to control plants under permanent optimal S supply. Moreover, in response to S limitation, leaf soluble proteins contents, total S, S recently taken up (*i.e.* ^{34}S) and sulphate contents in oldest leaves declined and expression of genes encoding tonoplasmic sulphate transporters were up-regulated. However, compared to control plants, S limitation delayed leaf senescence (delayed response of *BnSAG12* and *BnCab* genes expression, slower decreased of leaf protein content). These data suggested that in response to S limitation, plants with high initial S were able to sustain optimized leaf growth by increasing endogenous N and S remobilization independently of leaf senescence process. In contrast, if these low S plants had no initial S reserves, leaf N-S remobilization was not sufficient to allow optimal growth.

As a conclusion, our study showed that oilseed rape is transiently able to cope with S limitation by increasing S remobilization and by delaying leaf senescence, while these processes are usually increased in older leaves under N shortage.

Key-words: Sulphur, Nitrogen, Senescence, Sulphate transporters, Mobilization.

Introduction

During the last decade, and because of its wide use for many purposes (oil, alternative fuel, animal food...), winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) has become the major crop for oil production in the European Union, and one of the three major oil crop worldwide (Howlett et al., 2001). Like many other *Brassicaceae*, oilseed rape requires high amounts of sulphur (S), which is mainly taken up from the soil as sulphate (SO_4^{2-}) or, to a much lesser extent, as sulphur dioxide (SO_2) and hydrogen sulphide (H_2S) gases from the atmosphere (Zhao et al., 1997; Blake-Kalff et al., 1998). However, during the last three decades, the -80% reduction of industrial atmospheric pollution in Western Europe has resulted in a decrease of soil S availability (Scherer, 2001; McNeill et al., 2005), as well as seed yield and quality (Janzen and Bettany, 1984; McGrath and Zhao, 1996; Scherer, 2001).

The uptake of sulphate by the root and its subsequent assimilation and distribution within the plant are modulated by plant S status and S demand for growth (Hawkesford and De Kok, 2006). Under S limitation, there is also a combination of morphological (*i.e.* increased root development for soil prospection) and molecular modifications (*i.e.* sulphate transporters induction for enhanced S uptake capacity; Kopriva and Koprivova 2004; Hawkesford and De Kok, 2006). An efficient re-orientation of S reserves fluxes (mainly as sulphate) to the roots from shoot tissues, and more specifically from mature leaves, also occur (Abdallah et al., 2010a). With sufficient S-reserves, this can eventually lead to an optimized growth which remain unchanged, when compared to plants grown under non limiting S conditions (Dubousset et al., 2009; Abdallah et al., 2010a, b). However, with depleted initial sulphate-S reserves and under S limitation, it has not been clearly shown if the plant has an increased proteolysis, which can finally affect biomass production.

In parallel, it has also long been reported that leaves emerging during vegetative development (*i.e.* rosette stage) represent a major store of N and S nutrients that can be hardly remobilized to sustain growth of reproductive tissues, as already shown for nitrogen in winter oilseed rape (Schjoerring et al., 1995; Rossato et al., 2001; Noquet et al., 2004; Malagoli et al., 2005a). This N remobilization from leaves to sink growing tissues is mainly achieved according to an intense proteolysis (Hörtensteiner and Feller, 2002; Zimmerman and Zentgraf, 2005; Tilsner et al., 2005). However, to our knowledge, under S limitation, few works have reported that the remobilization of S reserves was accompanied by an increased proteolysis. Therefore, understanding the mechanisms associated to the regulation of leaf proteolysis leading to an efficient protein remobilization for the

maintenance of sink strength is a prerequisite for improving S recycling and subsequently S use efficiency in oilseed rape.

An efficient remobilization of previously stored leaf N-S compounds is yet mainly achieved according to leaf senescence processes (Noodén *et al.*, 1997; Gan and Amasino, 1997; Yoshida, 2003). However, initiation and dynamics of leaf senescence greatly depends on leaf age but can also be modulated by different biotic or abiotic factors (Buchanan-Wollaston, 1994; Noh and Amasino 1999; Pourtau *et al.*, 2004). For instance, environmental factors such as mineral N limitation (Smart *et al.*, 1995; Gombert *et al.*, 2006; Etienne *et al.*, 2007) or drought conditions (Thomas and Stoddart, 1980) may accelerate the initiation of leaf senescence and lead to many subcellular changes (Matile, 1982; Diaz *et al.*, 2005). For example, an efficient senescence results in the mobilization of more than 70% of leaf proteins, with a preferential proteolysis of plastidial proteins such as RuBisCO (Srivalli *et al.*, 2001). Moreover, N mobilization processes associated with senescence involve cysteine and serine proteases (Srivalli *et al.*, 2001, Buchanan-Wollaston and Ainsworth 1997; Guevara *et al.*, 2001). Many senescence associated genes (*i.e.* SAGs) encoding proteases are induced during leaf senescence such as *BnSAG12-1* and *BnSAG12-2* in oilseed rape (Noh and Amasino, 1999). However, very few works have reported that S limitation may modulate leaf senescence (Dubousset *et al.*, 2009). In spite of this observation, no or little studies also aimed to determine if the S remobilization observed in response to contrasted initial S reserves and further S limitation are related to the enhancement of leaf senescence processes, as commonly observed for mineral N limitation (Smart *et al.*, 1995; Gombert *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2007).

Therefore, the main goals of this study were to determine the impact of initial S reserves and further S limitation on N and S remobilization from old, mature and young leaves, previously suggested to export large amounts of S during the rosette stage (Parmar *et al.*, 2007). Firstly, to evaluate the level of leaf S and N remobilization, a double-labelling $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ and $^{15}\text{NO}_3^-$ method was designed. Secondly, and because sulphate is mainly stored in the leaf vacuoles and is the most important source of S in leaf of oilseed rape (Blake-Kalff *et al.*, 1998), the survey of S redistribution was also combined with a study of the gene expression levels of *BnSultr4;1* and *BnSultr 4;2*, which are known to code relevant sulphate transporters involved in sulphate efflux from the vacuole (Kataoka *et al.*, 2004). Lastly, to assess whether S remobilization in response to contrasted initial S status and further S limitation is associated with leaf senescence processes, we studied the dynamics of the leaf senescence using the *BnSAG12/BnCab* indicator previously developed by Gombert *et al.*, 2006.

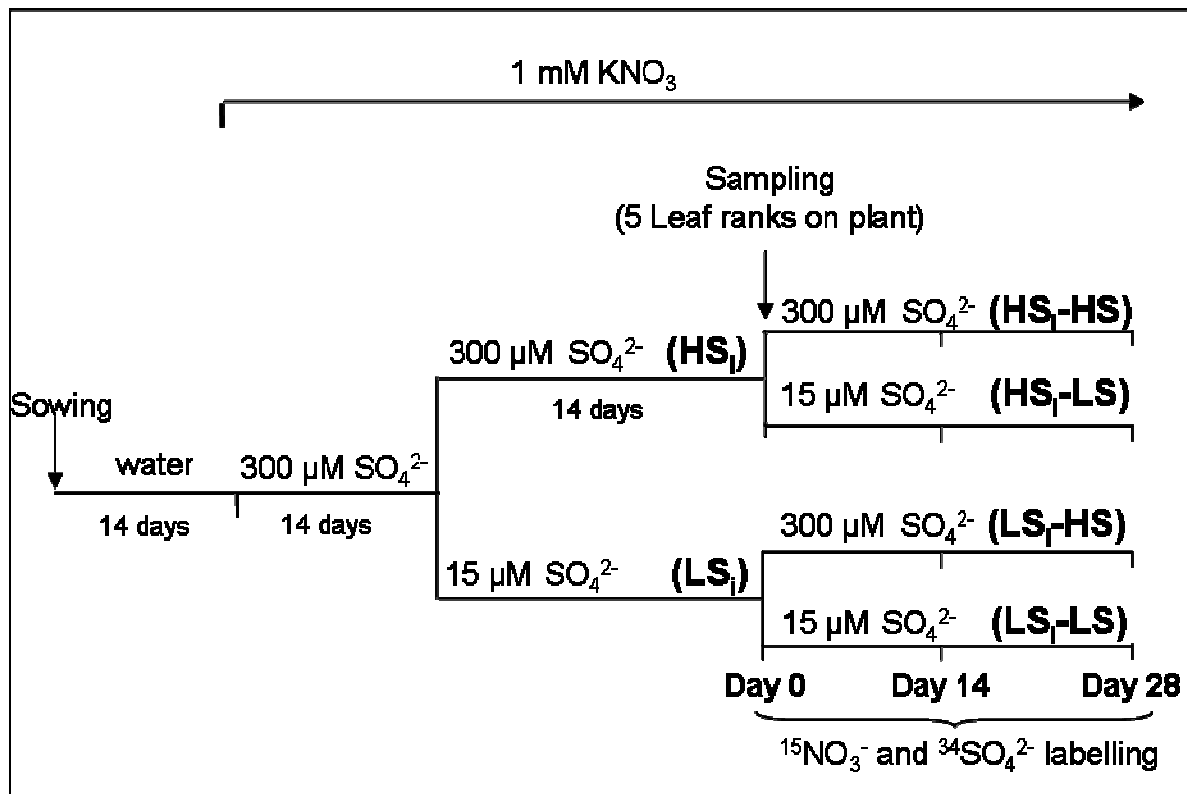


Figure 37: Experimental design: After one week on demineralized water, plants were grown during two weeks on high S solution (300 μM SO₄²⁻) and were then divided in two groups during two additional weeks. They were initially supplied either with 300 μM SO₄²⁻ (HS_i) or 15 μM SO₄²⁻ (LS_i). On Day 0, every group was again divided in two groups and treatments were applied during 28 days with either High S solution (300μM SO₄²⁻; HS) or Low S solution (15μM SO₄²⁻; LS), thus generating four treatments : HS_i-HS; HS_i-LS; LS_i-HS and LS_i-LS. In the meantime, overall treatments were continuously labelled with ¹⁵N and ³⁴S and plants were finally harvested at Day 0, 14 and 28.

Materials and Methods

Application of S treatments and tissue sampling

Seeds of oilseed rape (*Brassica napus* L. cv. Capitol) were sterilized by exposure to 80% ethanol for 30 sec followed by 20% sodium hydrochlorite for 20 min. After several washes in demineralized water, seeds were disposed on plastic tanks with a moist filter paper under dark conditions. Just after first leaf emergence, seedlings were transferred on demineralized water for two weeks, (18 seedlings per 12 L-plastic tank) in a greenhouse with a thermoperiod of 20°C (day) and 18°C (night). Natural light was supplemented with phytol lamps (450 $\mu\text{moles m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ of photosynthetically-active radiation (PAR) at canopy height) for 16h. For two additional weeks, seedlings were transferred on hydroponic solution (18 seedlings per 12 L-plastic tank). The basic nutrient solution contained 0.4 mM KH_2PO_4 , 0.15 mM K_2HPO_4 , 2 mM KCL, 3 mM CaCl_2 , 0.2 mM Fe Na EDTA, 14 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 3 μM ZnSO_4 , 0.7 μM CuSO_4 , 0.7 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.1 μM CoCl_2 . This basic nutrient solution was renewed weekly and supplemented twice a week with 1mM KNO_3 and 300 μM MgSO_4 (Figure 37), in order to be in optimal S conditions for growth for non-vernalized rosette plants (*i.e.* vegetative stage). After four weeks, plants were then transferred to 4 L plastic pots (one plant per pot), and were divided in two groups in order to modify the level of their initial S reserves. They were thus initially supplied either with 300 μM SO_4^{2-} (HS_i) or 15 μM SO_4^{2-} (LS_i) for 14 days. At this date (*i.e.* Day 0; Fig. 37), every set was again divided in two groups and treatments were applied during 28 days with either High S solution (300 μM SO_4^{2-} ; HS) or Low S solution (15 μM SO_4^{2-} ; LS), thus generating four treatments: HS_i -HS; HS_i -LS; LS_i -HS and LS_i -LS. In the meantime, overall treatments were continuously double-labeled with ^{15}N (2.51% atom excess) and ^{34}S (2.03% atom excess)

Four plants (*i.e.* replicates) of each of the four treatments were harvested on Day 0 and after 14 and 28 days of treatment. The whole root system, stems, leaf blades and leaf petioles were separated and weighed for determination of their fresh matter. Leaf blade greenness was also determined according to the SPAD 502 (Minolta, Tokyo, Japan). All plant tissues were then frozen in liquid N_2 and stored at -80°C until further isotopic, biochemical and molecular analysis. They were then finally freeze-dried and ground to fine powder for dry weight and N and S determination (Figures. 38, 39 and 41)

Preparation of ^{34}S and determination of N and S contents and remobilization :

Elemental S enriched in ^{34}S (98 % atom excess) was obtained from Trace Sciences international, France. A digestion procedure using 16.5 N HNO_3 was used to convert elemental S to sulphate according to Zhao *et al.*, 1996 and modified by Abdallah *et al.* (2010a).

An aliquot of each plant organ (roots, stems, leaf-blade and or leaf petioles) was placed into tin capsules for isotopic analysis. The total N (^{14}N , ^{15}N) and S contents (^{32}S , ^{34}S) in plant samples were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, United Kingdom) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy):

Total N (N_{tot}) content in a tissue “i” at a given time “t” was calculated as (figure 3A):

$$\text{N}_{\text{tot } i,t} = \%N_{i,t} \times \text{DW}_{i,t} / 100$$

Natural ^{15}N abundance (0.3663 % \pm 0.0004) of atmospheric N_2 was used as a reference for ^{15}N analysis.

Nitrogen derived from current N uptake (N_{upt}) in a given organ was calculated as follows (figure 3B):

$$\text{N}_{\text{upt}} = \text{N}_{\text{tot}} \times (\text{E} (\%) / \text{E}_{\text{NSol}} (\%))$$

where E (%) is the atom % ^{15}N excess in a given organ

and E_{NSol} is atom % ^{15}N excess (2.51%) in the nutrient solution

As for N, total S (Stot) content in a tissue “i” at a given time “t” was calculated as (figure 5A):

$$\text{Stot }_{i,t} = \%S_{i,t} \times \text{DW}_{i,t}$$

For ^{34}S enrichment, the natural isotope abundance of 4.255% was withdrawn to the sample ^{34}S abundance, then sulphur derived from current S uptake (S_{upt}) in a given organ was calculated as follows (Figure 41B):

$$\text{S}_{\text{upt}} = \text{Stot} \times (\text{ES} (\%) / \text{E}_{\text{SSol}} (\%))$$

where ES (%) is the atom % ^{34}S excess in a given organ

and E_{SSol} is atom % ^{34}S excess (2.03%) in the nutrient solution

The remobilized ^{14}N content (N_{mob}) from or towards each tissue between two dates (*i.e.* Day 28 - Day 0) was calculated by subtracting the N derived from uptake between

these two dates (*i.e.* cumulated N taken up; N_{upt}) to the change in total N content ($N_{tot_{Day\ 28}} - N_{tot_{Day\ 0}}$) according to the following equation:

$$N_{mob} (Day\ 28 - Day\ 0) = (N_{tot_{Day\ 28}} - N_{tot_{Day\ 0}}) - N_{upt}$$

Therefore, positive values of mobilized N represent N that is mobilized towards this tissue (*i.e.* imported), while negative values correspond to a net mobilization of N from this tissue (*i.e.* exported; Table IV).

As for N, the mobilized ^{32}S content (S_{mob}) from or towards each tissue between two dates (*i.e.* Day 28 - Day 0) was calculated by subtracting the S derived from uptake between these two dates (*i.e.* cumulated S taken up; S_{upt}) to the change in total S content ($S_{tot_{Day\ 28}} - S_{tot_{Day\ 0}}$) according to the following equation:

$$S_{mob} (Day\ 28 - Day\ 0) = (S_{tot_{Day\ 28}} - S_{tot_{Day\ 0}}) - S_{upt}$$

Therefore, positive values of mobilized S represent S that is mobilized towards this tissue (*i.e.* imported), while negative values correspond to a net mobilization of S from this tissue (*i.e.* exported; Table IV).

Determination of sulphate, total amino acids and soluble proteins contents

Sulphate and total amino acids contents were measured by extracting 30 mg of freeze-dried plant material in 1.5 ml of 50% ethanol solution at 40°C for 1h. After centrifugation (20 min; 10 000 g) the supernatant (called S1) was recovered and 1.5 mL of 50% ethanol were added to the pellet. After a new incubation (1h; 40 °C) and centrifugation (20 min; 10 000 g), the remaining supernatant was taken up and added to the previous supernatant (S1). All these operations (*i.e.* incubation and centrifugation) were repeated twice but with 1.5 mL ultra- pure water and incubation at 95 °C. All supernatants were finally pooled then air-dried for 16h without heating. The dry residues containing sulphate and total amino acids were solubilized in 1 mL of ultra- pure water. Thereafter, sulphate concentrations in the extracts were determined by using ion chromatography (Dionex DX100, with conductivity detector). The eluent solution consisted of 1.8 mM Na_2CO_3 and 1.7 mM Na_2HCO_3 and was pumped isocratically over an AS17 guard column (Figure 42B). Total amino-acids content was analysed by spectrophotometry at 570 nm using a ninhydrin assay (80 mg $SnCl_2$ in 50 mL citrate buffer at 200 mM, pH 5.0, mixed with 2 g ninhydrin in 50 mL dimethyl sulfoxide; Figure 40B).

Lastly, soluble proteins were extracted from 200 mg FW of frozen leaf blade samples, mechanically crushed with 500 µL of citrate Na-phosphate buffer (20 mM citrate and 160 mM Na₂HPO₄, pH 6.8). The homogenate was centrifuged at 12 000 g, 4 °C for 1 h and the resulting supernatant was used to determine the concentration in soluble protein contents by protein–dye staining (Bradford, 1976), using bovine serum albumin (BSA) as standard, with three replicates for each sample (Figure 40A).

RNA extraction, reverse transcription (RT) and semi-quantitative PCR analysis

Total RNA was extracted from 200 mg of leaf blade fresh matter as previously mentioned by Abdallah *et al.*, (2010a). For RT, 1 µg of total RNA was converted to cDNA with 'iScript cDNA synthesis kit' according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). Semi-quantitative PCRs were obtained using specific primers for *BnCab* gene (*LHB1B2*, Accession no: DQ355993) and primers shared by *BnSAG12-1* (Accession no: AF089848) and *BnSAG12-2* (Accession no: AF089849) genes. EF1- α gene (Accession no: DQ312264), was used as an internal control gene (Nicot *et al.*, 2005; Etienne *et al.*, 2007). PCRs were performed with Qbiogene Taq polymerase (MP Biomedicals, Illkirch, France) according to the manufacturer's protocol. From each sample, three RT reactions were made, followed by two independent PCRs, and the corresponding data did not show significant variation of the steady-state transcript level, indicating that the PCR method was greatly reproducible.

Quantitative-PCR (Q-PCR) analysis

Q-PCR amplification and relative expression of tonoplastic (*i.e.* *BnSultr.4.1* and *4.2*) sulphate transporters were performed as previously described by Dubousset *et al.* (2009) and Abdallah *et al.* (2010a). Lastly, the rate of senescence progression was studied using the method developed by Gombert *et al.* (2006). On day 28, for each plant, *BnSAG12* and *BnCab* gene expression levels were followed as a function of leaf rank, and their expression levels were expressed as a percentage of the maximum of both transcripts obtained in overall studied leaf ranks.

For each sample, the subsequent Q-PCR reactions were performed in triplicate and the relative expressions in each sample were compared to the control sample (corresponding to control plants (+S) on Day 28) and were determined with the delta-delta Ct method using the following equation (Livak and Schmittgen, 2001):

● HS_i - HS ○ HS_i - LS
 ● LS_i - HS ○ LS_i - LS

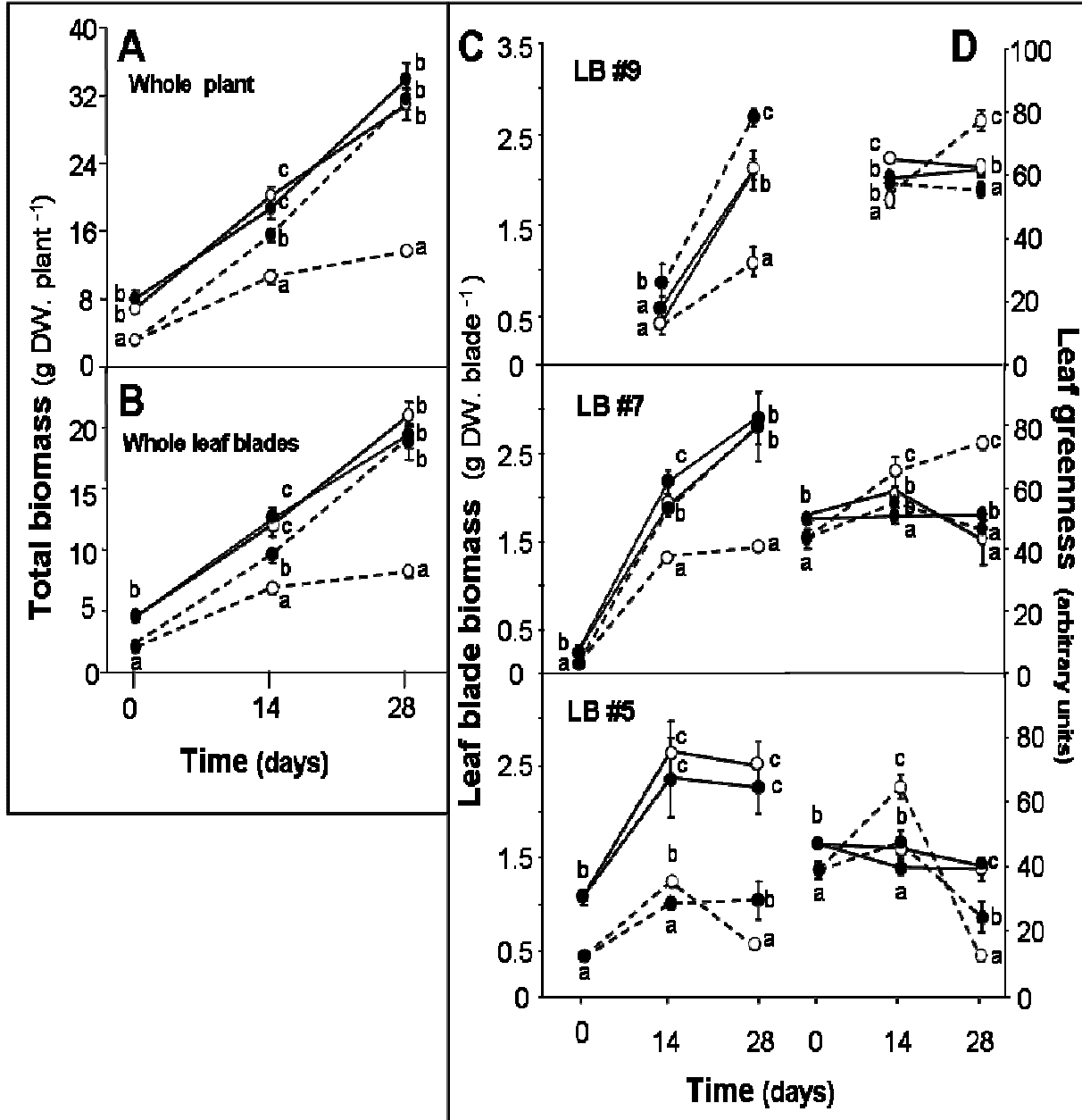


Figure 38: whole plant, (B) whole leaf blades, (C) leaf blade biomass and (D) SPAD values of leaf blades (LB) of leaf rank #5, 7 and 9 (*i.e.* LB #5, 7 and 9) of plants initially grown either with high S (HS_i; solid line) or low S (LS_i; dotted line) and submitted during 28 days to high S (HS; closed circles) or low S (LS; open circles) treatments. Vertical bars indicate ± s.e. of the mean for $n = 4$ when larger than the symbol.

$$\text{Relative expression} = 2^{-[\Delta\text{Ct sample} - \Delta\text{Ct control at Day 28}]},$$

with $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{BnNrt1.1 or 2.1 or BnSultr.1.1; 1.2; 4.1; 4.2}} - \text{Ct}_{\text{EF1-}\alpha}$

where Ct refers to the threshold cycle determined for each gene in the exponential phase of PCR amplification. Using this analytic method, relative expression of the different genes in the control sample on Day 28 was equal to one (Livak and Schmittgen, 2001), and the relative expressions of other treatments were then compared to the control on Day 28, on this basis (Figures 42 and 43).

Statistical analysis

Results are presented as mean values \pm s.e. for four replicates ($n = 4$). The effects of initial S status and mineral S limitation were determined by ANOVA method, and according to a comparison of the means (Tukey t-Test), with MINITAB13 on windows (Minitab Inc, State College, PA, USA). When the normality law of data was not respected, the non-parametric test of Kruskal - Wallis was used. Statistical significance was postulated for $P < 0.05$ and letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments.

Results

Whole plant and leaf biomass:

Figure 38 presents the influence of initial S status and limited sulphate availability on whole plant, whole leaf blade and leaf blade biomasses of leaf ranks #5, 7 and 9 for High initial S - High S ($\text{HS}_i\text{-HS}$, control plants), High initial S - Low S ($\text{HS}_i\text{-LS}$), Low initial S - High S ($\text{LS}_i\text{-HS}$) and Low initial S - Low S ($\text{LS}_i\text{-LS}$) plants during the 28 days of the experiment. On day 0, overall biomasses of LS_i plants were significantly lower by about 50% than HS_i plants (Figure 38A). Thereafter, whole plant and whole leaf blade biomasses progressively increased for overall treatments during the experiment. Nevertheless, despite reduced initial values, $\text{LS}_i\text{-HS}$ biomass reached values close to that of control plants (*i.e.* $\text{HS}_i\text{-HS}$) on day 28. Conversely, and even if overall biomasses of $\text{LS}_i\text{-LS}$ plants were rather increased during the experiment, these biomasses were yet reduced by more than 2 fold on day 28, when compared to control plants, with 9.3 ± 0.3 against 31.6 ± 3.1 g DW. plant⁻¹ for $\text{LS}_i\text{-LS}$ and control plants, respectively.

Leaf-blade (LB) biomass of three different leaf-ranks, corresponding to old, mature and young leaves (*i.e.* LB #5, 7 and 9, respectively) was also monitored in response to

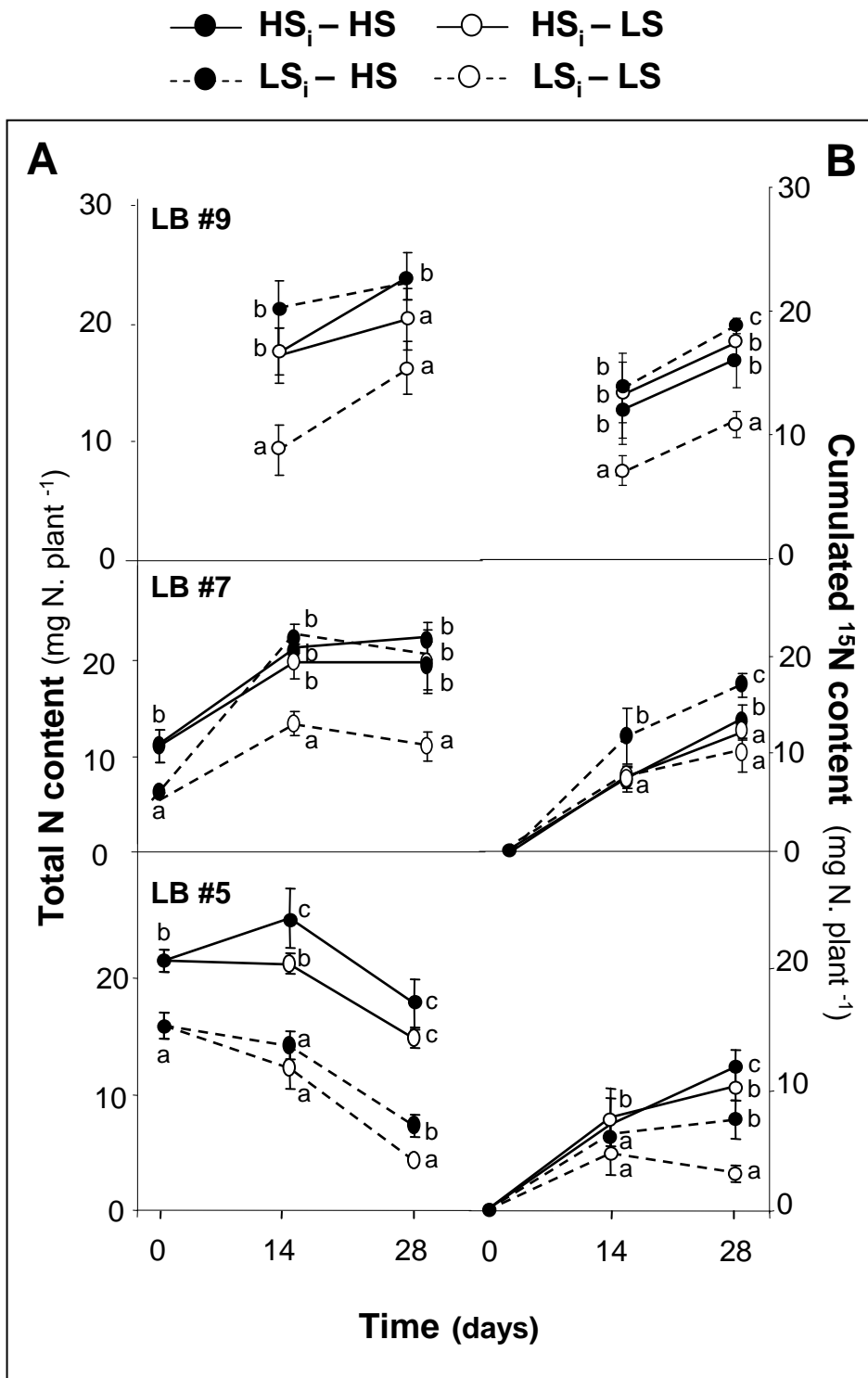


Figure 39: (A) total N and **(B)** total cumulated ¹⁵N content (*i.e.* deriving from uptake) in leaf-blade (LB) of leaf ranks #5, 7 and 9 (*i.e.* LB #5, 7 and 9) of oilseed plants initially grown either with high S (**HS_i**; solid line) or low S (**LS_i**; dotted line) and submitted during 28 days to high S (**HS**; closed circles) or low S (**LS**; open circles) treatments. Vertical bars indicate ± s.e. of the mean for $n = 4$ when larger than the symbol. Note that in figure 3B, values of LS plants are superimposed.

initial S status and S availability (Figure 38C). Except for young leaves, LB biomasses of LS_i plants were significantly decreased by about 50% in average when compared to HS_i plants on day 0. Thereafter, and except for the oldest leaves (*i.e.* LB#5) where they remained relatively constant (or even greatly decreased for LS_i-LS plants) after day 14, these biomasses were greatly increased during the experiment for overall treatments, according to leaf expansion and growth.

The effects of initial S status and sulphate availability on the changes of the leaf greenness (SPAD values, which could be mainly related to chlorophyll content) are presented for LB #5, 7 and 9 (Figure 38D). As observed for biomasses, leaf greenness of LS_i plants were significantly reduced for all leaf ranks on day 0. During the experiment, leaf greenness evolution was thereafter mainly affected by leaf age. Despite an initial increase during the first 14 days for LS_i plants, there was a significant decrease of LB#5 greenness between day 0 and day 28 for overall treatments. This decrease was however more important for LS_i plants where SPAD values reached about 20 in average at the end of the experiment. Lastly, and except for LS_i-LS treatment where leaf greenness increased and reached a maximum value of about 80 SPAD units after 28d, leaf greenness of mature and young leaves (*i.e.* LB #7 and 9) remained relatively constant for overall treatments.

Leaf blade N and cumulated ¹⁵N contents:

The effects of initial S status and limited sulphate availability on total N and cumulated ¹⁵N (*i.e.* deriving from recent uptake) contents are presented in figures 3A and B, respectively. On day 0, and when compared to HS_i plants, total N content was significantly reduced by about 30% in average for both LB #5 of LS_i plants (Figure 39A). Thereafter, and until the end of the experiment, total N content was decreased for overall treatments with the oldest leaves, while it was greatly increased in the meantime for mature and young leaves. On day 28, it then reached about 20 mg. plant⁻¹ in average. Lastly, and irrespective of their leaf nodal position on plant (*i.e.* leaf age), total N content of LS_i-LS plants was always lower than for other treatments.

The increase of total N content was mainly achieved according to the large increase of cumulated N deriving from uptake (*i.e.* ¹⁵N; Figure 39B). For example, and irrespective of the treatment, almost 80% in average of total N is represented by N recently taken up for LB #7 and 9 on day 28. For overall treatments and for the old and mature leaves, the cumulated ¹⁵N content (*i.e.* derived from uptake) was greatly increased during the first 14

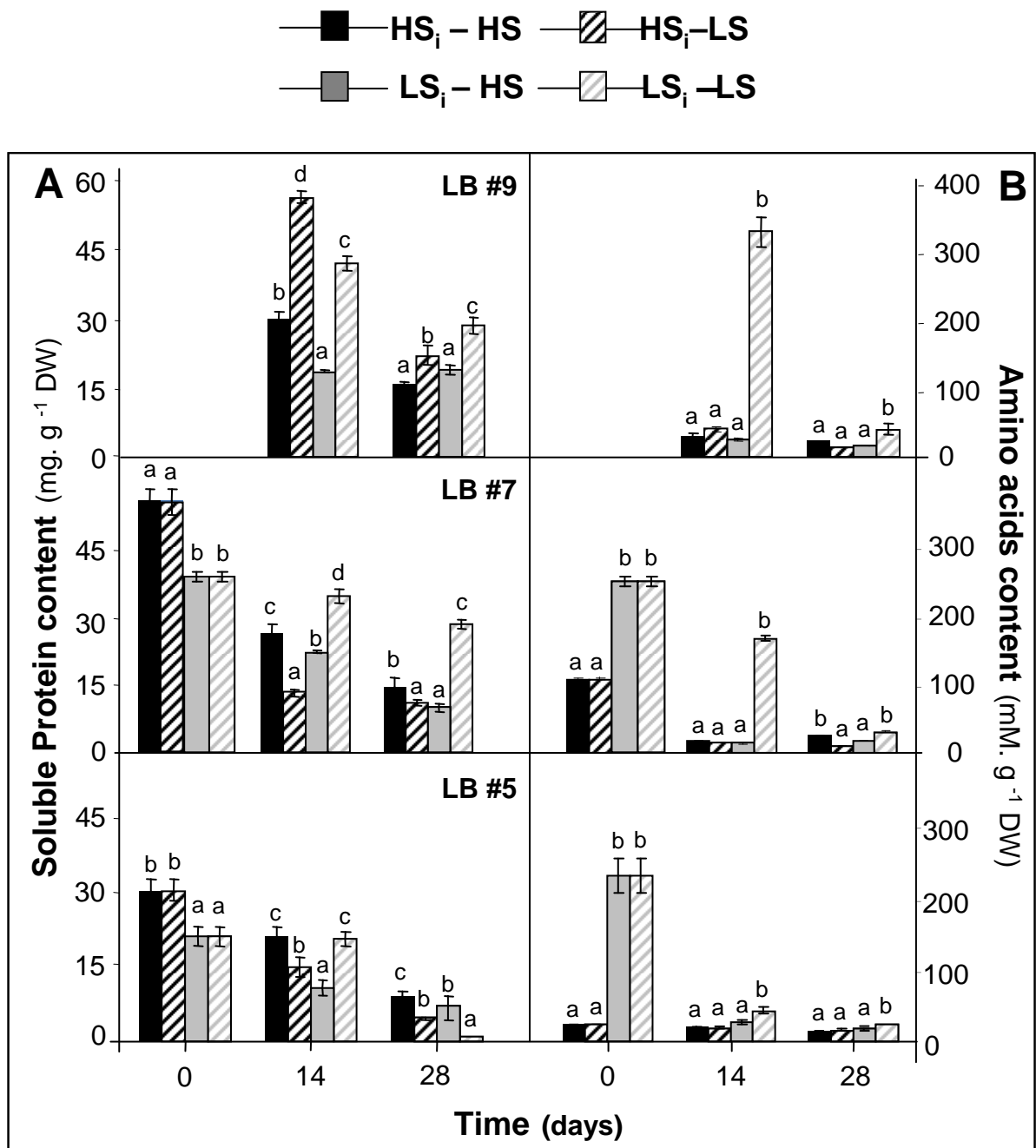


Figure 40: (A) protein and (B) amino acid content in leaf-blade (LB) of leaf ranks #5, 7 and 9 (i.e. LB # 5, 7 and 9) of oilseed rape plants, initially grown either with high S (HS_i; solid line) or low S (LS_i; dotted line) and submitted during 28 days to high S (HS; closed circles) or low S (LS; open circles) treatments. Vertical bars indicate ± s.e. (n=4) when larger than the symbol.

days of experiment. Thereafter, the cumulated ^{15}N content of LB #7 and 9 solely progressed at the same rate for LS_i -HS plants and reached about $13.1 \pm 1.9 \text{ mg N. plant}^{-1}$ in average on day 28 for LB #7. This rate was however significantly reduced for all of the other treatments, and more particularly for LS_i -LS plants where the cumulated ^{15}N content was always significantly lower for overall leaf ranks on day 28.

Leaf blade soluble protein and amino acids contents:

The effects of initial S status and S limitation on soluble protein and amino acids contents in old, mature and young leaf-blades (*i.e.* LB #5, 7 and 9) are presented in figure 4A and B, respectively. On day 0, LS_i plant soluble protein content was significantly reduced of more than 25% in average for LB #5 and 7 (Figure 40A), while amino acid content was greatly increased in the same time (Figure 40B), when compared to HS_i plants. However, within young leaf-blades (*i.e.* LB #9), which appeared during the first 14 days of treatment, soluble protein content was conversely greatly increased for LS_i plants, when compared to HS_i plants. It then reached about $60 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ for HS_i -LS plants, against less than $30 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ on day 14 for control plants (Figure 40A). Thereafter, soluble protein content decreased for overall treatments as leaves mature (*i.e.* as a function of time), and irrespective of their leaf rank. This decrease was however relatively less important for LS than for HS plants. Amino acids content was also greatly decreased in the meantime, but solely during the first 14 days of treatment because values were close to none after this date (except for LS_i -LS plants). Nevertheless, for this treatment, the amino acids content was highly increased during the first 14 days then decreased rapidly until the end of the experiment (Figure 40B).

Leaf blade S and cumulated ^{34}S contents:

Figures 41A and B present the influence of initial S status and limited S availability on leaf blade total S and cumulated ^{34}S contents (*i.e.* derived from recent uptake), respectively. On day 0, total S content of LB #5, was approximately $7 \text{ mg S. plant}^{-1}$ for HS_i plants, against solely about $0.5 \text{ mg S. plant}^{-1}$ for LS_i plants. Thereafter, and irrespective of their leaf rank (*i.e.* their age), total S content was expectedly greatly increased as a function of mineral S availability, whereas it remain stable for LS plants (Figure 41A). This was due to a negligible cumulated ^{34}S uptake, as figure 5B reported it. Conversely, when plants were grown on high mineral S, their total cumulated ^{34}S content was greatly increased, as a result of a massive S uptake throughout the experiment (Figure 41B).

●— HS_i— HS ○— HS_i— LS
 ●--- LS_i— HS ○--- HS_i— LS

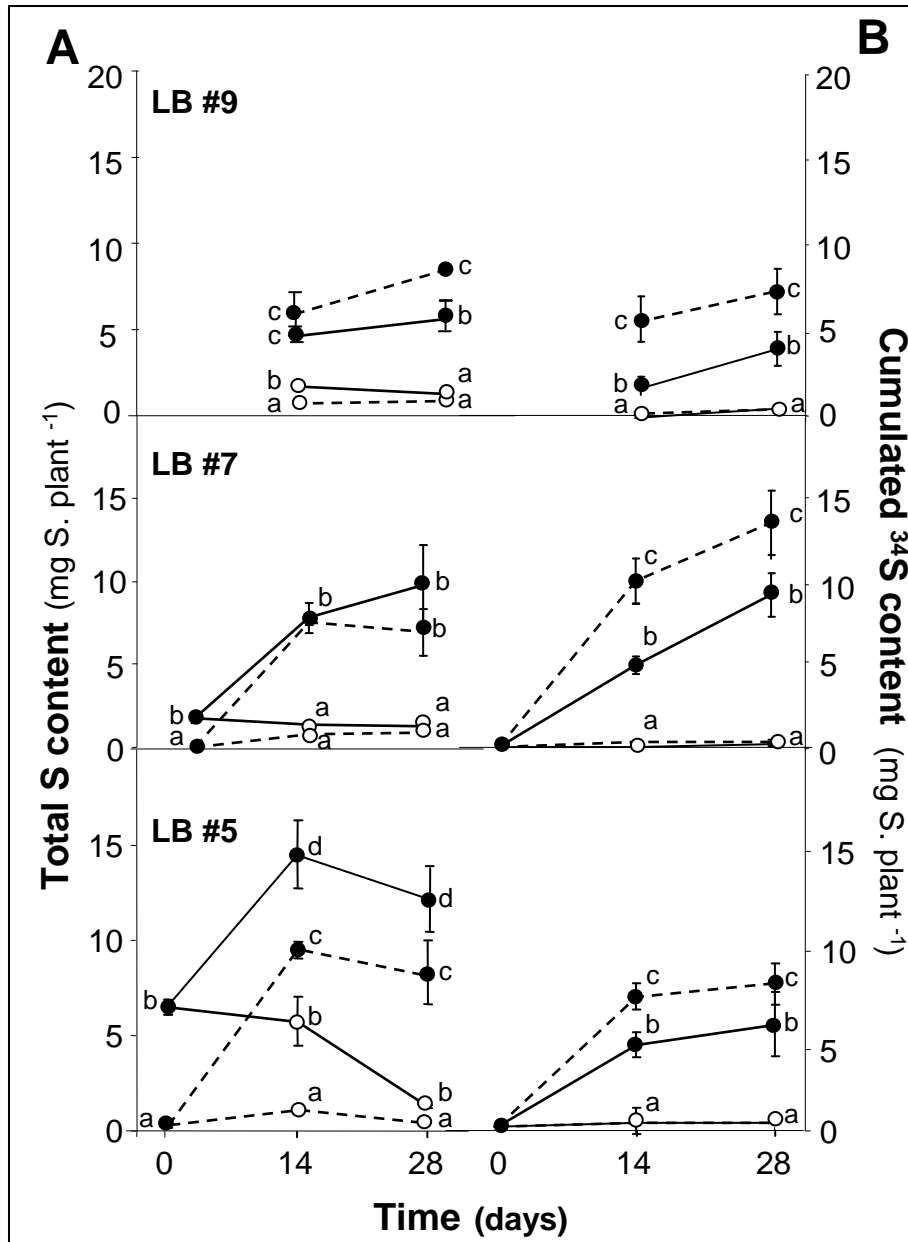


Figure 41: (A) total S and (B) total cumulated ³⁴S content (*i.e.* deriving from uptake) in leaf-blade (LB) of leaf ranks #5, 7 and 9 (*i.e.* LB #5, 7 and 9) of oilseed plants initially grown either with high S (HS_i; solid line) or low S (LS_i; dotted line) and submitted during 28 days to high S (HS; closed circles) or low S (LS; open circles) treatments. Vertical bars indicate ± s.e. of the mean for *n* = 4 when larger than the symbol.

However, this increase of total cumulated ^{34}S content was markedly more important for $\text{LS}_i\text{-HS}$ plants by about 60% en average.

Leaf blade sulphate transporters gene expression and sulphate-S content:

The influence of initial S status and S availability on gene expression level of sulphate tonoplastic transporters *BnSultr 4;1* and *BnSultr 4;2* on day 28 is reported on Figure 42A. Irrespective of their leaf rank (and except for *BnSultr4;1* in LB #5), there was no significant induction of both sulphate transporters for plants with low initial S status but grown on high S (*i.e.* $\text{LS}_i\text{-HS}$), when compared to control plants (*i.e.* $\text{HS}_i\text{-HS}$). However, there was a great increase for both sulphate transporters when plants were grown with low mineral S availability (Figures 42A). For example, this increase was more than 20 times for *BnSultr 4;1* in LR #5 of $\text{LS}_i\text{-LS}$ plants, which was the most induced transporter amongst all treatments for *BnSultr 4;1*. It can also be reported that the relative expression of both sulphate transporters was decreased as a function of leaf youngness for $\text{LS}_i\text{-LS}$ plants, whereas it remained rather constant for $\text{HS}_i\text{-LS}$ plants. As a consequence, in LB #9, the relative expression level of *BnSultr4;1* was close to control on day 28.

The influence of initial S status and S availability on the kinetics of sulphate-S contents within the leaf-blades #5, 7 and 9 of winter oilseed rape are presented on (Figure 42B). On day 0, sulphate-S contents of LB #5 and 7 were almost 10 times greater for HS_i than for LS_i plants. Thereafter, and whatever the initial S status and leaf rank, sulphate-S content was fastly and severely reduced when plants were grown on low S. It was therefore close to negligible values for overall leaf ranks of LS plants since day 14, against almost 6 mg S. plant^{-1} in average in LB #9 of HS plants on day 28. In $\text{LS}_i\text{-HS}$ plants, sulphate was again largely accumulated in all leaf rank and its content was similar to control plants for LB# 7 and 9

Leaf blade ^{14}N and ^{32}S remobilization

Table IV presents the influence of initial S status and S availability on ^{14}N and ^{32}S (*i.e.* deriving from initial endogenous N and S present on day 0) remobilization within leaf blades of leaf ranks #5, 7 and 9 after 28 days of experiment.

The amount of remobilized N from leaves decreased with their rank position, *i.e.* increased with their age, being higher in LB #5 for all treatments. In the older leaf of plants with low S reserves and under S limitation, N remobilization was significantly reduced. Similarly LB #9 acted as a source for N remobilization (positive values) when plant were

		HSi-HS	HSi-LS	LSi-HS	LSi-LS
¹⁴N Remobilization (mg. plant ⁻¹)	LR #9	-0.3 ± 0.0 ^b	2.6 ± 0.9 ^c	-0.6 ± 0.1 ^a	5.1 ± 0.8 ^d
	LR #7	-2.1 ± 0.5 ^b	-3.8 ± 0.6 ^c	-4.9 ± 0.4 ^d	-7.8 ± 0.9 ^a
	LR #5	-15.7 ± 1.5 ^c	-17.2 ± 0.3 ^b	-18.2 ± 0.7 ^a	-14.8 ± 2.0 ^c
³²S Remobilization (mg. plant ⁻¹)	LR #9	-0.6 ± 0.1 ^b	1.3 ± 0.5 ^c	-1.6 ± 0.5 ^a	0.8 ± 0.1 ^c
	LR #7	-0.1 ± 0.0 ^c	-0.8 ± 0.1 ^b	-5.0 ± 1.6 ^a	0.5 ± 0.0 ^d
	LR #5	-2.9 ± 0.4 ^b	-5.4 ± 0.7 ^a	-0.5 ± 0.0 ^c	-0.2 ± 0.0 ^d

Table IV: Day 28 remobilization of ¹⁴N and ³²S (endogenous N and S present on day 0) within leaf blades of leaf ranks #5, 7 and 9 of oilseed rape plants initially grown either with high S (**HS_i**) or low S (**LS_i**) and submitted during 28 days to High S (**HS_f**; closed circles) or Low S (**LS_f**; open circles) treatments. Values are given as the mean ± s.e. (*n* = 4). Different letters indicate that mean values are significantly different between treatments (*P* < 0.05).

submitted to a low S supply and independently of their initial S status (LS_i-HS and HS_i-LS). Therefore, long term S limitation reduced remobilization of N in leaves which is further supported by the higher protein content in these leaves (Figure 40A; LS_i-LS plants) suggesting a delayed senescence.

For S remobilization which occurs to a much lower level than for N, it was increased under low S treatment for high S initial status plants (HS_i-LS) in LB #5 and also in LB #7 with low S plants (LS_i-LS). Moreover, under S limitation, S remobilization was increased towards younger leaves (positive values). Overall, under S limitation, S remobilization was specifically increased in older leaves, while N and S remobilization were increased in a similar manner towards younger leaves.

BnSAG12/BnCab molecular indicator of leaf senescence progression

The relative transcript level of the *BnSAG12* and the Chlorophyll a/b binding protein *BnCab* genes used as indicator of leaf senescence progression are presented in Figure 43 for day 28. Their inverse expression patterns (expressed as % of maximum level of transcripts) reflect the progression of leaf senescence according to leaf age (*i.e.* from older to younger leaves). As a consequence, and irrespective of the treatment, *BnSAG12* relative expression decreased as a function of leaf age, and reached negligible values for younger leaves (senescence is not induced within these leaves), whereas *BnCab* relative expression increased in the mean time. However, senescence progression also appeared to be largely affected by S limitation. Thus, the relative transcript level of *BnSAG12* was kept constant and at its maximal value for leaf ranks #5 and 6 for HS_i plants (and even #7 for HS_i-LS plants), whereas this level was reduced for LS_i plants since leaf rank #5 (where senescence progression appeared to be delayed when compared to control plants). Moreover, amongst LS_i plants, *BnSAG12* progression was faster for LS_i-LS plants. This original behaviour was confirmed by the *BnCab* relative transcript level which was maintained to a relatively high level in older leaves, suggesting that, at the molecular level, senescence processes linked to chlorophyll degradation were delayed under S limitation.

Discussion and conclusions

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is usually considered as particularly sensitive to mineral S limitation (McGrath and Zhao, 1996, Sherer, 2001). However, there is no or few literature which indicates if plant initial S status (*i.e.* the level of S reserves) and mineral S availability can affect leaf senescence (and associated proteolysis) in order to sustain or

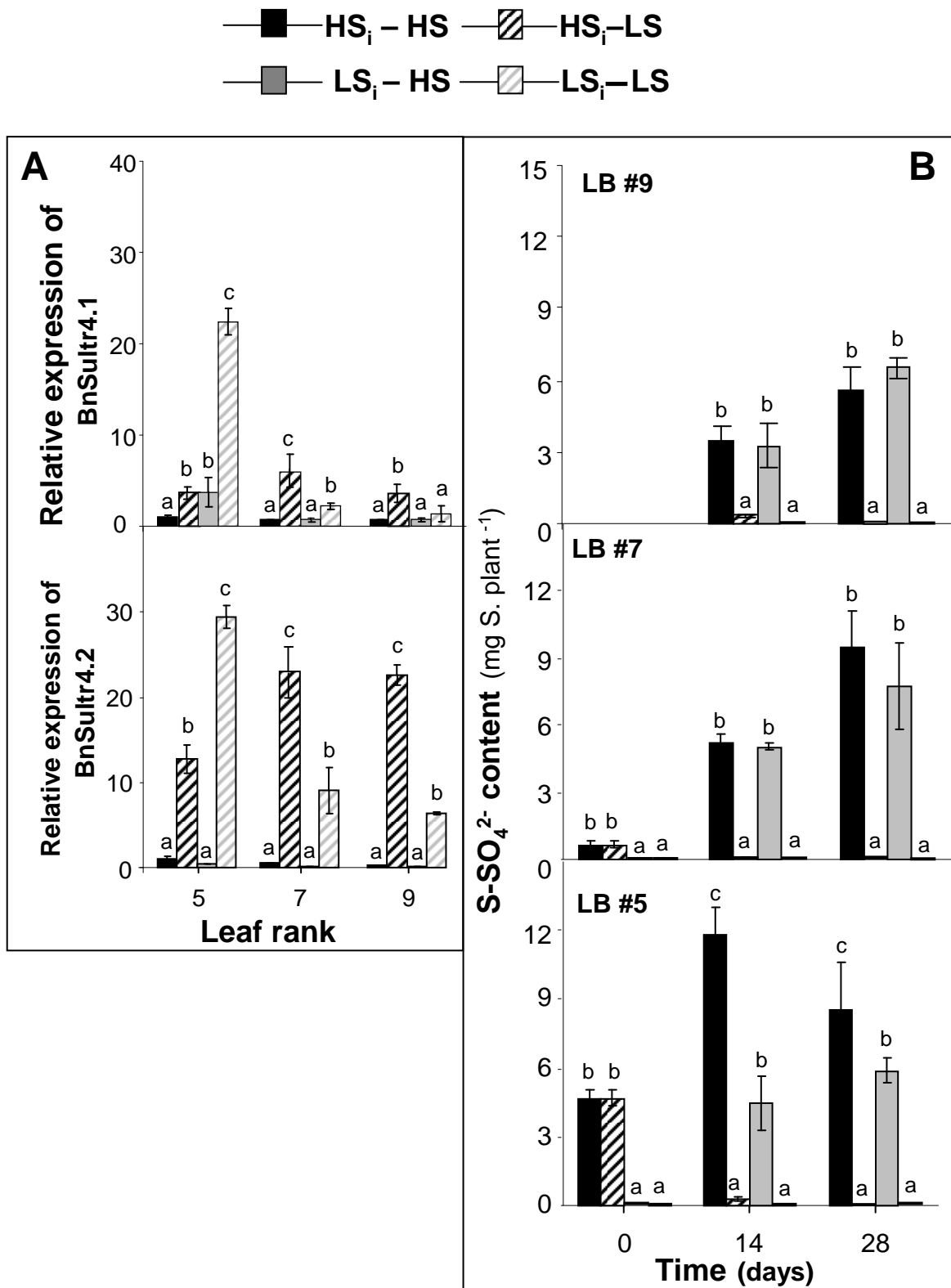


Figure 42: (A) Relative expression of tonoplasmic sulfate transporters *Bnsultr4.1* and *Bnsultr4.2* and (B) sulphate content in leaf-blade (LB) of leaf ranks #5, 7 and 9 (i.e. LB #5, 7 and 9) of oilseed rape plants, initially grown either with high S (HS_i) or low S (LS_i) and submitted during 28 days to high S (HS_f) or low S (LS_f) treatments. Vertical bars indicate \pm s.e. ($n=4$) when larger than the symbol. Values are given as the mean \pm s.e. ($n=4$) of Q-PCR analysis and are expressed relatively to the day 28 control value.

optimize plant growth and development through mobilization of S containing amino-acids derived from proteolysis. Accordingly, we first grew plants during 14 days before the start of our experiment with high or low mineral S availability, in order to obtain plants with contrasted levels of initial S reserves. These plants expectedly had decreased total S, protein and sulphate contents, in parallel with an induction of overall tonoplastic sulphate transporters within their leaves. We therefore evaluated the level of N and S remobilization from these young, maturing and ageing leaves, and we studied two tonoplastic sulphate transporters (*BnSultr.4;1* and *4;2*) as well as leaf senescence associated gene (*BnSAG12*) and chlorophyll a/b binding protein gene (*BnCab*) expression levels.

1) S uptake or S remobilization can compensate for short -term S limitation

When plants had high initial S status and were grown under low S (HS_i-LS) or when plants had low initial S status but were grown on high S (LS_i-HS; both conditions therefore considered as short term S limitations), whole plant or leaf-blade biomass production as well as N uptake were surprisingly unchanged at the end of the experiment, when compared to control plants (*i.e.* HS_i-HS; Figure 38 and 39, respectively).

For HS_i-LS plants, this was mainly achieved according to a two times greater remobilization of endogenous S (Table IV), particularly sulphate (representing more than 70% of whole plant total S; Figure 42B), which was concomitant with an overall up-regulation of *BnSultr.4;1* and *BnSultr.4;2* genes encoding high affinity sulphate transporters known to be particularly implicated in sulphate efflux from the vacuole (Kataoka *et al.*, 2004).

For LS_i-HS plants, this was resulting from a sufficient whole plant S uptake (Abdallah *et al.*, 2010b), even within the different leaf ranks (Figure 41B) where sulphate-S content reached values close to control plants and allowed a complete replenishment of this major S reserve compound (Figure 42B). Accordingly, and because the expression of sulphate transporters (*BnSultr.4;1* and *BnSultr.4;2*) is regulated by sulphate cellular content (Buchner *et al.*, 2004; Kataoka *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 2007), their expression therefore remained to the same level than for control plants within the leaf blades of the different leaf ranks on Day 28 (Figure 42A).

Only for LS_i-LS plants (*i.e.* long-term S limitation) biomass production was severely reduced, according to the fast decline of total S (Figure 41A) and ³⁴S (Figure 41B) contents within the different leaf blades, which was concomitant with a reduction of sulphate contents and an induction of overall sulphate tonoplastic transporters (Figure 42),

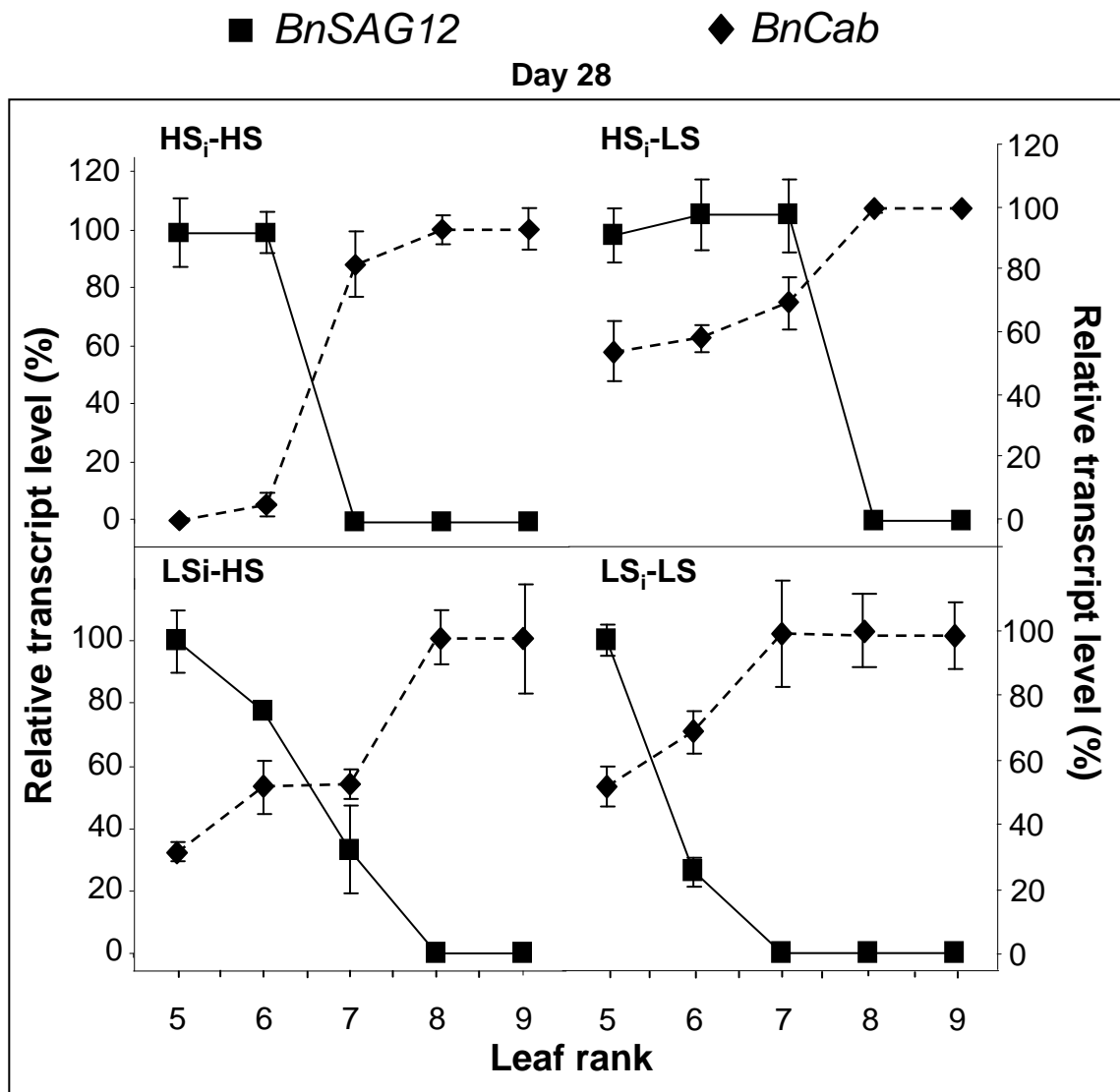


Figure 43: Day 28 relative transcript level of *BnSAG12* and *BnCab* genes in leaf-blade of leaf ranks # 5 to 9 of oilseed rape plants initially grown either with high S (**HS_i**) or low S (**LS_i**) and submitted during 28 days to high S (**HS**) or low S (**LS**) treatments. Vertical bars indicate \pm s.e. ($n=4$) when larger than the symbol. Values are given as the mean \pm s.e. ($n=4$) of PCR analysis and are expressed as relative percentages of the day 28 control value for both genes (*i.e.* *BnSAG12* and *BnCab*).

as several authors already reported it in similar cases of S limitation (Blake-kalff *et al.*, 2001; Kopriva and Koprivova 2004; Koralewska *et al.*, 2007). However, these reductions were concomitant with a significant reduction of both total N and ^{15}N contents, particularly within the leaves, which was due to a significant reduction of whole plant N uptake and a repression of the expression of some root nitrate transporter genes (Abdallah *et al.*, 2010b). As a consequence, and because overall N and S reserves were initially depleted, both endogenous N and S remobilizations were significantly decreased when compared to all other treatments (Table IV).

II) Short or long- term S limitation delays senescence and proteolysis

Resource limitations such as water deficit or mineral N deficiency can induce premature leaf senescence (Gan and Amasino, 1997; Etienne *et al.*, 2007; Diaz *et al.*, 2008). Little is known about the effects of S limitation and only recently Dubousset *et al.*, (2009) reported that leaf senescence can be delayed under S limitation. However, it was suspected that the high leaf S status resulting from plant cultural conditions would have led to this particular process. The present study therefore aimed to verify if S limited plants with contrasted initial levels of S reserves will present delayed leaf senescence dynamics and modified proteolysis.

During leaf senescence, it is generally admitted that protein, lipids and nucleic acids are catabolized, and that the released nutrients are mobilized from older leaves for re-use in other plant parts like developing leaves (Nooden and Guamet, 1996; Quirino *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2003). In our study, we assessed the role of the senescence associated gene *BnSAG12*, encoding a serine protease, and a chlorophyll a/b binding protein gene *BnCab* within three different leaf ranks corresponding to old, mature and young leaves. In a senescent leaf, *BnSAG12* relative expression is therefore reaching its maximum level (Figure 43), thus potentially indicating a significant associated proteolysis. In the mean time, *BnCab* relative expression was down-regulated (Figure 43), which indicates an important degradation of chlorophylls (*i.e.* leaf greenness; Figure 38C) and the associated chlorosis commonly reported for S deficiency (Dietz, 1989 ; Gilbert *et al.*, 1997 ; Ahmed et Abdin, 2000b; Abrol & Ahmad 2003).

At the end of our experiment, and particularly for LSi plants, short or long-term S limitations (*i.e.* LSi-HS or LSi-LS) resulted in a delayed *BnSAG12* gene relative expression, whereas *BnCab* gene relative expression remain to higher levels than for control plants (Figure 43), which was supported by the evolution of leaf greenness (Figure 38C). This

was even the case for HS_i-LS plants where *BnCab* relative expression reached 63% in average for leaf ranks #5 and #6, against 4% for control plants. The decrease of *BnSAG12* relative expression for LS_i plants was also concomitant with a slower decrease of soluble protein contents (*i.e.* proteolysis) within these leaves (Figure 40A). As a consequence, our study reported that short or long-term S limitations involved a delay of leaf senescence, which is concomitant with a reduced leaf proteolysis. Protein content in leaves is the result of the balance between synthesis and proteolysis. The former is probably reduced under S limitation and it is clearly supported by the occurrence of an amino-acid accumulation (Figure 40B). However, according to Kopriva and Rennenberg (2004), S limitation may also trigger the synthesis of specific protein isoforms that contained less S (Nikiforova *et al.*, 2005). On the other hand, proteolysis is probably reduced at the molecular level as illustrated by the delayed up- and down-regulations of *BnSAG 12* and *BnCab* genes, respectively. Additionally, it could be suggested that the synthesis of proteins specifically involved in senescence processes was also reduced. Overall, our results clearly show that the effects of S shortage on leaf senescence are clearly different from those induced by N deficiency *i.e.* increased and decreased senescence in old and young leaves, respectively (Etienne *et al.*, 2007). Our results also suggest that the contribution of S containing amino acids derived from protein degradation to global S remobilization fluxes is probably limited.

This delay of leaf senescence certainly allowed overall exporting leaves to i) remobilize more efficiently their N and S reserves, to ii) preserve the photosynthetic capacities (according to leaf-greenness and *BnCab* expression pattern) of younger leaves and to iii) allow a greater reduction of sulphate taken up in excess in order to maximize plant growth. The delay of leaf senescence may be explained by the modifications of S metabolism related to phytohormones involved in the release of leaf senescence. Whilst about 20% of methionine (*i.e.* the end-product of S assimilatory pathway) is incorporated into proteins, 80% is converted to S-adenosyl methionine (SAM), which is required as a methyl donor for the biosynthesis of ethylene (Giovanelli, 1990; Hoefgen and Hesse, 2007). A decrease of SAM production due to S limitation would provoke a decrease of ethylene production (Hesse *et al.*, 2004), which is an up-regulator of senescence processes (Sakai *et al.*, 1998).

As a conclusion, our study showed that oilseed rape is able under short or long-term S limitation to show a great optimization of its growth through an efficient remobilization of previously accumulated S reserves, mainly sulphate, within its leaves. This mechanism is also concomitant with a delayed senescence which allows a longer and more efficient remobilization of these reserves, and a preservation of leaf photosynthetic capacities, in

order to maximize sulphate uptake and reduction. Only with low initial S reserves and under S limitation, growth was reduced. Because oilseed rape is a *Brassicaceae* known to be particularly demanding for S, our study therefore gave new insights about this particular behaviour and its ability to cope efficiently with S starvation, at least during the first weeks.

Acknowledgements

This work was supported by a PhD grant to Abdallah M. from the Egyptian government. Authors are grateful to Marie Paule Bataillé, Raphael Segura, Marie-Laure Decau and Sandrine Rezé for their skillful help with isotopic mass spectrometry, plant culture, biochemical and molecular analysis.

***CONCLUSION
ET DISCUSSION
GENERALE***

Conclusion et discussion générale

Le colza (*Brassica napus* L.) est largement cultivé dans le monde pour ses graines riches en protéines (22%) et surtout en huile (environ 45%) pour la production de biolubrifiants, de tensio-actifs, de solvants ou encore de biocarburants. Cette dernière production, plus efficace en terme de gain énergétique que le bioéthanol (élaboré à partir de betterave ou canne à sucre), vise à remplacer environ 6% des combustibles fossiles et constitue par ailleurs un des objectifs majeurs de l'Union Européenne en 2010-2012. Cependant, la culture du colza nécessite des quantités importantes d'intrants minéraux, en particulier azotés, ayant fait l'objet de nombreux travaux depuis ces deux dernières décennies (Malagoli *et al.*, 2005 ; Rathke *et al.*, 2006). Ce n'est que plus récemment que toutes les attentions ont été portées sur le rôle des intrants soufrés afin d'optimiser la nutrition azotée et l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA) notamment du fait de la forte inter-connection entre métabolismes azotés et soufrés.

Le soufre est un nutriment essentiel pour la croissance des plantes, qui est principalement disponible sous forme de sulfate (SO_4^{2-}) dans le sol. Il est absorbé par les racines et transporté par le xylème vers les parties aériennes où il est réduit en cystéine (Cys). Cette dernière est ensuite convertie en méthionine (Met) ou incorporée dans des protéines (qui donnent aux tourteaux de colza leur haute valeur alimentaire) ou des peptides comme le glutathion (Saito, 2000; Saito, 2004). Le soufre est également important pour la synthèse de la chlorophylle et est incorporé dans de nombreux métabolites secondaires impliqués dans la défense contre les pathogènes (SDC; Sulphur-containing Defence Compounds) comme les thionines, les défensines, les glucosinolates ou encore les phytoalexines (Hell, 1997). Cependant, le colza, comme la plupart des Brassicacées, est une plante bien plus exigeante en soufre que la plupart des espèces de grande culture telles que le blé ou le maïs (McGrath et Zhao, 1996 ; Figure 15). Il est donc très sensible à la limitation en S (Sherer, 2001). On observe toutefois une oligotrophisation en soufre dans les sols depuis près de trois décennies (McNeill *et al.*, 2005), qui résulte de la mise en place de systèmes de prévention et de lutte contre la pollution soufrée par voie atmosphérique d'origine anthropique. Par conséquent, les cultures soumises à la limitation actuelle en S des sols voient leurs capacités de photosynthèse et de croissance réduites (Bouranis *et al.*, 2006), avec des conséquences négatives sur les performances agronomiques comme la qualité des graines et le rendement (Janzen et Bettany, 1984;

Scherer, 2001). L'application d'une fertilisation raisonnée apparaît donc comme un objectif majeur, notamment afin d'améliorer l'efficacité d'utilisation du soufre (EUS) mais aussi et en particulier celle de l'azote (EUA). Cette amélioration de l'EUS, et accessoirement de l'EUA, est à l'heure actuelle très peu documentée dans la littérature. Par ailleurs, un nombre assez important de travaux réalisés au sein de l'UMR INRA EVA a montré que le contenu en azote des graines du colza dépend assez largement du potentiel de remobilisation de l'azote foliaire lors de la sénescence (Rossato *et al.*, 2002 ; Malagoli *et al.*, 2005). De nombreux auteurs ont aussi mis en évidence l'influence du niveau de disponibilité en N du sol sur le prélèvement du S minéral, sa distribution et son assimilation au sein de la plante (Fismes *et al.*, 2000) . Ainsi, des apports élevés de N minéral peuvent aggraver une situation de carence en S et affecter négativement la qualité de l'huile (Asare et Scarisbrick, 1995 ; Ahmad et Abdin, 2000a ; Ahmad *et al.*, 2007). En revanche, il n'existe que très peu de travaux décrivant les mécanismes et l'importance d'une mobilisation du soufre à l'échelle de la feuille ou de la plante entière, en réponse au niveau de fertilisation soufrée appliquée (Dubousset, 2009).

Afin d'atteindre cet objectif, il est nécessaire de posséder une meilleure connaissance de la dynamique et de la gestion du S et du N de colza soumis à des limitations plus ou moins longues de la disponibilité en S exogène.

Dans ce cadre, ma thèse visait à **étudier les effets de la limitation en S exogène sur l'absorption et la remobilisation de composés S, et accessoirement N, au niveau de la plante entière, ainsi qu'à l'échelle de différents organes cibles (racines et rangs foliaires), en se limitant dans un premier temps au stade de développement végétatif du colza. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux mécanismes physiologiques et moléculaires intervenant dans le recyclage des composés soufrés et azotés.**

Les différentes expérimentations que nous avons réalisées visaient donc à soumettre des plantes de colza à différents types de limitation de sa nutrition soufrée, allant d'une limitation tardive (Chapitre I des résultats), précoce, ou alternant limitation précoce et réalimentation S optimale (Chapitres II et III des résultats). Les effets physiologiques de ces limitations semblent pouvoir être principalement interprétés en fonction du niveau de réserves S précédemment accumulées et à la capacité du végétal à les mobiliser pour parvenir à maintenir une croissance optimale.

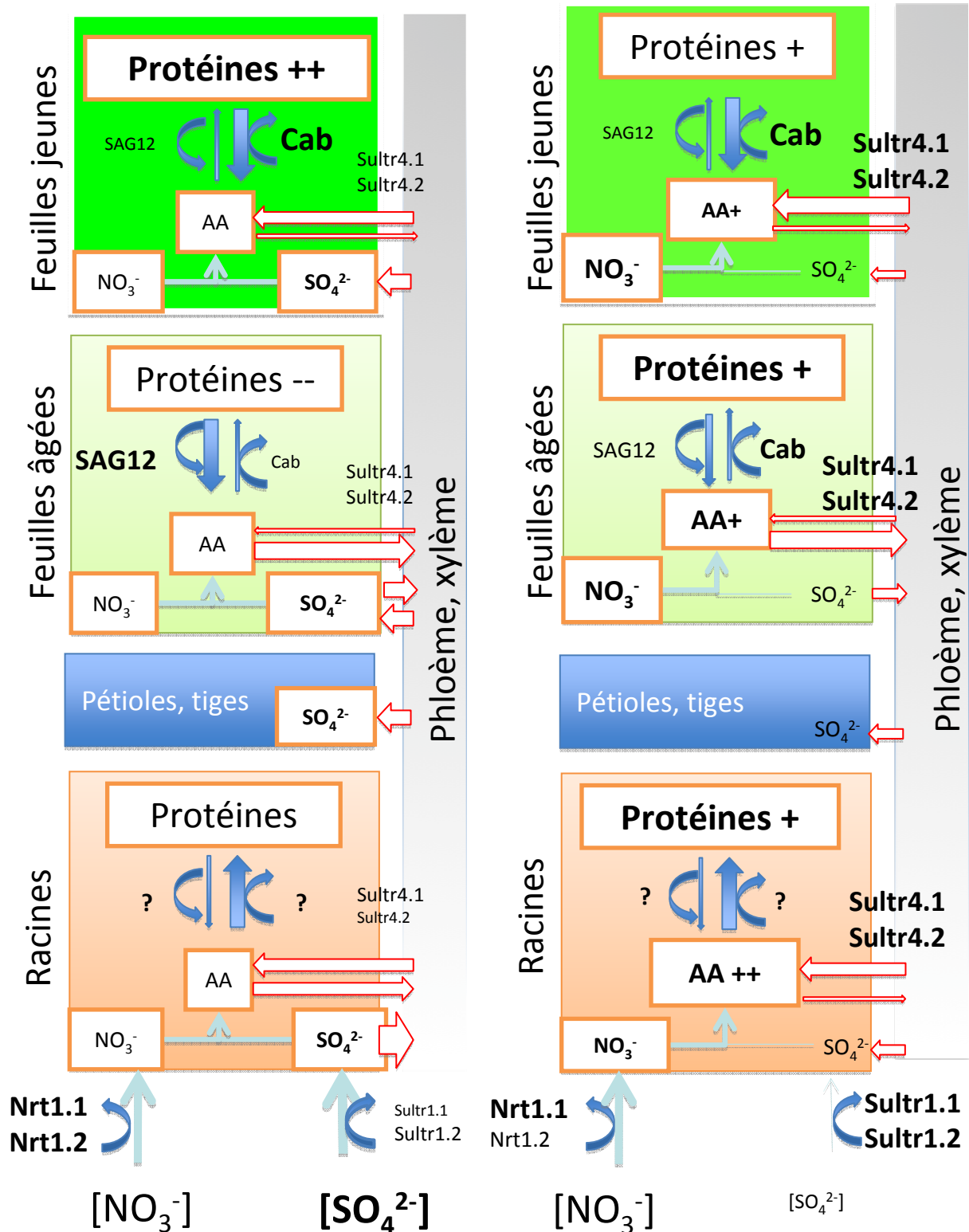


Figure 44 : Schéma de synthèse permettant de présenter les différentes conclusions de la thèse, et de proposer quelques hypothèses. La taille des compartiments et des polices permet d'indiquer l'évolution relative des pools, des flux ainsi que le niveau d'expression de certains gènes cibles, pour des plantes de colza convenablement alimentées en soufre (à gauche) ou soumises à une limitation en soufre (à droite).

Le schéma synthétique, volontairement simplifié et présenté au sein de la (Figure 44), permet de rassembler et de structurer les résultats, d'indiquer les niveaux de méconnaissances subsistant ainsi que de positionner quelques hypothèses.

I) Quel que soit le niveau de limitation en S, le colza met en place et de façon systématique un certain nombre de mécanismes physiologiques et moléculaires :

La baisse de l'absorption du sulfate, en raison de sa faible disponibilité, conduit très rapidement et systématiquement à une augmentation des **transcrits codant des transporteurs de sulfates plasmalemmique racinaires** (*BnSultr1 ;1* et *1 ;2*) et ce, avec une amplification très importante, de plusieurs milliers de fois. Cette induction et/ou dérépression avait été préalablement rapportée dans la littérature. Ces transporteurs à haute affinité sont les plus fortement impliqués dans l'absorption du sulfate par les racines (Parmar *et al.*, 2007 ; Barberon *et al.*, 2008) et dépendent de boucles de régulation complexes (Rouached *et al.*, 2008). Ainsi, selon Kopriva et Rennenberg (2004), l'O-acétyl-sérine (OAS) peut être nécessaire pour la transduction des signaux impliqués dans l'augmentation de l'expression des transporteurs et des enzymes impliquées dans l'absorption et l'assimilation du sulfate. Néanmoins, l'augmentation de l'OAS peut être bloquée lorsque l'azote est en concentration limitante (Kim *et al.*, 1999). Ainsi, lors d'une limitation de la fertilisation soufrée, l'OAS peut exercer un effet positif à la fois sur l'expression des gènes codant les enzymes impliquées dans l'assimilation du sulfate, comme l'adénosine 5'-phosphosulphate réductase (APR) et sur la capacité de l'absorption de sulfate (Rouached *et al.*, 2008).

Parallèlement, les transcrits codant des **transporteurs de sulfates tonoplastiques** (*BnSultr4 ;1* et *4 ;2*), mais aussi impliqués dans le **chargement et le déchargement du xylème des feuilles jeunes ou âgées ont été détectés à des niveaux largement supérieurs chez les plantes limitées en S** (Figure 42A). Cette dé-répression des gènes *Sultr4 ;1* et *Sultr 4 ;2* chez les plantes cultivées dans des conditions limitant en S avait été rapportée par Maruyama-Nakashita *et al.* (2004), Buchner *et al.*, (2004) ainsi que par Parmar *et al.*, (2007).

- L'ensemble de ces mécanismes appréhendés à l'échelle moléculaire se traduit d'une part par un **fort potentiel d'absorption du sulfate lorsque les plantes carencées sont réalimentées en sulfate** (traitement LS₁-HS, Figure 33D) **mais aussi par une disparition d'autant plus forte et rapide du sulfate majoritairement vacuolaire** (Smith

et Lang, 1988; Bell *et al.*, 1990, 1995; Cram, 1990; Sunarpi et Anderson, 1996, 1997; Eriksen *et al.*, 2001, Kataoka *et al.*, 2004), **que la limitation en S est intense**. Cette disparition du sulfate est totale dans les feuilles quel que soit leur âge (Figure 33B), mais elle n'est que partielle dans les racines (Figure 29C). Cette apparente séquestration racinaire de sulfate (environ 2 mg S-SO₄²⁻. g⁻¹ MS) n'a, à notre connaissance, pas été rapportée dans la littérature et nous reviendrons plus tard sur ce résultat.

-la remobilisation du soufre est un processus que l'on trouve chez une plante normalement alimentée en S (Figure 27) Celle-ci intervient alors essentiellement à partir des feuilles et au profit des tiges, des racines et des pétioles. On pourrait alors émettre l'hypothèse que le sulfate est réduit massivement au niveau foliaire et que ce sont ses produits d'assimilation qui sont mobilisés vers des tissus ayant des capacités réduites de réduction, tels que les racines. Nous n'avons cependant pas identifié les formes de transport du S au sein du xylème ou du phloème (cf perspectives) bien qu'il ait été décrit que le sulfate pouvait être présent dans les deux (Yoshimoto *et al.*, 2003; Gojon *et al.*, 2009). **A l'échelle de la plante entière, une limitation en S se traduit, non pas par une augmentation du flux total de S remobilisé mais par une redistribution préférentielle aux racines** (Figure 27). Cette priorité d'allocation du S remobilisé vers les racines est par ailleurs confirmée par l'allocation préférentielle du S issu de l'absorption vers cet organe (13% chez le témoin versus 60% chez la plante limitée en S). Ce processus se fait donc au détriment des tiges et des pétioles mais aussi des feuilles les plus jeunes (Figure 28 et Tableau III). Selon Hawkesford, (2000) l'une des stratégies face une carence nutritionnelle, ici soufrée, consiste à favoriser la croissance racinaire. Nos résultats ne vont pas exactement dans ce sens, puisque nous avons montré que la croissance racinaire est au mieux maintenue mais pas augmentée (Figure 32C).

- les effets sur le métabolisme de l'azote sont affectés différemment par l'ampleur de la limitation de la disponibilité en S. Toutefois l'expression du transcrit *BnNRT1.1* codant un transporteur de nitrate à faible affinité n'est pas significativement affectée (Figure 36A).

II) Dans le cas de limitation en S appliquées tardivement (Chapitre I des résultats et traitement HS_i-LS des chapitres II et III) :

La croissance de la plante entière n'est pas affectée (Figure 26, Figure 32), pas plus que celle des tissus foliaires ou racinaires. Ces résultats *a priori* surprenants sont toutefois

en accord avec des études de terrain menées par *Zhao et al.*, (1993) où il a été démontré qu'il n'y avait aucune différence significative dans l'accumulation de matière sèche pour deux génotypes différents de colza (Bienvenu et Cobra) qui ont été cultivés avec 0 ou 100 kg S. ha.⁻¹. Koralewska. *et al.*, (2007) ont également observé chez le chou frisé (*Brassica oleracea* L.) un maintien de croissance en dépit de faibles concentrations en sulfate dans la solution nutritive. Le maintien de la croissance que nous avons constaté a été réalisé:

➤ malgré une très faible absorption de sulfate (Figure 26B, Figure 33D), qui conduit au fait que **la quantité de S à l'échelle de la plante entière est quasiment maintenue constante** (Figure 33C).

➤ **la répartition du S total est par contre modifiée, avec une diminution dans les feuilles âgées au profit des racines** (Figure 28), qui traduit une augmentation de la remobilisation en particulier des feuilles les plus âgées (Tableau IV) vers les racines.

➤ **des quantités de S précédemment accumulées et en particulier sous forme de sulfate, suffisamment importantes pour qu'elles puissent permettre à la plante une remobilisation significative de S**, compensant ainsi le déficit d'absorption. Nos observations montrent que le sulfate peut ainsi s'accumuler, contrairement au nitrate, à des niveaux particulièrement élevés aussi bien dans les racines mais surtout dans les feuilles. **Le S-SO₄²⁻ peut ainsi représenter jusqu'à 86% du S total des feuilles et peut alors constituer ainsi une réserve S suffisante** pour que les plantes présentent une relative insensibilité à une limitation en S de courte durée. Toutefois, nos plantes ayant été cultivées en conditions contrôlées et donc dans une situation potentiellement optimale d'alimentation en S, il paraîtrait nécessaire de s'assurer que de telles accumulations puissent aussi intervenir en conditions de plein champ (cf perspectives).

➤ **les teneurs en S diminuent** donc dans tous les tissus, ce qui s'accompagne par une **augmentation importante du rapport N/S total** (Chapitre I, Figure 29A) dans tous les organes, **mais aussi du ratio N organique/S organique** (Chapitre I, Figure 29B) dans tous les tissus à l'exception des racines. Ce dernier élément met en exergue le fait que la stratégie de la plante est donc de maintenir de façon prioritaire la croissance et l'activité métabolique de ces racines. Dans ce sens, les effets d'une carence en S, notamment pour

le maintien ou la stimulation de la croissance racinaire se rapprochent de ceux intervenant pour la N ou le P (Gojon *et al.*, 2009).

➤ **l'absorption de N et en particulier du nitrate n'est pas affectée par une limitation en S tardive, de courte durée** (Figure 26A) pas plus que les niveaux d'expression des gènes *BnNrt1.1* et *2.2* (Figures 36A et B). Ceci aboutit donc à une accumulation de N identique entre plante témoins et tardivement limitées en S (Figure 33A). Ces résultats sont également surprenants au regard de la littérature existante. Généralement, on considère que la disponibilité en S peut influencer l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA) et *vice-versa* (Schnug *et al.*, 1993; Fismes *et al.*, 2000). De nombreux auteurs ont aussi indiqué que la disponibilité minérale en N et en S peut modifier la gestion du N et du S par la plante (Janzen et Bettany, 1984; Kopriva et Rennenberg, 2004). En outre, des approches métabolomiques menées chez *Arabidopsis thaliana* montrent que le métabolisme N est fortement affecté par une carence en S et aboutit à une accumulation de nitrate, de sérine, de tryptophane et d'OAS et à une réduction de teneurs en cystéine (Nikiforova *et al.*, 2005). Dans nos conditions expérimentales, la limitation en S a commencé après une période de 51 jours pendant laquelle les plantes ont été alimentées avec un niveau optimal de sulfate. Les différences que nous avons observées par rapport à la littérature peuvent donc s'expliquer par la présence de réserves soufrées non négligeables, en particulier sous forme de sulfate qui ont été mobilisées.

III) Une limitation en S appliquée précocement ou de longue durée (traitements LSi et LSi-LS des chapitres II et III) affecte négativement la croissance de la plante entière, en particulier celles des racines et des feuilles:

Koralewska *et al.*, 2007 ont observé qu'une privation totale en sulfate se traduit par une réduction significative de la production de la biomasse. Une réduction de la production de la biomasse sous l'effet d'une carence en S avait déjà été observée chez le colza (Blake-Kalff *et al.*, 1998; Fismes *et al.*, 2000), *Brassica oleracea* (Koralewska. *et al.*, 2007), *Arabidopsis thaliana* (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004 ; Nikiforova *et al.*, 2005) et d'autres Brassicacées comme la moutarde (Ahmed *et al.*, 1999). La réduction de la croissance que nous avons observée lors de carences précoce ou longue, résulte :

➤ d'une **forte restriction de l'absorption du sulfate** (Figure 33D) **malgré une surexpression de l'ensemble des transporteurs** de sulfate racinaires (Figure 36) et foliaires (Figure 42A),

➤ de **réserves en S et en particulier de sulfate, peu abondantes et rapidement mobilisées** (Figure 42B), qui ne suffiront pas à maintenir la croissance de la plante avec une absorption aussi faible,

➤ d'une **réduction de l'absorption du nitrate (Figure 33B), associée à une diminution importante de l'expression du gène BnNrt.2.1** supposé coder tout ou partie d'un transporteur de nitrate racinaire à forte affinité,

➤ Le déséquilibre entre absorption/mobilisation de S et absorption du nitrate se traduit par **une augmentation significative des teneurs en acides aminés probablement non soufrés** aussi bien dans les racines (Figure 35C) que dans les feuilles (Figure 40B). Compte tenu des connaissances relatives à la régulation de l'absorption du nitrate (Touraine *et al.*, 2001; Forde, 2002; Beuve *et al.*, 2004; Gojon *et al.*, 2009), on peut facilement émettre l'hypothèse que cette accumulation d'acides aminés (probablement sous forme d'amides) conduise à une régulation négative de l'absorption du nitrate et de l'expression de *BnNrt2.1*. Nos résultats concordent avec ceux observés chez le pois par Macnicol et Randall (1987) et *Arabidopsis thaliana* par Nikiforova *et al.*, (2005). En effet, ces auteurs ont montré que la carence en S provoque une accumulation d'acides aminés non soufrés tels que l'arginine, l'asparagine et le glutamate dans les feuilles, les racines et les graines. Cette accumulation d'acides aminés contribuerait à promouvoir selon Kopriva et Rennenberg (2004), la synthèse d'isoformes protéiques pauvres en acides aminés soufrés.

➤ Une autre conséquence liée à ce déséquilibre N/S se traduit par le fait que **la disparition du sulfate des feuilles s'accompagne d'une accumulation de nitrate**. Ce processus ne se fait pas réellement de façon proportionnelle, puisque le nitrate s'accumule uniquement lorsque les teneurs en $S-SO_4^{2-}$ sont négligeables. Une première hypothèse pour expliquer cette accumulation de nitrate pourrait reposer sur une baisse de l'activité NO_3^- réductase sous l'effet de la carence en S comme précédemment suggéré par Reuveny *et al.*, (1980). Alternativement, compte tenu de l'accumulation potentiellement élevée du sulfate dans les feuilles, on peut penser que ce dernier contribue au potentiel osmotique et que sa disparition sous l'effet d'une limitation, pourrait partiellement être compensée par une accumulation de nitrate. Un tel processus de

compensation osmotique avait été démontré chez *Lolium perenne* L. entre le nitrate et le chlorure (Ourry *et al.*, 1989).

➤ Enfin, les effets d'une limitation de longue durée en S sur le métabolisme azoté, outre l'accumulation d'acides aminés se traduit par **un défaut de dégradation des protéines au sein des feuilles** et ce, quel que soit leur âge (Figure 40B). Ce résultat est assez surprenant puisque l'on aurait pu penser que la dégradation des protéines en particulier dans les feuilles âgées aurait pu permettre à la plante de bénéficier d'un recyclage supplémentaire de composés soufrés en particulier de méthionine et de cystéine. Parallèlement, les teneurs en chlorophylles restent plus élevées (Figure 38D du chapitre III) alors que l'expression du gène *BnSAG12* (gène associé à la sénescence foliaire ; Senescence Associated Gene) est retardée, et celle de *BnCab* (codant une Chlorophyl a/b Binding Protein) maintenue plus longtemps (Figure 43). L'ensemble de ces données suggère donc fortement qu'**une carence en S réduit la progression de la sénescence foliaire**. Ce résultat surprenant et original, montre que les mécanismes sont ainsi très différents d'une carence en N, qui pour sa part tend à augmenter la sénescence des feuilles âgées et à la réduire dans les feuilles les plus jeunes (Etienne *et al.*, 2007). Au cours de la sénescence des feuilles, il est généralement admis que les protéines, les lipides et les acides nucléiques sont dégradés, et que les nutriments libérés sont mobilisés à partir de vieilles feuilles et sont réutilisés dans d'autres parties de la plante comme les feuilles en développement (Lim *et al.*, 2003; Nooden et Guamet, 1996; Quirino *et al.*, 2000). Les contraintes abiotiques telles que le déficit hydrique ou la carence en N minéral peuvent induire la sénescence des feuilles (Gan et Amasino, 1997; Smart, 1994, Etienne *et al.*, 2007; Diaz *et al.*, 2008). **Hawkesford et De Kok (2006) ont suggéré que parmi les réponses possibles à une limitation de la disponibilité en S, une induction de la sénescence foliaire devrait se manifester chez les plantes à fleurs** lorsque les besoins en S pour les organes en croissance n'auront pu être satisfaits ni par remobilisation endogène ni par absorption de sulfate. **Cependant, cette réponse hypothétique déduite d'analyses transcriptomiques et métabolomiques réalisées chez *Arabidopsis* (Nikiforova *et al.*, 2005) n'avait jusqu'à ici pas été vérifiée chez le colza**. On pourrait donc émettre l'hypothèse que lors de carence sévère en S, la stratégie du colza consiste à réduire la sénescence foliaire pour maintenir la fonctionnalité de l'ensemble de l'appareil photosynthétique et ainsi continuer à alimenter en photoassimilats les racines et ne pas limiter l'absorption et la réduction du nitrate et du sulfate.

Globalement, l'ensemble de ces résultats démontre que les effets d'une carence en S doivent être appréhendés en prenant en compte le statut initial soufré de la plante, et en particulier le niveau d'accumulation de sulfate. De façon originale et probablement en raison du faible nombre d'équipes maîtrisant le marquage ^{34}S , nous avons pu quantifier les remobilisations de S à l'échelle de la plante sous l'effet de carences variées en S. Contrairement à ce qui est classiquement admis dans la littérature (Sherer, 2001), la sensibilité du colza à une carence en S et ses conséquences physiologiques ne sont donc ni simples ni triviales. Nous avons ainsi pu montrer que la plante met en place des processus de compensation par mobilisation des réserves S, qui sont d'autant plus efficace qu'elles ont été accumulées à un niveau élevé. Ces mécanismes compensatoires peuvent ensuite largement expliquer la réponse du végétal que ce soit en termes de croissance ou d'interactions avec le métabolisme azoté. Toutefois, un certain nombre de travaux restent requis et font l'objet des perspectives suivantes.

PERSPECTIVES

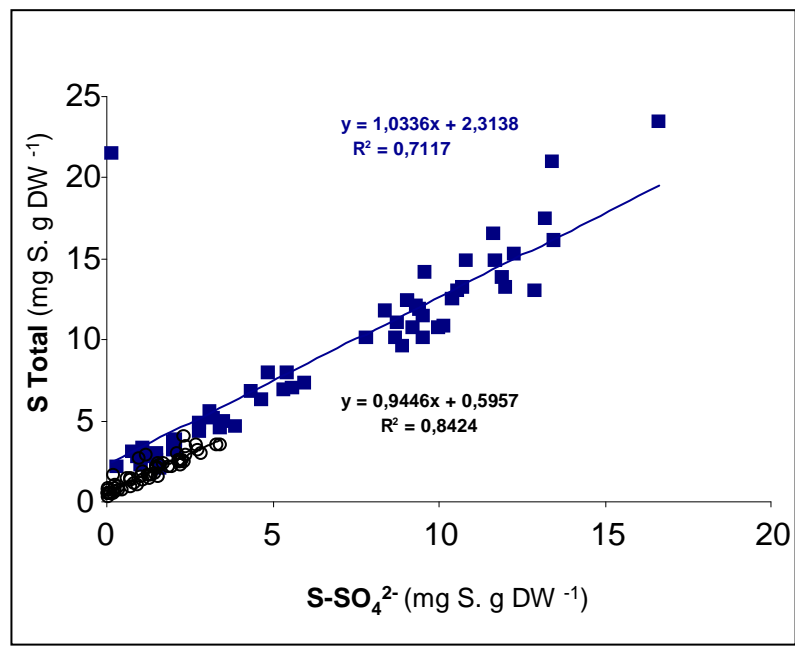


Figure 45 : Relations linéaires entre la teneur en soufre et en sulfate des tiges (ronds creux) et des feuilles (carrés pleins) de différentes variétés de colza au sein de 57 parcelles agricoles réparties au sein du département du calvados, échantillonnées au stade G4 en 2009. Les niveaux de fertilisation soufrée s'évaluaient sur une gamme allant de 0 à 130 kg S. ha⁻¹. D'après Sarda *et al.*, en cours de soumission.

Perspectives

Un certain nombre d'hypothèses peuvent être formulées à la suite de ce travail et pourraient générer des travaux expérimentaux à différentes échelles :

1) L'un des principaux résultats que nous avons obtenu démontre la capacité du colza à faire face à une limitation en S grâce à son potentiel de remobilisation du S et en particulier du sulfate. Toutefois, cette observation a été réalisée en conditions de culture hydroponique qui peuvent favoriser l'accumulation de composés comme le sulfate. **La validité de nos travaux nécessiterait quelques informations issues de plantes cultivées au champs afin par exemple de déterminer si la teneur en sulfate peut être potentiellement aussi élevée. Par ailleurs, notre travail suggère que la teneur en sulfate et sa contribution au S total pourrait constituer un indicateur du statut de nutrition soufrée, compte tenu de l'absence d'indicateurs reconnus que ce soit à l'échelle de la plante ou du sol** (hormis l'activité Aryl sulfatase, Dedourge *et al.*, 2003). Dès lors, le recueil d'information sur des cultures de colza au champ pourrait être entrepris à partir de différentes parcelles choisies en fonction des sols (\pm drainant et favorisant le lessivage du sulfate) et de la pluviométrie usuelle. L'analyse (N, S, SO_4^{2-}) du sol, des tiges et des feuilles récoltées aux stades G3-G4, donc proche de leur abscission, mais aussi des graines (rendement, qualité, germination) couplé au recueil des pratiques culturales (fertilisations N et S, génotypes...) permettrait d'obtenir un référentiel sur la variabilité de la teneur en soufre et en sulfate et sur les risques de carences en S. **Ce travail auquel j'ai participé en 2009, est en cours de finalisation, mais il révèle déjà que les ordres de grandeur des teneurs en sulfate des feuilles que nous avons mesurées sont tout à fait compatibles avec les données obtenues au champ.** La Figure 45 montre par exemple qu'il existe pour les 57 parcelles de colza suivies une relation linéaire entre la teneur en soufre et en sulfate pour les feuilles mais aussi les tiges (teneurs plus faibles néanmoins). Ainsi, la teneur en sulfate peut représenter jusqu'à 70 ou 80% du soufre total foliaire et ceci, juste avant l'abscission des feuilles. Dès lors, il apparaît clairement que certaines parcelles disposent de quantités de S (par fertilisation et/ou minéralisation) excédentaires par rapport au besoin de la culture ce qui se traduit par un défaut de remobilisation (jusqu'à 2,3% de S résiduel au sein de la MS). Ceci suggère par ailleurs que la remobilisation du sulfate foliaire est indépendante de la sénescence. A contrario, un certain nombre de parcelles se caractérise par des faibles teneurs en S (0,23% de la MS a minima) et une quasi absence d'accumulation de sulfate, révélant ainsi des conditions de

risques de carence. **Ce travail est actuellement en cours d'exploitation et devrait permettre de valider des indicateurs plantes susceptibles d'identifier *a posteriori* des pratiques culturales ou des parcelles à risques.**

2) L'amélioration du colza sur la base d'une meilleure efficacité d'utilisation du soufre (EUS) n'a fait l'objet que de rares études. **Il s'avère donc indispensable de rechercher de variétés capables de remobiliser le sulfate des parties végétatives au profit des graines pour permettre d'ajuster les apports de S.** Cette sélection de variétés nécessitera au préalable la caractérisation d'indicateurs pertinents pour parvenir à une meilleure EUS. Le suivi du sulfate résiduel des feuilles avant leur abscission pourrait constituer une piste simple.

3) **Il est largement admis dans la littérature que les cultures de colza souffrent potentiellement de carence en S,** mais ces données sont généralement restreintes au Canada (Doherty and Cowell 1993 ; Grant *et al.*, 2004 ; Malhi *et al.*, 2005), ou à l'Asie (Sorimachi *et al.*, 2004). **Peu ou pas d'études sont disponibles pour l'Europe continentale.** Par ailleurs, aucune donnée n'est disponible sur l'utilisation réelle du soufre, car nécessitant comme pour l'azote un marquage isotopique qui reste encore très onéreux pour le ³⁴S. **L'utilisation de petites surfaces, telles que celles de cases lysimétriques pourrait constituer une alternative et permettrait d'évaluer le risque de lessivage des engrais soufrés.**

4) Nos résultats montrent par ailleurs qu'une limitation en S, à défaut d'augmenter quantitativement la remobilisation du soufre contribue à ré-orienter ces flux vers les racines. **Le transport de composés soufrés au sein de la plante et sa régulation constituent donc des processus clés.** Le premier élément de connaissance requis consisterait donc à identifier puis quantifier les composés soufrés impliqués, tels sulfate, glutathion, méthionine, cystéine... **Une analyse quantitative du phloème et du xylème pourrait alors constituer une première approche, permettant de se focaliser sur les transporteurs pertinents et la régulation de leur expression.** Par ailleurs, Yoshimoto *et al.*, 2007, ont montré qu'une carence en sulfate provoque une accumulation de l'ARNm de *Sultr1 ; 3* dans les feuilles et les racines d'*Arabidopsis* et suggère que ce transporteur jouerait un rôle important dans le chargement phloémique. **L'étude du transporteur phloémique à forte affinité (*AtSultr1 ; 3*) principalement impliqué dans le transport à longue distance chez *Arabidopsis*, encore inconnu chez le colza, pourraient être**

intéressante. Une surexpression de ce transporteur pourrait améliorer le recyclage du S (dont une grande partie est perdue lors de la chute des feuilles pendant le stade montaison / floraison avec des teneurs très forte en sulfate) **et donc contribuer à améliorer l'EUS et par voie de conséquence, potentiellement l'EUA.**

5) **Une limitation importante en S conduit** à une accumulation d'acides aminés probablement majoritairement non soufrés et malgré la sénescence, **à des teneurs en protéines solubles qui restent assez élevées.** Ces dernières résultent du turn-over protéique, bilan entre la protéosynthèse et la protéolyse. Selon Kopriva & Rennenberg (2004), l'accumulation d'acides aminés contribuerait à favoriser la synthèse d'isoformes protéiques pauvres en acides aminés soufrés. **Une analyse protéomique contribuerait à identifier de telles protéines et d'en définir les conséquences** (perte d'activité ?). En ce qui concerne la protéosynthèse et la sénescence, on peut aussi s'interroger par rapport à nos résultats. Une carence forte en S contribue à ralentir la sénescence foliaire et l'expression du gène *BnSAG12* codant une protéase à cystéine. La synthèse de *novo* de la protéine SAG12 pourrait être totalement ou partiellement bloquée en l'absence de S. Dès lors, le suivi des activités protéasiques pourrait permettre de déterminer si le maintien d'une forte teneur en protéines solubles résulte d'un défaut d'activité.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abdallah M., Dubousset L., Meuriot F., Etienne P., Avice J-C., and Ourry, A.** (2010a). Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany*. In press
- Abdallah M., Ourry A., Meuriot F.** (2010b). Fluctuations of S availability affect growth, S reserves, ¹⁵N and ³⁴S uptake in *Brassica napus* L.. *Journal of Experimental Botany*. Submitted
- Abrol Y-P., Ahmad A.** (2003). Sulphur in plants, Kluwer Academic Publishers, Netherland.
- Ahmad A., Abraham G., Abdin M-Z.** (1999). Physiological investigation of the impact of nitrogen and sulphur application on seed and oil yield of rapeseed (*Brassica campestris* L.) and mustard (*Brassica juncea* L-Czern. And Coss.) genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science-Zeitschrift fuer Acker und Pflanzenbau* 183, 19±25.
- Ahmad A., Abdin M-Z.** (2000a). Interactive effect of sulphur and nitrogen on the oil and protein contents and the fatty acid profiles of oil in the seeds of rapeseed (*Brassica campestris* L.) and mustard (*Brassica juncea* L. Czern. And Coss.). *Journal of Agronomy and Crop Science* **185**, 49-54.
- Ahmad A., Abdin 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., Khattak R-A.** (2007). Influence of nitrogen and sulphur ferllizatton on quality of canola (*Brassica napus* L.) under rainfed conditions. *Journal of Zhejiang University Science B* **9**,731-737.

Asare E., Scarisbrick D-H. (1995). Rate of nitrogen and sulphur fertilizers on yield, yield components and seed quality of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Field Crop Research* **44**, 41- 46.

B

Balint T., Rengel Z. (2009). Differential sulphur efficiency in canola genotypes at vegetative and grain maturity stage. *Crop and pasture science* **60**, 262-270.

Barberon M., Berthomieu P., Clairotte M., Shibagaki N., Davidian J-C., Gosti F. (2008). Unequal functional redundancy between the two *Arabidopsis thaliana* high-affinity sulphate transporters *SULTRI ; 1* and *SULTR I ; 2*. *New phytologist* **180**, 608-619.

Baxter I., Muthukumar B., Park H-C., Buchner P., Lahner B., Danku J., Zhao K., Lee J., Hawkesford M-J., Guerinot M-L., Salt D-E. (2008). Variation in molybdenum content across broadly distributed populations of *Arabidopsis thaliana* is controlled by a mitochondrial molybdenum transporter (MOT 1). *Public Library of Science Genetics* **4**, e1000004.

Bell C-I., Clarkson D-T., Cram W-J. (1995). Sulphate supply and its regulation of transport in roots of a tropical legume *Macroptilium atropurpureum* cv. Siratro. *Journal of Experimental Botany* **46**, 65-71.

Bell C-I., Cram W-J., Clarkson D-T. (1990). Turnover of sulphate in leaf vacuoles limits retranslocation under sulfur stress. In LJ de Kok, I Stulen, H Rennenberg, CH Brunold, WE Rauser, eds, *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants*. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, pp 3-11.

Beuve N., Rispaill N., Lainé P., Cliquet J-B., Ourry A., Le Deunff, E. (2004). Putative role of aminobutyric acid (GABA) as a long distance signal in up-regulation of nitrate uptake in *Brassica napus* L. *Plant Cell and Environment* **27**, 1035-1045.

Blake-Kalff M-M., Harisson K-R., Hawkesford M-J., Zhao F-J., 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., Zhao J., Hawkesford M., McGrath S.** (2001). Using plant analysis to predict yield losses by sulphur deficiency. *Annals of Applied Biology* **138**, 123-127.
- Blake-Kalff M-M., Zhao F-J., McGrath S-P.** (2002). Sulphur deficiency diagnosis using plant tissue analysis. *Proceeding of the International Fertiliser Society*, 23p.
- Bradford M-M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254
- Buchanan-Wollaston V.** (1994). Isolation of cDNA clones that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. Identification of a gene encoding a senescence-specific methallothionein-like protein. *Plant Physiology* **105**, 313-319.
- Buchanan-Wollaston V., Ainsworth C.** (1997). leaf senescence in *Brassica napus*; cloning of senescence related genes by subtractive hybridization. *Plant Molecular Biology* **33**, 82t-834.
- Buchner P., Stuiver C-E., Westerman S., Wirtz M., Hell R., Hawkesford M-J., De Kok L-J.** (2004a). Regulation of sulfate uptake and expression of sulfate transporter genes in *Brassica oleracea* as affected by atmospheric H₂S and pedospheric sulphate nutrition. *Plant Physiology* **139**, 3396-3408.
- Buchner P., Takahashi H., Hawkesford M-J.** (2004b). Plant sulphate transporters: coordination of uptake, intracellular and longdistance transport. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1765-1773.

C

- Ceccotti S-P.** (1996a). A global review of the nutrient sulphur balance, fertilizers, and the environment. *Agro-Food-Industry Hi-Tech* Nov./Dec, 18-21.
- Ceccotti S-P.** (1996b). Plant nutrient sulphur, a review of nutrient balance, environmental impact and fertilizers. *Fertilizer Research* **43**, 117-125.

- Ceccotti S-P., Messick D-L.** (1997). A global review of crop requirements, supply and environmental impact on nutrient sulphur balance. In: Cram WJ, De Kok LJ, Stulen I, Brunold C, Rennenberg H (eds.), *Sulphur Metabolism in Higher Plants*, Blackhuys Publishers, Leiden, 155-163.
- Clarkson D-T., Saker L-R., Purves J-V.** (1989). Depression of nitrate and ammonium transport in Barley plants with diminished sulphate status: Evidence of co-regulation of nitrogen and sulphate intake. *Journal of Experimental Botany*, **40**, 953-963.
- Coupe S-A., Sinclair B-K., Heyes J-A., Eason J-R.** (2003). Identification of dehydration-responsive cystine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets. *Journal of Experimental Botany* **54**, 1045-1056.
- Cram W-J.** (1983). Sulphate accumulation is regulated at the tonoplast. *Plant Science Letters* **31**, 329-338.
- Cram W-J.** (1990). Uptake and transport of sulfate. In: Rennenberg H, Brunold C, De Kok LJ, Stulen I, eds. *Sulfur nutrition and sulphur assimilation in higher plants: fundamental, environmental and agricultural aspects*. The Hague: SPB Academic Publishing, 3–11.
- Curtin D., Syers J-K.** (1990). Extractability and adsorption of sulphate in soils. *Journal of Soil Sciences* **41**, 305-312

D

- Davidian J-C., Hatzfeld Y., Cathala N., Tagmount A., Vidwar J.** (2000). Sulfate uptake and transport in plants In: *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants: Molecular, Biochemical and Physiological Aspects* (Eds. C Brunold, H. Rennenberg, LJ De Kok, I Stulen, J-C Davidian), pp. 19–40, Paul Haupt, Bern.
- DeBoer D-L., Duke S-H.** (1982). Effects of sulphur nutrition on nitrogen and carbon metabolism in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Physiolgia Plantaroum* **54**, 343-350.

- Dedourge O., Vong P-C., Lasserre-Joulin F., Benizri E., Guckert A.** (2004). Immobilization of sulphur-35, microbial biomass and arylsulphatase activity in soils from field-grown rape, barley and fallow. *Biology and Fertility Soils* **38**, 181-185.
- De Kok L-J., Castro A., Durenkamp M., Koralewska A., Posthumus F-S., Stuiver C-E., yang L., Stulen I.** (2005). Pathways of plant sulfur uptake and metabolism: an overview. *Landbauforschung Völkenrode, Special Issue* **283**, 5-13'
- Dejoux J-F.** (1999). Evaluation d'itinéraires techniques du colza d'hiver en semis très précoces. Analyse agronomique, conséquences environnementales et économiques. Thèse de Doctorat, INA Paris-Grignon, France.
- De Pascale S., Maggio A., Orsini F., Bottino A., Barbieri G.** (2008). Sulphur fertilization affects yield and quality of friarielli (*Brassica rapa* L. subs *sylvestris* L. Janch. Var. *esculenta* Hort.) grown on floating system. *Journal of Horticultural Sciences and Biotechnology* **83**, 743-748.
- Desclos M., Dubousset L., Etienne P., Le Cahérec F., Satoh H., Bonnefoy J., ourry A., Avice J-C.** (2009). A proteomic profiling approach to reveal a novel role of BnD22 (*Brassica napus* drought 22kD)/Water soluble chlorophyll binding protein in young leaves during nitrogen remobilization induced by stressful conditions. *Plant Physiology* **147**, 1830-1844.
- Diaz C., Purdy S., Christ A., Morot-Gaudry J-F., Wingler A., Masclaux-Daubresse C.** (2005). Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in *Arabidopsis*: A metabolic profiling approach. *Plant Physiology* **138**, 898–908
- Diaz C., Lemaître T., Christ A., Azzopardi M., Kato Y., Sato F., Morot-Gaudry J-F., Le Dily F., Masclaux-Daubresse C.** (2008). Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition. *Journal of Plant Physiology* **147**, 1437-1449.

- Dietz K-J.** (1989). Leaf and chloroplast development in relation to nutrient availability. *Journal of Plant Physiology*, **134**, 540-550.
- Dolyle P., Cowell L.** (1993). Sulphur. Pages 202-250 in Impact of macronutrients on crop responses and environmental sustainability in the Canadian prairies. *Canadian Society of Soil Science*. Ottawa, ON.
- Droux M.** (2004). Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynthesis Research* **79**, 331-348.
- Dubousset L., Abdallah M., Desfeux A-S., Etienne P., Meuriot F., Hawkesford M-J., Gombert J., Segura R., Bataillé M-P., Rezé S., Bonnefoy J., Ameline A-F., Ourry A., Le Dily F., 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.** (2009). Effet d'une restriction en sulfate couplée ou non à une limitation en nitrate sur l'efficacité de mobilisation du S et du N foliaire chez le coza d'hiver (*Brassica napus* L.). Thèse de doctorat, Université de Caen. 195pp.
- Duke S-H., Reisenauer H-M.** (1986). Roles and requirements of sulfur in plant nutrition. In: Tabatabai MA, ed. Sulfur in agriculture. Agronomy Monograph no. 27. Madison, WI: *American Society of Agronomy*, 123–168.

E

- E** **Kassis E., Cathala N., Rouached H., Fourcroy P., Berthomieu P., Terry N., Davidian J-C.** (2007). Characterization of a selenate-resistant *Arabidopsis* mutant. Root growth as a potential target for selenate toxicity. *Plant Physiology* **143**, 1231–1241.
- Eriksen J., Nielsen M., Mortensen J., Schjorring J.** (2001). Redistribution of sulphur during generative growth of barley plants with different sulphur and nitrogen status. *Plant and Soil* **230**, 239–246.

Etienne P., Desclos M., Le Gou L., Gombert J., Bonnefoy J., Maurel K., Le Dily F., Ourry A., Avice J-C. (2007). N-protein mobilisation associated with the leaf senescence process in oilseed rape is concomitant with the disappearance of trypsin inhibitor activity. *Functional Plant Biology* **34**, 895-906.

F

Fismes J., Vong P-C., Guckert A., Frossard E. (2000). Influence of sulfur on apparent N-use efficiency, yield and quality of oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown on a calcareous soil. *European Journal of Agronomy* **12**, 127 -141.

Forde B-G. (2002). Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annual Review of Plant Biology*. **53**, 203–224.

Foyer C., Ferrario-Mery S., Noctor G. (2001). Interaction between carbon and nitrogen metabolism. In "Plant nitrogen", Editeur J.F. Morot Gaudry et P. J. Lea, edition INRA, 237-254.

Friedrich J-W., Schrader L-E. (1978). Sulfur deprivation and nitrogen metabolism in maize seedlings. *Plant physiology* **61**, 900-903.

Friend J-P. (1973). The global sulphur cycle. In: Rasool SI (eds) Chemistry of the Ion atmosphere, Plenum Press, New York, pp 177-201.

G

Gammelvind L., Schjoerring J., Mogensen V., Jensen C., Bock J. (1996). Photosynthesis in leaves and siliques of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant and Soil* **186**, 227–236.

Gan S., Amasino R-M. (1997). Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *plant physiology* **113**, 313-319.

- Gilbert S. M., Clarkson D.T., Cambridge M., Lambers H., Hawkesford M-J.** (1997). SO_4^{2-} deprivation has an early effect on the content of ribulose 1,5-Biphosphate carboxylase/oxygenase and photosynthesis in young leaves of wheat. *Plant physiology*, **115**, 1231-1239.
- Giordano M., Pezzoni V., Hell R.** (2000). Strategies for the allocation of resources under sulphur limitation in the green alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiology* **124**, 857-864.
- Giovanelli J.** (1990). Regulatory aspects of cysteine and methionine biosynthesis. In: Rennenberg H, Brunold C, De Kok LJ, Stulen I, eds. *Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants; fundamental, environmental and agricultural aspects*. The Hague: SPB Academic Publishing, 33–48.
- Gojon A., Nacry P., Davidian J-C.** (2009). Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 328-338.
- Gombert J., Etienne P., Ourry A., Le Dily F.** (2006). The expression patterns of SAG12/Cab genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. with sensitivity to the environment. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1949-1956.
- Grant C., Johnston A., Clayton G.** (2004). Sulphur fertilizer and management of canola and wheat in western Canada. *Canadian Journal of plant Science* **85**, 297-307.
- Granvogl M., Wieser H., Koehler P., Tucher S-V., Schieberle P.** (2007). Influence of sulphur fertilization on the amounts of free amino acids in wheat: Correlation with baking properties as well as with 3-aminopropionamide and acrylamide generation during baking. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **55**, 4271-4277
- Guo Y., Cai Z., Gan S.** (2004). Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant Cell and Environment*. **27**, 521-549.
- Guevara M-G., Daleo G-R., Oliva C-R.** (2001). Purification and characterization of an aspartic protease from potato leaves. *Physiologia Plantarum* **112**, 321-326.

H

- Hagan N-D., Upadhyaya N., Tabe L-M., Higgins T-J.** (2003). The redistribution of protein sulfur in transgenic rice expressing a gene for a foreign, sulfur-rich protein. *The Plant Journal* **34**, 1-11.
- 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**, 131-138.
- Hawkesford M-J., Buchner P., Hopkins L., Howarth J-R.** (2003). The plant sulfate transporter family: specialized functions and integration with whole plant nutrition. In: Davidian JC, Grill D, De Kok LJ, Stulen I, Hawkesford MJ, Schnug E, Rennenberg H (eds.), *Sulfur Transport and Assimilation in Plants: Regulation, Interaction, Signaling*, Backhuys Publishers, Leiden, 45-56.
- Hawkesford M-J., Davidian J-C., Grignon C.** (1993). Sulphate/proton cotransport in plasma-membrane vesicles isolated from roots of *Brassica napus* L.: increased transport in membranes isolated from sulphur-starved plants. *Planta* **190**, 297-304.
- Hawkesford M-J., De Kok L-J.** (2006). Managing sulphur metabolism in plants. *Plant Cell and Environment* **29**, 382-395.
- Hawkesford M-J.** (2003). Transporter gene families in plants: the sulfate transporter gene family – redundancy or specialization? *Physiologia Plantarum* **117**, 155-163.
- Hell R.** (1997). Molecular physiology of plant sulfur metabolism. *Planta*, **202**, 138-148.
- Hesse H., Nikiforova v., Gakière B., Hoefgen R.** (2004). Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: integration of nitrogen and sulphur metabolism *Journal of Experimental Botany* **55**, 1283 -1292'
- He Y-H., Gan S-S.** (2002). A gene encoding an acyl hydrolase is involved in leaf senescence in Arabidopsis. *The Plant Cell* **14**, 805–815.

- Hirai M-Y., Fujiwara T., Awazuhara M., Kimura T., Noji M., Saito K.** (2003). Global expression profiling of sulfur starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-sérine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *The Plant Journal*, **33**,651-663.
- Hirai M., Klein M., and Fujikawa Y.** (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.
- Hocking P., Randall P., DeMarco D.** (1997). The response of dryland canola to nitrogen fertilizer: partitioning and mobilization of dry matter and nitrogen, and nitrogen effects on yield components. *Field Crops Research* **54**, 201–220.
- Hoefgen R., Hesse H.** (2007). Sulfur in plants as part of a metabolic network. Hawkesford MJ, De Kok LJ, Eds. *In: Sulfur in Plants and Ecological Perspective*, vol 6 Springer Netherlands, 107 -142'
- Hoffmann C., Stockfisch N., Koch H.** (2003). Influence of sulphur supply on yield and quality of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): Determination of a threshold value. *European Journal of agronomy* **21**, 69-80
- Hopkins L., Parmar S., Blaszczyk A., Hesse H., Hoefgen R., Hawkesford M-J.** (2005). O-acetylserine and the regulation of expression of genes encoding components for sulfate uptake and assimilation in potato. *Plant Physiology* **138**: 433–440.
- Hörtensteiner S., Feller U.** (2002). Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of. Experimental. Botany.* **53**, 927-937
- Howlett B-J., Idnurm A., Pedras M., S-C.** (2001). *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg disease of Brassicas. *Fungal Genetics and Biology* **33**: 1-14
- Hu Z-Y., Zhao F-J., McGrath S-P.** (2005). Sulphur fractionation in calcareous soils and bioavailability to plants. *Plant Soil* **268**:103-109
- J**
- Jackson G-D.** (2000). Effects of nitrogen and sulfur on canola yield and nutrient uptake. *Agronomy Journal* **92**, 644–649.

Janzen H-H., Bettany J-R. (1984). Sulphur nutrition of rapeseed: influence of fertilizer nitrogen and sulphur ratio. *Soil Science Society of America Journal* **84**, 100-107.

K

Karmoker J-L., Clarkson D-T., Saker L-R., Rooney J-M., Purves J-V.(1991). Sulphate deprivation depresses the transport of nitrogen to the xylem and the hydraulic conductivity of Barly (*Hordeum vulgare*) roots. *Planta*, **185**, 269-278.

Kast D., Stalder M., Rügsegger A., Galli U., Brunold C. (1995). Effect of NO₂ and nitrate on sulphate assimilation in maize. *Journal of Plant Physiology* **147**, 9-14.

Kataoka T., Watanabe-Takahashi A., Hayashi N., Ohnishi M., Mimura T., Buchner P., Hawkesford M., Yamaya T., Takahashi H. (2004). Vacuolar sulphate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulphate in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**, 2693–2704.

Kertesz M-A., Mirleau P. (2004). The role of soil microbes in plant sulphur nutrition. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1939-1945

Kim H., Hirai M.Y., Hayashi H., Chino M., Naito S., Fujiwara T. (1999). Role of O-acetyl-L-serine in the coordinated regulation of the expression of a soybean seed storage-protein gene by sulfur and nitrogen nutrition. *Planta*, **209**, 282-289.

Kirkegaard J-A., Hocking P-J., Angus J-F., Howe G-N., Gardner P-A. (1997). Comparison of canola, Indian mustard and Linola in two contrasting environments. II. Break-crop and nitrogen effects on subsequent wheat crops. *Field Crops Research* **52**, 179–191.

Kiser W., Dittrich A., Heber U. (1983). Sulfate concentration in Norway spruce needles in a correlation to atmospheric SO₂ in growth chambers. *Tree Physiology*, **12**, 1-13. In Sulphur in crop production – invited paper. *European journal of agronomy* **14**, 81-111.

Klapheck S., Grosse W., Bergmann L. (1982). Effect of sulfur deficiency on protein synthesis and amino acid accumulation in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Journal of Plant Physiology*, **108**, 235-245.

Kopriva S., Koprivova A (2004). Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: the past, the present, and the future. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1775-1783

Kopriva S., Rennenberg H. (2004). Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1831-1842.

Kopriva S, Muheim R, Koprivova A, Trachsel N, Catalano C, Suter M and Brunold C (1999). Light regulation of assimilatory sulphate reduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **20**, 37–44.

Kopriva A., Suter M., Opden-Camp C., Brunold C., Koprivova S. (2000). Regulation of sulphate assimilation by nitrogen in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **122**, 737-746

Koprivova A., Suter M., Opden-Camp R., Brunold C., Kopriva S. (2000). Regulation of sulfate assimilation by nitrogen in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **122**, 737–746.

Koralewska A., Posthumus F-S., Stuiver C-E., Buchner P., Hawkesford M-J., De Kok L-J. (2007). The characteristic high sulphate content in *Brassica oleracea* is controlled by the expression and the activity of sulphate transporter. *Plant Biology* **9**, 654–661.

Koralewska A., Buchner P., Stuiver E., Posthumus F., Kopriva S., Hawkesford M., De Kok L. (2009). Expression and activity of sulfate transporters and APS reductase in curly kale in response to sulfate deprivation and re-supply. *Journal of Plant Physiology* **166**, 168—179.

Ł

Łainé P., Ourry A., Macduff J., Boucaud J., Salette J. (1993). Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species: effects of low temperatures or previous nitrate starvation. *Physiologia Plantarum* **88**, 85-92.

Leblanc A., Renault H., Lecourt J., Etienne P., Deleu C., and Le Deunff E. (2008). Elongation changes of exploratory and root hair systems induced by aminocyclopropane carboxylic acid and aminoethoxyvinylglycine affect nitrate uptake and BnNrt2.1 and BnNrt1.1 transporter gene expression in oilseed rape. *Plant Physiology* **146**, 1928-1940.

Leleu O., Vuylsteker C., Tetu J-F., Degrande D., Champolivier L., Rambour S. (2000). Effect of two contrasted N fertilisations on rapeseed growth and nitrate metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 639–645.

Leterme P. (1988). Modélisation du fonctionnement du peuplement de colza d'hiver en fin de cycle : élaboration des composantes finales du rendement. In *Physiologie et laboration du rendement du colza*. Eds CETIOM-INRA, Paris. pp 124-129

Leustek T., Martin M-N., Bick J-A., Davies J-P. (2000). Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 141-165

Leustek T., Saito K. (1999). Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiology* **120**, 637-643.

Lim P-O., Woo H-R., Nam H-G. (2003). Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends Plant Science* **8**, 272–278.

Lim P-O., Kim H-J., Nam H-G. (2007). Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 115-136.

Livak K-J., Schmittgen T-D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-DDC(T)) method. *Methods* **25**, 402–408.

M

Macnicol P., Randall P-J. (1987). Changes in the levels of major sulfur metabolites and free amino acids in pea cotyledons recovering from sulfur deficiency. *Plant Physiology* **83**, 354-359.

- Malagoli P., Lainé P., Le Deunff E., Rossato L., Ney B., Ourry A.** (2004). Modeling nitrogen uptake in oilseed rape cv capitoll during a growth cycle using influx kinetics of root nitrate transport systems and field experimental data. *Plant Physiology* **134**, 388-400.
- Malagoli P., Lainé P., Rossato L., Ourry A.** (2005a). Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest I. Global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. *Annals of Botany* **95**, 853-861.
- Malagoli P., Lainé P., Rossato L., Ourry A.** (2005b). Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest. II an ¹⁵N-labelling-based simulation model of N partitioning between vegetative and reproductive tissues. *Annals of Botany* **95**, 1187-1198.
- Malhi S-S., Schoenau J-J., Grant C-A.** (2005). A review of sulphur fertilizer management for optimum yield and quality of canola in the Canadian great plains. *Canadian Journal of Plant Science* **85**, 297 -307 .
- Maruyama-Nakashita A., Inoue E., Watanabe-Takahashi A., Yarnaya T., Takahashi H.** (2003) Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in *Arabidopsis* reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiology*, **132**, 597-605.
- Maruyama-Nakashita A., Nakamura Y., Yamaya T., Takahashi H.** (2004). Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signalling and regulation. *Journal of Experimental Botany*, **55**, 1843–1849.
- Matile P.** (1982). Protein degradation. In: Boulter D, Parthier B, eds. Nucleic acids and proteins in plants. Berlin: Springer, 169–188.
- May M-J., Vernoux T., Leaver C., Montagu M-V., Inze D.** (1998). Glutathione homeostasis in plants: implication for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany*, **49**, 649-667

- McGrath S., Zhao J.** (1996). Sulphur uptake, yield responses and interaction between nitrogen and sulphur in winter oilseed rape (*Brassica napus*). *Journal of Agricultural Science* **126**, 53-62.
- McGrath S-P., Zhao F., Withers P.** (1996). Development of sulphur deficiency in crops and its treatment. Proceedings of the Fertiliser Society No. 379. The Fertiliser Society, Peterborough, UK.
- McNeill A-M., Eriksen J., Bergström L., Smith K-A.,-Marstorp H., Kirchmann H., Nilsson I.** (2005). Nitrogen and sulphur management: challenges for organic sources in temperate agricultural systems. *Soil Use and Management* **21**, 82-93.
- Migge A., Bork C., Hell R., Becker T-W.** (2000). Negative regulation of nitrate reductase gene expression by glutamine or asparagine accumulating in leaves of sulfur-deprived tobacco. *Planta* **211**, 587-595.
- Miziorko H-M., Lorimer G-H.** (1988). Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase oxygenase. *Annu. Rev. Biochem* **52**, 507–535.
- Morris R.J.** (2007). Sulphur in Agriculture: Global Overview. *Fertilizer Focus. Sulphur in Agriculture.* (January/February): 12-16.
- Murphy M-D., Boggan J-M.** (1988). Sulphur deficiency in herbage in Ireland. *Irish J Ag. Food Res* **27**, 83-90
- Murphy M-D., Coulter B-S., Noonan D-G., Connolly J.** (2002). The effect of sulphur fertilisation on grass growth and animal performance. *Irish J Agr Food Res* **41**, 1-15

N

- Nikiforova V., Freitag J., Kempa S., Adamik M., Hesse H., Hoefgen R.** (2003). Transcriptome analysis of sulphur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *The Plant Journal* **33**, 633–650.

Nikiforova V-J., Kopka J., Tolstikov V., Fiehn O., Hopkins L., Hawkesford M-J., Hesse H., Hoefgen R. (2005). Systems rebalancing of metabolism in response to sulphur deprivation, as revealed by metabolome analysis of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* **138**, 304–318.

Nikiforova V-J., Bielecka M., Gakière B., Krueger S., Rinder J., Kempa S., Morcuende R., Scheible W-R., Hesse H., Hoefge R. (2006). Effect of sulfur availability on the integrity of amino acid biosynthesis in plants. *Amino Acids* **30**, 173-183.

Niknahad-Gharmakher H. (2009). Minéralisation du soufre associée à la décomposition des matières organiques dans les sols et relations avec les dynamiques du carbone et de l'azote. Thèse de Doctorat, Agro Paris Tech, 145p'

Noh Y-S., Amasino R-M. (1999). Regulation of developmental senescence is conserved between *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* **41**, 195–206.

Noodén L. D., Guamet, J-J. (1996). Genetic control of senescence and aging in plants. In Handbook of the Biology of Aging (Schneider, E.L. and Rowe, J.W., eds). San Diego, CA: Academic Press, pp. 94–118.

Noodén L-D., Guamet J-J., John I. (1997). Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum*. **101**,746–753.

Noquet C., Avice J-C., Rossato L., Beauclair P., Henry M-P., Ourry A. (2004). Effects of altered source–sink relationship on N allocation and vegetative storage protein accumulation in *Brassica napus* L. *Plant Science* **166**, 1007–1018.

O

Ogunlela V., Kullmann A., Geisler G. (1989). Leaf growth and chlorophyll content of oilseed rape (*Brassica napus* L.) as influenced by nitrogen supply. *Journal of Agronomy and Plant Science* **163**, 73–89.

Ourry A., Gonzalez B., Boucaud J. (1989). Osmoregulation and role of nitrate during regrowth after cutting of ryegrass (*Lolium perenne*). *Physiologia Plantarum* **76**, 177-182.

P

- Parmar S., Buchner P., 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.
- Pasricha N-S., Abrol Y-P;** (2001). Food production and plant nutrient sulphur. In: Sulphur in plants, Abrol YP and Ahmad A (eds), pp 36-37.
- Pourtau N;, Mare S-M., Purdy S., Quentin N., Rue I-A., Wingler A.** (2004). Interactions of abscisic acid and sugar signalling in the regulation of leaf senescence. *Planta* **219**, 765–772.
- Prosser M., Purves J., Saker R., Clarkson D.** (2001). Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. *Journal of Experimental Botany* **52**, 113-121.

Q

- Quirino B-F., Noh Y-S., Himelblau E., Amasino R-M.** (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Science* **5**, 278–282.

R

- Rathke G-W., Behrens T., Diepenbrock W.** (2006). Integrated nitrogen management strategies to improve seed yield, oil content and nitrogen efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): A review. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **117**, 80-108.
- Rausch T. and Wachter A.** (2005). Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Plant Science* **10**, 503-509.
- Reuveny Z., Dougall D-K., Trinity P-M.** (1980). Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **77**, 6670–6672

Rossato L., Laine P., Ourry A. (2001). Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1655-1663.

Rossato L., Le Dantec C., Lainé P., Ourry A. (2002). Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the cycle: identification, characterization and immunolocalization of a putative taproot storage glycoprotein. *Journal of Experimental Botany* **53**, 265-275.

Rouached H., Wirtz M., Alary R., Hell R., Bulak-Arpat A., Davidian J-C., Fourcroy P., Berthomieu P. (2008). Differential regulation of the expression of two high-affinity sulfate transporters Sultr 1;1 and Sultr 1;2 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **147**, 897–911.

S

Saito K. (2000). Regulation of sulphate transport and synthesis of sulfur containing amino acids. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 188–195

Saito K. (2004). Sulfur Assimilatory Metabolism. The Long and Smelling Road. *Plant Physiology* **136**, 2443–2450

Sakai H., Hua J., Chen Q-G., Chang C., Medrano L-J., Bleecker A-B., Meyerowitz E-M. (1998). ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5812-7

Scherer H-W. (2001). Sulphur in crop production: invited paper. *European Journal of Agronomy* **14**, 81–100.

Schjoerring J-K., Bock J-G., Gammelvind L., Jensen C-R., 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 Soil* **177**, 255-264.

- Schnug E.** (1990). Sulphur nutrition and quality of vegetables. *Sulphur in Agriculture* **14**, 3–7.
- Schnug E.** (1991). Sulphur nutritional status of European crops and consequences for agriculture. *Sulphur in Agriculture* **15**, 7–12.
- Schnug E., Haneklaus S., Murphy D.** (1993). Impact of sulphur fertilization on fertilizer nitrogen efficiency. *Sulphur in Agriculture* **17**, 8–12.
- Schnug E., Ernst W-H., Kratz S., Knolle F., Haneklaus S.** (2004). Aspect of ecotoxicology of sulphur in the Harz region—a guided excursion. *Landbauforschung Völkenrode* **3**, 129-143.
- Sherpherd M-A., Sylvester-Bradley R.,** (1996). Effect of nitrogen fertilizer applied to winter oilseed rape (*Brassica napus*) on soil mineral nitrogen after harvest and on the response of a succeeding crop of winter wheat to nitrogen fertilizer. *Journal of Agriculture Science* **126**, 63-74.
- Smart C-M.** (1994). Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist* **126**, 419-448.
- Smart C-M., Hosken S-E., Thomas H., Greaves J-A., Blair B-G., Schuch W.** (1995). The Timing of maize leaf senescence and characterization of senescence-related cDNAs. *Physiologia Plantarum* **93**, 673-682.
- Smith F-W., Ealing P-M., Hawkesford M-J., Clarkson D-T.** (1995). Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes: Proceedings of the National Academy
- Smith F-W., Hawkesford M-J., Ealing P-M., Clarkson D-T., Vanden-Berg P-J., Belcher A-R., Warrilow A-G.** (1997). Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter. *Plant Journal* **12**, 875-884.
- Smith I-K., Lang A-L.** (1988). Translocation of sulphate in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Plant Physiology* **86**, 798–802.

- Somachi A., Sakamoto K., Sakai M., Ishihara H., Fukuyama T., Utiyama M., Liu H., Wang W., Tang D., Dong X., Quan H.** (2004) Laboratory and field measurements of dry deposition of sulphur dioxide onto Chinese Loess surfaces. *Environmental Science Technology* **38**, 3396-3404.
- Srivalli B., Bharti S., Khanna-Chopra R.** (2001). Vacuole cysteine proteases and ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase degradation during monocarpic senescence in cowpea leaves. *Photosynthetica* **39**, 87-93.
- Studer R., Merrien A., Devineau J.** (1987). Données nouvelles sur l'absorption du soufre Par le colza d'hiver en campagne berrichonne : Rapport INRA de Châteauroux 8P. sulphate transporters *SULTRI ; 1* and *SULTR I ; 2*. *New physiologist* **180**, 608-619.
- Sunarpi, Anderson J-W.** (1996). Distribution and redistribution of sulfur supplied as (³⁵S) sulphate to roots during vegetative growth of soybean. *Plant Physiology* **110**, 1151–1157.
- Sunarpi, Anderson J-W.** (1997a). Allocation of S in generative growth of soybean. *Plant Physiology* **114**, 687–693.
- Sunarpi, Anderson J-W.** (1997b). Effect of nitrogen nutrition on remobilization of protein sulphur in the leaves of vegetative soybean and associated changes in soluble sulphur metabolites. *Plant Physiology* **115**, 1671–1680.
- Svecnjak Z., Rengel Z.** (2006). Canola cultivars differ in nitrogen utilization efficiency at vegetative stage. *Field Crops Research* **97**, 221-226.
- Sylvester-Bradley R., Makepeace R-J.** (1984). A code for stages of development in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Aspects of Applied Biology* **6**, 399-419.

T

- Tabe L., Hagan N., Higgins T-J.** (2002). Plasticity of seed protein composition in response to nitrogen and sulfur availability. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 212-217.

- Takahashi H., Yammazayi M., Sasakura N., Watanabe A, Leustek T, de Almeida Engler J., Engler G, Van Montagu M., Saito K.** (1997). Regulation of sulfur assimilation in higher plants: a sulfate transporter induced in sulfate-starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **94**, 11102-11107.
- Takahashi H., Watanabe-Takahashi A., Smith F-W., Blacke-Kalff M-M., Hawkesford M-J., Saito K.** (2000). The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **23**, 171-182.
- Thomas H., Stoddar J-L.** (1980). Leaf senescence. *Annual Review of Plant Physiology* **31**, 83-111.
- Tilsner J., Kassner N., Struck C., and Lohaus G.** (2005). Amino acid contents and transport in oilseed rape (*Brassica napus* L.) under different nitrogen conditions. *Planta* **221**, 328-338.
- Tittonel E-D., Chaput J-P., Letoublon F., Bonnot O.** (1988). Reprise au printemps et mise à fleurs chez le colza d'hiver. In: *Physiologie et élaboration du rendement du colza*. Eds CETIOM-INRA, Paris. pp 68-72.
- Tomatsu H., Takano J., Takahashi H., Watanabe-Takahashi A., Shibagaki N., Fujiwara T.** (2007). An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**. 18807-1 8812.
- Touraine B., Daniel-Vedel F., Forde B.** (2001). Nitrate uptake and its regulation. In *Plant Nitrogen*, ed P.J. Lea and J.F. Morot-Gaudry, 1-37. Berlin:Springer-Verlag.
- V
- Vidmar J-J., Tagmount A., Cathala N., Touraine B., Davidian J-C.** (2000). Cloning and characterization of a root specific high-affinity sulfate transporter from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **475**, 65-69.

Vong P-C., Piutti S., Benizri E., Slezack-Deschaumes S., Robin C., Gukert A. (2007). Water-soluble carbon in roots of rape and barley: impacts on labile soil organic carbon, arylsulphatase activity and sulphur mineralization. *Plant and Soil* **294**, 19-29.

W

Weaver M-L., Gan S., Quirino B., Amasino R-M. (1998). A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology* **37**, 455-469.

Wieser H., Gutser R., Von Tucher S. (2004). Influence of sulphur fertilisation on quantities and proportions of gluten protein types in wheat flour. *Journal of Cereal Science* **40**, 239-244.

Wirtz M., Droux M., Hell R. (2004). O-acetylserine (thiol) lyase: an enigmatic enzyme of plant cysteine biosynthesis revisited in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1785–1798.

Y

Yoshida S. (2003). Molecular regulation of leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 79-84.

Yoshimoto N., Inoue E., Saito K., Yamaya T., Takahashi H. (2003). Phloem-localizing sulfate transporter, *Sultr1;3*, mediates re-distribution of sulfur source to sink organs in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **131**, 1511-1517.

Yoshimoto N., Takahashi H., Smith F-W., Yamaya T., Saito K. (2002). Two distinct high affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *The plant Journal* **29**, 465 -473.

Yoshimoto N., Inoue E., Watanabe-Takahashi A., saito K., Takahashi H. (2007). Posttranscriptional regulation of high-affinity sulfate transporters in *Arabidopsis* by sulfur nutrition. *Plant Physiology* **145**, 378-388.

Z

- Zhao F-J., Evans E., Bilsborrow P., Syers J.** (1993). Sulphur uptake and distribution in double and single low varieties of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant and Soil* **150**, 69–76.
- Zhao FJ, Hawkesford MJ, Warrilow AGS, McGrath SP, Clarkson DT** (1996) Responses of two wheat varieties to sulphur addition and diagnosis of sulphur deficiency. *Plant and Soil* **181**, 317-327.
- Zhao F-J., Bilsborrow P-E., Evans E-J., 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., McGrath S-P.** (1999a). Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. *Journal of Cereal Science* **30**, 1-17.
- Zhao F-J., Salmon S-E., Withers P-J., Monaghan J-M., Evans P-R., Shewry P-R., McGrath S-P.** (1999b). Variation in the Breadmaking Quality and Rheological Properties of Wheat in Relation to Sulphur Nutrition under Field Conditions. *Journal of Cereal Science* **30**, 19-31.
- Zhao F-J., McGrath S-P., Hawkesford M-J.** (2001). Sulphur nutrition and the sulphur cycle. *Institute of Arable Crops Research Report 2000-2001*, 36-39.
- Zhao F-J., McGrath S-P., Blake-Kalff M-M., Link A., Tucker M.** (2002). Crop responses to sulphur fertilisation in Europe. Proceedings N° 504, International Fertiliser Society, York, UK, 27pp.
- Zimmermann P., Zentgraf U.** (2005). The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular and Molecular Biology Letters* **10**, 515-535.

Nombres des references : **194**



***TABLE DES
ILLUSTRATIONS***

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Table des figures

Figure 1. Evolution des quantités de dioxyde de soufre (SO₂) dans l'air (en kt) et origines des émissions de SO₂ de 1960 à 2007 en France métropolitaine. Entre 1973 et 2004, les émissions de SO₂ ont chuté de plus de 86 %. (d'après le Citepa, Mai 2009).

Figure 2: (A) Composition moyenne de la graine de colza (source: CETIOM) (B) Répartition mondiale de la production de graines de colza en 2007/2008 (en millions de tonnes) (Source PROLEA-CETIOM 2007).

Figure 3: Evolution des surfaces françaises d'oléagineux (A) depuis 1996 (Source PROLEA-CETIOM 2007) et de la production française de oléagineuses depuis 1996 (B).

Figure 4: Débouchés alimentaires et industriels du colza (*Brassica napus* L.)

Figure 5: Principaux stades du cycle ontogénétique du colza d'hiver (source CETIOM).

Figure 6: Absorption cumulée d'azote nitrique (exprimée en mg N-NO₃⁻. plante⁻¹) estimée par marquage au ¹⁵NO₃⁻ pendant 70 jours et en conditions de culture hydroponique. Les barres verticales indiquent ± l'écart-type de la moyenne pour n=6, lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole. Les stades indiqués (C à G) correspondent à ceux définis par le CETIOM. C1 : montaison; F : début floraison; G : début formation des siliques; G5 : graines colorées. D'après Rossato *et al.* (2001).

Figure 7: Principaux rôles du soufre chez les végétaux supérieurs.

Figure 8: Absorption (A), transport (B) et voies d'assimilation réductrice/non réductrice (C) du sulfate (SO₄²⁻) dans la cellule végétale. Les voies d'assimilation réductrice et non réductrice sont respectivement représentées en vert et en bleu. Les enzymes sont indiquées en italique dans la couleur correspondante. Les molécules produites sont présentées en rouge. Par ordre alphabétique, les molécules impliquées dans l'assimilation du SO₄²⁻ sont : **Acétyl CoA** : Acétyl Co-enzyme A, APR : Adénosine 5'-phosphosulfate

réductase, **APS** : Adénosine 5'-phosphosulfate , **Cys** : cystéine, **GSH** : glutathion sous forme réduite, **Met** : méthionine, **OAS** : O-acétylsérine, **OASTL** : O-acétylsérine thiol-lyase, **PAPS** : 3'-phospho-5'-adénylylsulfate, **S²⁻** : sulfide, **SAT** : S-acétyl-transférase, **SO₃²⁻** : sulfite, **SR** : sulfite réductase (d'après Leustek & Saito 1999 ; De Kok *et al.* 2005).

Figure 9: (A et B) : Localisation tonoplastique de SULTR4;1 au sein de cellules épidermiques de l'apex racinaire d'*Arabidopsis thaliana*, observée en microscopie confocale par Kataoka *et al.*, (2004). Cette protéine est révélée par fluorescence verte de la protéine de fusion SULTR4;1- GFP. La fluorescence rouge est obtenue par révélation des parois cellulaires à l'iodure de propidium.

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

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

Figure 10: Représentation schématique des interactions et régulations entre l'assimilation de l'azote et celle du soufre chez les plantes supérieures en conditions de carence en soufre (SO₄²⁻) (d'après Smith *et al.* 1997 ; Kopriva & Rennenberg 2004).

Figure 11: Circuit de régulation impliquant le complexe protéique de la Sérine acétyltransférase (sphères) et OAS(thiol)-lyase (carrés). Les concentrations en OAS(thiol)-lyase sont supérieures à celles de la Sérine acétyltransférase. Les OAS(thiol)-lyases sont positivement modulées par l'activité de la Sérine acétyltransférase présente dans le complexe protéique. La forme libre de l'OAS(thiol)-lyase catalyse la formation de la cystéine (Cys) par une répression de l'activité de la Sérine acétyltransférase. La déficience en soufre induit une augmentation de l'OAS ayant pour conséquence la dissociation du

Figure 18: Effets de la privation en S sur l'activité de la NR **(A)** et de la GS **(B)** dans les limbes foliaires de maïs en conditions de privation (histogramme blanc) ou non (histogramme hachuré) en soufre à différentes dates après l'émergence. * et ** indiquent une différence significative entre traitements soit une probabilité égale à 0,05 et 0,01 respectivement. NS : non significatif. (D'après Friedrich & Schrader, 1978)

Figure 19: Schéma résumant les modifications conduisant à une réorientation du métabolisme chez *Arabidopsis thaliana*, d'après Nikiforova *et al.* (2005). SAM : composé contenant du S, THF : tétrahydrofurane.

Figure 20: Les deux stratégies d'amélioration de l'utilisation du S proposée par Hawkesford (2000)

Figure 21: Evaluation des teneurs en sulfate et S insoluble (essentiellement protéique) dans les feuilles âgées, matures et jeunes de plantes de colza cultivées en présence de 4 traitements: Absence en SO_4^{2-} et 7 mM NO_3^- (-S,+N), 1 mM SO_4^{2-} et 7 mM NO_3^- (+S,+N), Absence en SO_4^{2-} et 0.25 mM NO_3^- (-S,-N) et 1 mM SO_4^{2-} et 0.25 mM NO_3^- (+S,-N) (d'après Blake – Kalff *et al.*, 1998).

Figure 22: (A) Progression de la sénescence au niveau d'une feuille. Les tissus proches des nervures sont touchés plus tardivement que les autres (d'après Gan et Amasino, 1997). **(B)** Différentes phases de la sénescence foliaire et leurs caractéristiques (d'après Zimmermann et Zentgraf, 2005).

Figure 23: Schéma de l'expression différentielle des gènes SAGs et SDGs durant le développement de la feuille. SDGs : *Senescence Down-regulated Genes*. SAGs : *Senescence Associated Genes*. Les SAGs se décomposent en deux classes : classe I et classe II. (D'après Gan et Amasino, 1997).

Figure 24: (A) Cultural conditions and experimental design used to provide two contrasting levels of S nutrition. Six weeks before the start of the experiment (*i.e.* Day 0), the plants were grown on optimal S solution (300 μM SO_4^{2-}). On Day 0 and after subsequent sampling, half the plants were supplied with 300 μM SO_4^{2-} (control plant; +S) and half with 15 μM SO_4^{2-} (S limited plants; -S) with sequential double labeling during the

complexe protéique. La forme libre de la sérine acétyltransférase a une activité limitée. Par ailleurs, l'offre importante du soufre accumulé sous forme de sulfure (S²⁻) favorise la formation du complexe enzymatique. (Saito, 2004).

Figure 12: Schéma présentant la régulation positive et négative lors de l'assimilation du soufre. L'OAS agit en tant que facteur d'induction à effet positif. Le développement des plantes, les rythmes circadiens, et les hormones influencent le métabolisme du soufre de manière positive ou négative. La Cys et le GSH sont des régulateurs négatifs spécifiques de certaines étapes du métabolisme soufré. Les flèches indiquent un effet positif, et les barres indiquent un effet négatif. (Saito, 2004).

Figure 13: Estimation des déficits en soufre pour 2010 dans le monde, Zone d'apparition actuel de déficiences en soufre) ; (; Déficit < 1 Mt S/an; : Déficit > 1 MtS/an; : Déficit > 5Mt S/an). (d'après Ceccotti, 1996; Ceccotti et Messick, 1997; Mc neill *et al.* , 2005; Morris., 2007).

Figure 14: Cumul des besoins annuels minimums en S (en kg.ha⁻¹) chez différentes espèces végétales : le colza (rond), la betterave sucrière (triangle), la pomme de terre (carré), le blé d'hiver (losange), et les espèces prairiales (traits continus). Le colza est très exigeant en S au cours de son développement (~ 40 kg.ha⁻¹ de S) contrairement aux espèces prairiales (~ 20 kg.ha⁻¹). (Oenema et Postma; 2003, tiré de Abrol et Ahmad; 2003).

Figure 15: (A) Décoloration caractéristique des feuilles de colza soumis à une carence en soufre (d'après Merrien *et al.* 1989). (B) Les fleurs de colza se décolorent puis avortent et donnent des siliques vides (C).

Figure 16: Evolution de la teneur en RuBisCO dans les feuilles de *Brassica juncea* (carrés) et *Brassica campestris* (cercles) cultivés en présence (+S, symboles noirs) ou absence de sulfate (-S, symboles blancs). Les barres indiquent les erreurs standards (n = 9). En réponse à une privation en sulfate, la quantité de RuBisCO par unité de surface diminue et ce quelque soit le génotype (d'après Ahmad et Abdin, 2000).

Figure 17: Symptômes de la déficience en soufre chez le blé sur une culture aux champs. (Zhao *et al.*, 2001).

7 days preceding each harvest **(B)** Inset shows a picture of oilseed rape plants growing in aerated hydroponic solution in the greenhouse.

Figure 25: Changes of **(A)** whole plant, whole leaf-blade and root biomass and **(B)** leaf-blade (LB) biomass of leaf ranks 8, 10 and 12 of oilseed rape for control plants (+ S; closed symbols) and S limited plants (- S; open symbols) during the 35 days of treatment. Vertical bars indicate \pm s.e. ($n=4$) when larger than the symbol. Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments ($P<0.05$).

Figure 26: Changes of **(A)** whole plant N and 15N (*i.e.* deriving from uptake) and **(B)** whole plant S and 34S (*i.e.* deriving from uptake) of oilseed rape for control plants (+ S; closed symbols) and S limited plants (- S; open symbols) during the 35 days of treatments. Vertical bars indicate \pm s.e. ($n=4$) when larger than the symbol. Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments ($P<0.05$).

Figure 27: Partitioning (in %) of total S taken up (34S) and total remobilized S (32S, present on Day 0) in leaves, petioles, stem and roots of oilseed rape for control plants (+ S; **A**) and S limited plants (- S; **B**) between Day 0 and Day 35. Values are given as the mean \pm s.e. ($n=4$). The thickness of the arrows represent the relative importance (in % of the total S taken up or the total mobilized S) of each flux for cumulated total S taken up or total remobilized S (for details, see material and methods section, p12).

Figure 28: Evolution of **(A)** total S, **(B)** cumulated 34S taken up and **(C)** cumulated remobilized 32S contents in leaf-blade (LB) of leaf ranks 8, 10, 12 and roots of oilseed rape for control plants (+ S; closed symbols) and S limited plants (- S; open symbols) during 35 days of treatments. Vertical bars indicate \pm s.e. ($n=4$) when larger than the symbol. Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments ($P<0.05$).

Figure 29: Changes in **(A)** N/S ratio, **(B)** N organic / S organic ratio and **(C)** S-SO₄²⁻ content in leaf-blade (LB) of leaf ranks 8, 10, 12 and roots of oilseed rape for control plants (+ S; closed symbols) and S limited plants (- S; open symbols) during 35 days of treatments. Organic N (or S) is represented by the difference between total N (or S) and nitrate (or sulphate). Vertical bars indicate \pm s.e. ($n=4$) when larger than the symbol.

Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments ($P < 0.05$).

Figure 30: Relative expression of root plasmalemma **(A)** *BnSultr1.1*, **(B)** *BnSultr1.2* and tonoplast **(C)** *Bnsultr4.1*, **(D)** *BnSultr4.2* sulphate transporters in oilseed rape for control plants (+ S; dark bars) and S limited plants (- S; open bars) during 35 days of treatment. Relative expression for each gene is the average \pm s.e. ($n = 4$) of Q-PCR analysis and is expressed relative to the day 0 initial control expression level for that gene. Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments ($P < 0.05$).

Figure 31: Experimental design: After one week on demineralized water, plants were grown during two weeks on high S solution (300 μ M SO₄²⁻) and were then divided in two groups during two additional weeks. They were initially supplied either with 300 μ M SO₄²⁻ (**HSi**) or 15 μ M SO₄²⁻ (**LSi**). On Day 0, every group was again divided in two groups and treatments were applied during 28 days with either High S solution (300 μ M SO₄²⁻; **HS**) or Low S solution (15 μ M SO₄²⁻; **LS**), thus generating four treatments : **HSi-HS**; **HSi-LS**; **LSi-HS** and **LSi-LS**. In the meantime, overall treatments were continuously labelled with 15N and 34S and plants were finally harvested at Day 0, 14 and 28.

Figure 32: Changes of **(A)** whole plant, **(B)** whole leaf blades and **(C)** roots total biomass of plants initially grown either with High S (**HSi**; solid line) or Low S (**LSi**; dotted line) and submitted during 28 days to High S (**HS**; closed circles) or Low S (**LS**; open circles) treatments. Vertical bars indicate \pm s.e. of the mean for $n = 4$ when larger than the symbol. Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments ($P < 0.05$).

Figure 33: Changes of **(A)** whole plant N and **(B)** cumulated 15N uptake and **(C)** whole plant S and **(D)** cumulated 34S uptake of plants initially grown either with high S (**HSi**; solid line) or low S (**LSi**; dotted line) and submitted during 28 days to High S (**HS**; closed circles) or Low S (**LS**; open circles) treatments. Vertical bars indicate \pm s.e. of the mean for $n = 4$ when larger than the symbol. Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments ($P < 0.05$).

Figure 34: Changes of **(A)** roots total N and **(B)** cumulated 15N (*i.e.* deriving from uptake) and **(C)** roots total S and **(D)** cumulated 34S (*i.e.* deriving from uptake) of oilseed rape plants, initially grown either with high S (**HSi**; solid line) or low S (**LSi**; dotted line) and submitted during 28 days to High S (**HS**; closed circles) or Low S (**LS**; open circles) treatments. Vertical bars indicate \pm s.e. ($n = 4$) when larger than the symbol. Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments ($P < 0.05$).

Figure 35: Changes of **(A)** nitrate-N, **(B)** sulphate-S and **(C)** amino acids contents in roots of oilseed rape plants initially grown either with high S (**HSi**) or low S (**LSi**) and submitted during 28 days to High S (**HS**; closed circles) or Low S (**LS**; open circles) treatments. Vertical bars indicate \pm s.e. ($n = 4$) when larger than the symbol. Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments ($P < 0.05$).

Figure 36: Relative expression of root nitrate transporters **(A)** *BnNRT1.1*, **(B)** *BnNRT1.2* and root sulphate transporters **(C)** *BnSultr1.1*, **(D)** *BnSultr1.2* **(E)** *Bnsultr4.1* and **(F)** *BnSultr4.2* in oilseed rape plants, initially grown either with high S (**HSi**) or low S (**LSi**) and submitted during 28 days to High S (**HS**; closed circles) or Low S (**LS**; open circles) treatments. Vertical bars indicate \pm s.e. ($n = 4$) when larger than the symbol. Values are given as the mean \pm s.e. ($n = 3$) of Q-PCR analysis and are expressed relatively to the Day 28 value observed for control plants (*i.e.* HSi – HS). Different letters indicate that mean values are significantly different at a given date between treatments ($P < 0.05$).

Figure 37: Experimental design: After one week on demineralized water, plants were grown during two weeks on high S solution (300 μ M SO₄²⁻) and were then divided in two groups during two additional weeks. They were initially supplied either with 300 μ M SO₄²⁻ (**HSi**) or 15 μ M SO₄²⁻ (**LSi**). On Day 0, every group was again divided in two groups and treatments were applied during 28 days with either High S solution (300 μ M SO₄²⁻; **HS**) or Low S solution (15 μ M SO₄²⁻; **LS**), thus generating four treatments : **HSi-HS**; **HSi-LS**; **LSi-HS** and **LSi-LS**. In the meantime, overall treatments were continuously labelled with 15N and 34S and plants were finally harvested at Day 0, 14 and 28.

Figure 38: Whole plant, **(B)** whole leaf blades, **(C)** leaf blade biomass and **(D)** SPAD values of leaf blades (LB) of leaf rank #5, 7 and 9 (*i.e.* LB #5, 7 and 9) of plants initially grown either with high S (**HSi**; solid line) or low S (**LSi**; dotted line) and submitted during

28 days to high S (**HS**; closed circles) or low S (**LS**; open circles) treatments. Vertical bars indicate \pm s.e. of the mean for $n=4$ when larger than the symbol.

Figure 39: (A) total N and (B) total cumulated ¹⁵N content (*i.e.* deriving from uptake) in leaf-blade (LB) of leaf ranks #5, 7 and 9 (*i.e.* LB #5, 7 and 9) of oilseed plants initially grown either with high S (**HSi**; solid line) or low S (**LSi**; dotted line) and submitted during 28 days to high S (**HS**; closed circles) or low S (**LS**; open circles) treatments. Vertical bars indicate \pm s.e. of the mean for $n=4$ when larger than the symbol. Note that in figure 3B, values of LS plants are superimposed.

Figure 40: (A) protein and (B) amino acid content in leaf-blade (LB) of leaf ranks #5, 7 and 9 (*i.e.* LB # 5, 7 and 9) of oilseed rape plants, initially grown either with high S (**HSi**; solid line) or low S (**LSi**; dotted line) and submitted during 28 days to high S (**HS**; closed circles) or low S (**LS**; open circles) treatments. Vertical bars indicate \pm s.e. ($n=4$) when larger than the symbol.

Figure 41: (A) total S and (B) total cumulated ³⁴S content (*i.e.* deriving from uptake) in leaf-blade (LB) of leaf ranks #5, 7 and 9 (*i.e.* LB #5, 7 and 9) of oilseed plants initially grown either with high S (**HSi**; solid line) or low S (**LSi**; dotted line) and submitted during 28 days to high S (**HS**; closed circles) or low S (**LS**; open circles) treatments. Vertical bars indicate \pm s.e. of the mean for $n=4$ when larger than the symbol.

Figure 42: (A) Relative expression of tonoplasmic sulfate transporters *BnSultr4.1* and *BnSultr4.2* and (B) sulphate content in leaf-blade (LB) of leaf ranks #5, 7 and 9 (*i.e.* LB #5, 7 and 9) of oilseed rape plants, initially grown either with high S (**HSi**) or low S (**LSi**) and submitted during 28 days to high S (**HS**) or low S (**LS**) treatments. Vertical bars indicate \pm s.e. ($n=4$) when larger than the symbol. Values are given as the mean \pm s.e. ($n=4$) of Q-PCR analysis and are expressed relatively to the day 28 control value.

Figure 43: Day 28 relative transcript level of *BnSAG12* and *BnCab* genes in leaf-blade of leaf ranks # 5 to 9 of oilseed rape plants initially grown either with high S (**HSi**) or low S (**LSi**) and submitted during 28 days to high S (**HS**) or low S (**LS**) treatments. Vertical bars indicate \pm s.e. ($n=4$) when larger than the symbol. Values are given as the mean \pm s.e. ($n=4$) of PCR analysis and are expressed as relative percentages of the day 28 control value for both genes (*i.e.* *BnSAG12* and *BnCab*).

Figure 44: Schéma de synthèse permettant de présenter les différentes conclusions de la thèse, et de proposer quelques hypothèses. La taille des compartiments et des polices permet d'indiquer l'évolution relative des pools, des flux ainsi que le niveau d'expression de certains gènes cibles, pour des plantes de colza convenablement alimentées en soufre (à gauche) ou soumises à une limitation en soufre (à droite).

Figure 45: Relations linéaires entre la teneur en soufre et en sulfate des tiges (ronds creux) et des feuilles (carrés pleins) de différentes variétés de colza au sein de 57 parcelles agricoles réparties au sein du département du calvados, échantillonnées au stade G4 en 2009. Les niveaux de fertilisation soufrée s'étaient sur une gamme allant de 0 à 130 kg S. ha⁻¹. D'après Sarda *et al.*, en cours de soumission.

Table des Tableaux

Tableau I: Les 8 principaux engrais soufrés utilisés en France (CETIOM).

Tableau II: Les 5 groupes de transporteurs de sulfate mis en évidence chez *Arabidopsis thaliana* (Buchner *et al.*, 2004 ; Yoshimoto *et al.*, 2002 ; Abrol & Ahmad, 2003).

Table III: Day 28 partitioning of 15N or 34S uptake in whole leaf-blades and roots as % of whole plant (roots, stems, leaf blade and leaf petioles) 15N or 34S uptake, and total remobilized 14N (present on Day 0) and 32S (present on Day 0) within whole leaf-blades and roots of oilseed rape plants, initially grown either with high S (HSi) or low S (LSi) and submitted during 28 days to High S (HS; closed circles) or Low S (LS; open circles) treatments. Values are given as the mean \pm s.e. ($n = 4$). Different letters indicate that mean values are significantly different between treatments ($P < 0.05$).

Table IV: Day 28 remobilization of 14N and 32S (endogenous N and S present on day 0) within leaf blades of leaf ranks #5, 7 and 9 of oilseed rape plants initially grown either with high S (HSi) or low S (LSi) and submitted during 28 days to High S (HS; closed circles) or Low S (LS; open circles) treatments. Values are given as the mean \pm s.e. ($n = 4$). Different letters indicate that mean values are significantly different between treatments ($P < 0.05$).

congrès Internationaux

Annexe I: Poster présenté au 7^{ème} congrès international du métabolisme soufré des végétaux, du 13 au 16 Mai 2008, Varsovie, Pologne (avec communication orale de 10 min).

Does mineral S availability alter S and ³⁴S dynamics during vegetative growth of oilseed rape?

M. Abdallah¹, L. Dubousset, P. Etienne, M.P. Bataillé, J. Bonnefoy, J.-C. Avice, A. Ourry and F. Meuriot.

UMR INRA/UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutriments N, C, S (EVA). Institut de Recherche en Biologie Appliquée, Esplanade de la Paix, F- 14000 Caen, France

Email: frederic.meuriot @ unicaen.fr

¹ This work was supported by ANR-COSMOS : Colza et Soufre : cycle du soufre et Mobilisation des composés soufrés et azotés en réponse à une Oligotrophisation en Soufre: ANR-05-JC-05-51097

In higher plants, sulphur (S) is an essential element for crop yield and quality [1]. However, S availability has been decreasing in many areas of Europe since last decade [2], which severely reduced the yield by more than 40% [3]. Rapeseed (*Brassica napus* L.) is a plant of worldwide importance and it requires high inputs of S fertilizers. This plant is particularly sensitive to S deficiency because it has a high demand for S [4] in order to produce seeds with a high yield of protein with relatively large quantities of S-containing amino acids [5]. Even if the importance of S was well documented since many years [6], the physiological effects of S deficiency remain largely unclear. As a consequence, we studied the effects of mineral S deficiency on S fluxes during vegetative growth of rapeseed at both whole plant and leaf rank level (*i.e.* leaf tissues representing more than 80% of total biomass; data not shown).

Rapeseed plants were sown and grown in a greenhouse during six weeks in hydroponics with optimal N and with 300 μM $^{34}\text{SO}_4^{2-}$. At this date, two treatments were applied during 35 days with 300 μM $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ for control plants (+S) or with 15 μM $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ for S deficient plants (-S). Natural light was supplemented with phytolamps (150 $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ of photosynthetically-active radiation) for 16 h with a thermoperiod of 24°C (day) and 18 °C (night).

Our results highlight that S deficient plants showed no significant differences either on whole plant and leaf rank biomasses, when compared to control plants. However, either for whole plant and leaf ranks total S and ³⁴S (*i.e.* deriving from S uptake) amounts are greatly reduced after 35 days. For example, plant total S amount was decreased from 159 mg. plant⁻¹ for control plants to 57 mg. plant⁻¹ for S deficient plants.

Even if S deficient plants had 20 times less mineral S than control plants, and therefore presents contrasted S managements (total S and ³⁴S), their development remained surprisingly unchanged. This could be due to the plant high initial S level (*i.e.* S reserves). As a conclusion, during its vegetative growth, our results highlight that rapeseed presents a great physiological adaptation through the fine management of S fluxes within the plant. As suggested by Gleeson [7], this adaptation is mediated by optimization of S cycling within the plant. However, and because S deficiency can reduce the yield by more than 40% [3], this great adaptation should be solely effective on a short time scale (*i.e.* vegetative growth).

Acknowledgements: The authors wish to acknowledge Raphael Segura, Anne-Sophie Desfeux, Julie Gombert and Anne-Francoise Ameline. This work was supported by a Ph. D grant from the Egyptian ministry of higher education and research.

References:

- [1] S.P. McGrath, F.J. Zhao and P.J.A. Withers. Proceedings of the Fertiliser Society No. 379. The Fertiliser Society, Peterborough, UK (1996).
- [2] F.J. Zhao, P.J.A. Withers., S.E. Salmon, E.J. Evans, P.R. Shewry and S.P. McGrath. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43, 1137– 1142 (1997).
- [3] H.W. Scherer. *Eur. J. Agronomy* 14: 81-111. (2001).
- [4] M. Holmes. Crop. Applied Science Publishers, London (1980).
- [5] F.J. Zhao, P.E. Bilbrough, E.J Evans and S.P. J. McGrath. *Plant Nutr.* 20: 549–558 (1997).
- [6] M. Blake-kalff, M. Hawkesford, F.J. Zhao and S. McGrath. *Plant and Soil* 225: 95-107. (2000).
- [7] S.K. Gleeson and D.Tilman. *Am. Nat.* 139, 1322-1343. (1992).

Annexe II: Poster présenté au 7^{ème} congrès international du métabolisme soufré des végétaux, du 13 au 16 Mai 2008, Varsovie, Pologne

A $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ pulse-chase labeling method to study the S recycling in oilseed rape submitted to SO_4^{2-} deficiency during the rosette stage.

L. Dubousset, M. Abdallah, A.S. Desfeux, Ph. Etienne, F. Meuriot, J. Gombert, R. Segura, M.P Bataillé, S. Reze, J. Bonnefoy, A.S. Ameline, A. Ourry, F. Le Dily, J.C. Avice.

INRA, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutrition N.C.S., Esplanade de la Paix, F-14000, Caen, France. (jean-christophe.avice@unicaen.fr)

The decrease of sulphate availability in soil, which is largely due to the decline of industrial rejections of SO_2 , alters both grain yield and oil quality of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Consequently, S fertilization is now recommended in many countries. In order to optimize the S fertilization (adjustment of the period and level of S fertilization to S demand of crop), it will be necessary i) to characterize the stages of crop cycle that are the most affected by S deficiency and ii) to understand the mechanisms which contributed to an efficient recycling of S compounds from source to sink tissues. In this context, our aim was to determine firstly if the rosette stage is a vegetative phase of development particularly affected by a transient S deficiency. To assess the S deficiency effects, a method of $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ pulse-chase labeling was used.

Fifteen days after sowing, plantlets were transferred in hydroponic conditions and labeled with 0.3 mM of $^{34}\text{SO}_4^{2-}$. After 50 days, the labeling was stopped and plants were submitted to two SO_4^{2-} treatments during 35 days: High S (HS) versus Low S (LS, 20 fold lower than HS). The incidence of SO_4^{2-} deficiency on S and ^{34}S remobilization from source leaves was studied using isotope ratio mass spectrometry. These data were compared to the expression of the *BnSultr4;1* (a gene encoding a vacuolar SO_4^{2-} transporter implicated in SO_4^{2-} efflux). The senescence progression was studied using an accurate molecular indicator of leaf senescence status (*SAG12/Cab*) [1].

At rosette stage, the growth of young leaves in LS plants is significantly reduced only after 35 days compared to HS plants. After 35 days, the total S and SO_4^{2-} in maturing leaf of LS plants is 4 fold lower than HS plants while the soluble protein amount remains similar to HS plants. The ^{34}S amount in maturing leaf of LS plants rapidly declines and is 2 fold lower than HS plants after 35 days. This large decline of ^{34}S amount was associated with an induction of the expression of *BnSultr4;1* suggesting that vacuolar SO_4^{2-} is specifically remobilized to sustain the S demand for growth. It is concluded that when transient mineral S deficiency occurs at rosette stage, oilseed rape is able to maintain leaf growth by an optimization of the recycling of endogenous S compounds (especially SO_4^{2-}) without any acceleration of leaf senescence process.

Acknowledgement: This work was supported by the French National Research Agency (ANR-COSMOS n°ANR-05-JC05-51097).

References:

[1] J. Gombert, P. Etienne, A. Ourry and F. Le Dily, Journal of Experimental Botany, 57, 1949 (2006)

Preferred session: *Sulfur metabolism and its interaction with other metabolic pathways*

congrès Nationaux

Annexe III: Poster présenté au Colloque de la (Société Française de Biologie Végétale), Université de Strasbourg - France, 9-11 Juillet 2009.

Effect of S availability on S uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus* L.

Abdallah M.¹; Dubousset L.¹; Meuriot F.¹; Etienne P.¹; Avice J-C. ¹; Ourry A.¹

¹ Univ Caen, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutrition N, C, S (EVA), INRA, F-14032 Caen, FRANCE

Rapeseed (*Brassica napus* L.) is particularly sensitive to sulphur (S) deficiency because it has a high demand for S in order to produce seeds with a high yield of protein with relatively large quantities of S-containing amino acids. Even if the importance of S was well documented since many years, the physiological effects of S deficiency remain largely unclear. As a consequence, we studied the effects of mineral S deficiency on S uptake and remobilization during vegetative growth of rapeseed at both whole plant and leaf rank level for plants grown during 35 days with 300 μM $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ (control plants; +S) or with 15 μM $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ (S deficient plants; -S).

Our results highlight that S deficient plants showed no significant differences either on whole plant and leaf biomasses, when compared to control plants. However, total S and ^{34}S (*i.e.* deriving from S uptake) contents are greatly reduced either for whole plant and leaf after 35 days. Even if S deficient plants had 20 times less mineral S than control plants, and therefore presents contrasted S managements (total S and ^{34}S and induction of both tonoplastic and plasmalemic sulphate transporters), their development remained surprisingly unchanged. This could be due to the plant high initial S level (*i.e.* S reserves).

As a conclusion, during its vegetative growth, our results highlight that rapeseed presents a great physiological adaptation through the fine management of S fluxes within the plant. This adaptation is mediated by optimization of S cycling within the plant. However, and because S deficiency can reduce the yield by more than 40%, this great adaptation should be solely effective on a short time scale (*i.e.* vegetative growth).

Key Words: ^{15}N labelling, ^{34}S labelling, Sulphur deficiency, S transporter, sulphate
Session 4: Biotic and abiotic stress. Part 2: Environmental stress and adaptation

