Normandie Université

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité **SCIENCES AGRONOMIQUES, BIOTECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES**

Préparée au sein de l'**Université de Caen Normandie**

Etude d'un apport en silicium sur le métabolisme azoté et les performances agronomiques du colza (Brassica napus L.) et du trèfle (Trifolium incarnatum L.) cultivés en monoculture et en association

Présentée et soutenue par

COQUEREL RAPHAEL

Thèse soutenue le 10/12/2024

devant le jury composé de :

M. LAINE PHILIPPE	Maître de conférences - Université de Caen Normandie (UCN)	Directeur de thèse
M. ETIENNE PHILIPPE	Maître de conférences - Université de Caen Normandie (UCN)	Co-directeur de thèse
MME NESI NATHALIE	Directrice de recherche INRAe - INRA Rennes	Président du jury
MME PRUDENT MARION	Chargée de recherche - Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'environnement	Membre du jury
MME GRUBER VERONIQUE	Professeur des universités - Université Paris Cité	Rapporteur du jury
M. SAVOURE ARNOULD	Professeur des universités - IESS Paris	Rapporteur du jury

Thèse dirigée par **LAINE PHILIPPE** (Écophysiologie végétale, agronomie et nutritions N.C.S. (Caen)) et **ETIENNE PHILIPPE** (Université de Caen Normandie)

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N,C,S

"If you have a problem with my answer that's your problem, not my problem"

– ***Dennis Rodman*** –

Remerciements

Premièrement, je souhaite exprimer ma sincère reconnaissance à la région Normandie pour son soutien financier, qui a permis la réalisation de ces travaux. C'est grâce à leur généreuse contribution, que j'ai pu mener à bien ce projet ambitieux et atteindre mes objectifs.

C'est avec une profonde gratitude que je souhaite adresser mes remerciements à **Véronique Gruber** et **Arnould Savouré** pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également **Nathalie Nési** et **Marion Prudent** pour avoir accepté d'examiner ces travaux.

Tout naturellement, je tiens à remercier tout particulièrement mes directeurs de thèse, **Philippe Etienne** et **Philippe Laîné**, sans qui ce travail n'aurait pas pu être mené à bien. Merci de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse et d'avoir cru en moi durant ces trois dernières années. Un grand merci pour vos conseils, votre temps et votre pédagogie sans lesquels ces travaux de thèse ne seraient pas ce qu'ils sont. Merci d'avoir pris le temps à chaque fois de répondre à mes questions ou à mes interrogations. Mais aussi pour les nombreuses fois où vous m'avez aidé pour mes récoltes, les déplacements sur le terrain ou encore les diverses expérimentations. J'espère avoir retenu tout ce que vous m'avez transmis, mais je suis certain que votre méthodologie et votre rigueur seront le moteur de ma future vie professionnelle. J'essaierai de moins me précipiter, mais à vrai dire je ne peux pas vous le promettre. Enfin, merci d'avoir supporté ma personnalité par moment fantasque, et je le conçois quelque peu fatigante.

Je souhaite également exprimer ma gratitude envers le **Centre Mondial d'Innovation** pour avoir financé les diverses expérimentations menées dans le cadre de ce travail de recherche.

Je tiens à remercier les directions de l'UMR EVA. Je ne ferai pas de redite pour la direction actuelle, mais un énorme merci à toi, **Marie-Pascale**, de m'avoir accueillie durant toutes ces années. Je suis certain que vous arriverez un jour à prouver l'existence de ces maudits fructanes. Je remercie bien sûr l'intégralité de l'équipe enseignante du laboratoire. Merci à chacun pour cette bonne ambiance durant toutes ces années, pour tous ces échanges sérieux ou non, pour toutes ces discussions sportives (il va falloir trouver un remplaçant), et bien sûr pour toute l'aide que vous avez pu me donner, que ce soit en salle de récolte ou tout simplement au détour d'un couloir. Un merci tout particulier à toi, **Jean-Christophe**, pour m'avoir fait confiance tant en tant que stagiaire

qu'assistant ingénieur, et pour m'avoir un jour affirmé que j'étais en capacité de réaliser une thèse. Je voudrais remercier le responsable de l'équipe INCAA, m'ayant accueilli pendant 6 ans. Merci, **Jacques**, pour tous tes conseils et ton aide. Désolé d'avoir ouvert la brèche pour tous ceux qui voudront deux écrans.

Un énorme merci à l'ensemble du personnel administratif et technique du laboratoire, sans qui cette thèse n'aurait pu voir le jour. Alors commençons par le début, merci à toi, **Sophie**, sans toi mon inscription, mes déplacements et mes remboursements auraient été un tout autre calvaire pour un cas social de l'administratif comme moi. Un énorme merci à toi, **Anne-Françoise**, pour tous tes conseils, ton aide et ton dévouement pour la réalisation de toutes mes cultures. Sans toi, je suis certain que cette thèse serait bien moins fournie, sans oublier bien sûr merci pour toute ton aide durant cet épisode de l'eau osmosée durant l'été. Obtenir des plantes, c'est bien, mais les récolter et les broyer, c'est pas mal non plus. Et pour ceci, merci à vous, **Magali** et **Josiane**, pour toutes ces récoltes plus ou moins bien organisées, sans vous j'y serais surement encore, mais aussi bien sûr pour tous les broyages. Un très grand merci à **Bénédicte** pour les gros broyages, je sais que les échantillons du champ t'ont donné du fil à retordre. Et là qu'on parle du champ, un grand merci à toi, **Olivier**, pour ton aide sur les cases, pour toutes les fois où j'ai débarqué à l'atelier pour demander du bricolage, et bien sûr pour tous ces bons moments passés en pause. Et allez, on continue ! Merci à toi, **Julie**, pour ton aide précieuse en biologie moléculaire, et surtout pour ton aide lors de mes nombreux broyages à l'azote liquide. Nous n'avons pas trop eu l'occasion de travailler ensemble, mais merci à toi, **Véronique**, pour ta bonne humeur et nos échanges durant les pauses. Enfin, on garde le meilleur pour la fin comme on dit, mais tu le sais, ces mots sont superflus car toutes les réponses sont présentes dans ton cœur, merci **Quentin**.

Un énorme merci à mes Totally Spies ! de l'atome, j'ai nommé la plateforme PLATIN'. Merci à vous toutes, **Fanny**, **Emmanuelle**, **Jéhane**, **Frédérine**, **Déborah**, **Sylvain** et **Josette**, pour l'ensemble des analyses que vous avez pu me réaliser, mais aussi pour tous ces moments échangés en pause, au repas ou à tout autres moments de la journée.

Merci à la plateforme **PROTEOGEN** pour l'ensemble de mes analyses protéomiques. Désolé d'avoir bouché la colonne avec mes extraits de graines.

Merci au centre **INRAE Bretagne-Normandie** du Rheu pour m'avoir accueilli afin de battre et réaliser les analyses NIRS de mes échantillons.

Je souhaite remercier les membres de mon CSI, **Mickael Aubert**, **Joëlle Fustec**, **Philippe Garnier** et **Diane Sousan**, pour le temps qu'ils m'ont accordé, leur gentillesse, et les judicieux conseils qui ont grandement contribué à l'amélioration de ma thèse. Je remercie également l'école doctorale (**EDnBISE**) pour l'aide financière fournie pour mon déplacement à Milan dans le cadre du congrès Biostimulant World Congress.

Merci à **Isabelle**, **Anne-Marie**, **Benoît** et **Bertrand** de m'avoir offert l'opportunité de donner des enseignements en biologie végétale, méthodologie végétale et biostatistique. Merci de m'avoir fait confiance malgré mon inexpérience. Enseigner avec vous a été particulièrement formateur et a été un réel plaisir.

MT180 a été, pour moi, un événement marquant de ces trois années. Alors comment ne pas remercier **Virginie**, **Gwenaëlle**, **Laurence** et **Myriam** pour leurs conseils, leur pédagogie et bien sûr pour leur bonne humeur. Mais aussi **Aurélie** et **Ludovic** pour m'avoir appris tant de choses sur la communication et la gestion du stress. Sans vous, je pense que jamais je n'aurais été capable de réaliser ma prestation. Enfin, merci à l'ensemble des participants. Ce serait un peu long de tous vous citer, mais merci pour votre bonne humeur, votre gentillesse, et comme l'a dit la gagnante, "C'était avant tout une aventure humaine". Sans cette expérience, je n'aurais jamais rencontré deux personnes aussi débiles que moi pouvant me suivre dans le projet bancal de monter un podcast. Alors un grand merci à **Mathilde** et **Chloé**, déjà pour tous ces rires et cette joie que ce soit aux diverses sessions MT180, que durant nos tournages et bien sûr, comment passer à côté, à la cantine.

Comment ne pas remercier l'intégralité des personnes qui sont passées par le bureau des doctorants. Merci aux anciens, **Jérémy** et **Antoine**, en plus de quasiment faire partie des murs, merci pour votre aide, vos conseils et bien sûr pour la bonne ambiance quotidienne dans le bureau. Merci, **Anouk**, j'ai sûrement passé moins de temps avec toi qu'avec les deux autres, mais ce fut à chaque fois un réel plaisir. **Juliette**, **Yann** et **Leonidas**, bon courage, c'est vous les grands maintenant parce qu'on sait tous qu'il ne faut pas compter sur Antoine. Un grand merci à vous, **Agathe**, **Lorane**, **Enola**, **Enora**, **Mona**, **Lucas**, **Liz** (Tabernak), **Guillaume** et **Aurore**, pour votre aide, mais aussi pour votre bonne humeur et vos conversations. Un immense merci à toi, **Lorane**, tu as été un peu la grande sœur pour le petit thésard que j'étais, mais aussi pour tout ces escape games où malheureusement nous ne cessons d'être invaincus. Tu auras laissé ta trace dans le bureau, dommage que ça soit sous la forme du tableau. La meilleure pour la fin, Tchou Tchou, comment oublier **Aurore**, un giga merci à toi pour tout et pour la superbe illustration de la couverture (actuellement, je n'ai rien fait, à tout moment y'a pas de couverture, désolé tmtc SNCF Power).

Merci à ma belle-famille, ou la haie généalogique, j'aimerais bien que tout tienne dans un seul manuscrit donc je ne vais pas tous vous citer. Mais un énorme merci à vous tous pour votre soutien et tous ces moments partagés passés et à venir.

Une reconnaissance éternelle à mes **grands-parents** pour tout ce que vous mavez transmis et appris, parfois sans même vous en rendre compte. Sans vous, je naurais sûrement pas étudié les végétaux. Merci infiniment à ma **mère** qui ma soutenu année après année sans jamais douter. Merci de mavoir toujours poussé plus loin, et de mavoir transmis cette hargne sans laquelle ce manuscrit ne serait pas. Merci à toi, **Claude**, pour ton aide lors de mes quelques transhumances, pour ta gentillesse et ta générosité.

Je tiens également à remercier mes amis, toujours là pour le meilleur et pour le pire. Vous m'avez soutenu de près ou de loin, écouté, conseillé pendant ces longues années, je vous dois beaucoup après tant d'années. Un grand merci tout particulier à **Audrey**, **Clara**, **Clément** et **Nicolas** pour tous ces moments passés autour de jeux. Un grand merci, à **Agathe** pour les tonnes de vidéo plus ou moins (surtout moins) intelligentes. Et bien sûr, comment passer à côté de mon **Agence tous risques**. Bon, il va me falloir un peu de temps pour rattraper tout ce que vous avez fait en trois ans, mais un grand merci pour absolument tout.

Mes derniers remerciements vont à celle qui m'a soutenu durant ces trois années, et même un peu plus, **Camille**. Avec le rollercoaster qu'on a vécu durant ces trois ans, merci d'avoir été tous les jours là, de m'avoir conseillé, de m'avoir aidé, de m'avoir écouté. Merci pour ta joie, merci pour tes rires, merci d'être ma Hinata, ma Casca, ma Mikasa, merci d'être là, merci d'être toi. Sans toi, tout cela n'aurait jamais pu être possible, je ne serai jamais assez reconnaissant pour tout ce que tu m'as apporté et m'apportes jour après jour.

Enfin, quitte à faire les choses dans le désordre, autant finir ces remerciements par des mots qui ne pourront jamais être lus. À toi qui, tout au long de ma vie, m'a répété la phrase "*si ta place est là, elle n'est pas ailleurs*", aujourd'hui j'ai trouvé la mienne et je suis triste que tu ne puisses le constater.

Liste des abréviations

A

Al	Aluminium

B

BBCH	Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und CHemische Industrie
B	Bore

C

Ca	Calcium
$CaCO_3$	Carbonate de calcium
Co	Cobalt
CO_2	Dioxyde de carbone
Cu	Cuivre

E

EAA	Efficience d'assimilation de l'azote
EAbA	Efficience d'absorption de l'azote
ERA	Efficience de remobilisation de l'azote
EU	European Union
EUA	Efficience d'usage de l'azote
EUtA	Efficience d'utilisation de l'azote

F

FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
Fe	Fer

G

GES	Gaz à effet de serre
Gln	Glutamine
GltS	Glutamate synthase
Glu	Glutamate
GS	Glutamine synthase

H

H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HATS	High-affinity transporter systems

I

INN	Indice de nutrition azotée
INRAE	Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

K

K	Potassium

L

LAI	Lutte antiparasitaire intégrée
LATS	Low-affinity transporter systems

M

MDA	Malondialdéhyde
Mg	Magnésium
MS	Matière sèche
Mo	Molybdène

N

N	Azote
N_2	Diazote
N_2O	Protoxyde d'azote
Na	Sodium
NH_3	Ammoniac
NH_4^+	Ammonium
NO_3^-	Nitrate
NUE	Nitrogen use efficiency

O

OMG	Organisme génétiquement modifié

P

P ..... Phosphore
PGP ..... Plant Growth Promoting

R

ROS ..... Reactive oxygen species

S

S ..... Soufre
Se ..... Sélénium
Si ..... Silicium
$Si(OH)_4$ ..... Acide mono-silicique
SO_2 ..... Dioxyde de soufre
SO_4^{2-} ..... Sulfate

U

USDA ..... U.S. Department of Agriculture

V

VSP ..... Vegetative storage protein

Z

Zn ..... Zinc

Table des matières

Introduction générale **1**

1 Synthèse bibliographique **5**

1.1 Le colza d'hiver (*Brassica napus* L.) : généralités, débouchés et cycle de développement 5

1.1.1 Généralités 5

1.1.2 Débouchés et valorisation de la culture 6

1.1.3 Cycle de développement 8

1.2 Fertilisation et bilan agro-environnemental de la culture de colza 10

1.2.1 Besoins en soufre et fertilisation soufrée 10

1.2.2 Besoins en azote du colza 12

1.3 Les différents leviers d'optimisation des performances agro - environnementales du colza 16

1.3.1 Variétés de colza présentant une meilleure efficience d'utilisation de l'azote 16

1.3.2 Amélioration des pratiques culturales existantes 18

1.3.3 Les cultures associées 20

1.3.4 Les biostimulants 22

1.4 Objectifs et stratégies de recherche 29

2 Résultats **30**

2.1 Évaluation de l'effet d'un apport en silicium sur les capacités d'absorption du soufre chez *Brassica napus* L. carencé ou non en soufre 32

2.1.1 Préambule 33

2.1.2 Introduction 35

2.1.3 Materials and methods 36
Plant Growth Conditions and Experimental Design 36
Measurement of Sulfate Influx 38
Determination of Total S and Si Contents 38
Extraction and Quantification of RNAs, Reverse Transcription (RT) and Q-PCR Analysis 39
Statistical Analysis 40
2.1.4 Results 40
Effect of S Deficiency Associated or Not Associated with Si Supply on *Brassica napus* Growth 40
Leaf Chlorophyll and Anthocyanin Indices 41
Contents of Sulfur and Silicon in Plants 42
Relative Gene Expression of *BnaSultr1.1* and *BnaSutr1.2* in Roots . . 43
Root Sulfate Transporters Activity 44
Relative Expression of Genes Encoding Root Sulfate Transporters in Plants Resupplied with S 46
2.1.5 Discussion 47
2.2 Un apport en silicium améliore la nodulation et la fixation de l'azote et favorise la croissance de *Trifolium incarnatum* L. en condition de carence en soufre 52
2.2.1 Préambule 53
2.2.2 Introduction 55
2.2.3 Materials and methods 56
Plant Growth Conditions and Experimental Design 56
Determination of Total, S, Si, N and ^{15}N Concentrations and Calculation of the Distribution of Nitrogen Sources in Plants 57
Extraction and Quantification of Proteins from Nodules 58
Immunodetection and Quantification of Nitrogenase in Root Nodules 59
Statistical Analysis 59
2.2.4 Results 60
Effect of Si Supply on Growth of *Trifolium incarnatum* Subjected or Not to S-Deprivation 60

Determination of Total Sulfur (S) and Silicon (Si) Concentrations in Plants . . . 61

Effect of Silicon Supply on Root Nodulation . . . 62

Effect of Silicon Supply on the Total Plant N Derived from Uptake and N_2 Fixation . . . 63

Effect of Silicon Supply on Abundance of Nitrogenase in Nodules . . . 65

2.2.5 Discussion . . . 66

2.3 Modification du ionome et du protéome du nodule induite par un apport en silicium chez *Trifolium incarnatum* L. non alimenté en azote . . . 71

2.3.1 Préambule . . . 72

2.3.2 Introduction . . . 74

2.3.3 Materials and methods . . . 75

2.3.4 Plant growth conditions and experimental design . . . 75

Determination of macro- and microelements concentrations and N amount derived from the atmosphere . . . 76

Proteins analysis : . . . 77

Extraction and quantification of proteins from nodules . . . 77

Quantification of nitrogenase abundance in nodules . . . 78

Proteomic mass spectrometry sample preparation and protein identification . . . 78

Identification and GO enrichment analysis of differentially accumulated proteins . . . 79

Statistical Analysis . . . 80

2.3.5 Results . . . 80

Effect of Si supply on growth, total N and Si amounts of Trifolium incarnatum cultivated under N-deprivation . . . 80

Effect of Si supply on nodules parameters . . . 81

Effect of Si supply on the whole-nodule proteome . . . 83

Effect of Si supply on proteome of host root cells . . . 84

Effect of Si supply on proteome of host bacteria . . . 87

2.3.6 Discussion . . . 88

2.4 Un apport en silicium augmente la rizodéposition et les transferts d'azote depuis *Trifolium incarnatum* L. vers *Brassica napus* L. 95

2.4.1 Préambule 96

2.4.2 Introduction 98

2.4.3 Materials and methods 99

Plant growth conditions and experimental design 99

Determination of N and ^{15}N amount 101

Statistical Analysis 102

2.4.4 Results 102

Effect of Si supply on biomass and total N amount in rapeseed and clover 102

Effect of Si supply on N rhizodeposition from clover and N transfer to rapeseed 104

Si effect on the distribution of N derived from *Trifolium incarnatum* L. in the RC 105

2.4.5 Discussion 106

3 Discussion générale **109**

3.1 Effets bénéfiques du silicium chez le colza cultivé en monoculture et soumis à une carence en soufre 110

3.2 Effets bénéfiques d'un apport de silicium sur la nodulation et les capacités de fixation du diazote atmosphérique chez *Trifolium incarnatum* L. soumis à une privation de soufre ou d'azote dans la solution nutritive 111

3.3 Effets bénéfiques d'un apport de silicium chez le trèfle cultivé en association avec le colza 116

4 Perspectives **117**

Références **120**

Liste des activités scientifiques **140**

Posters **144**

Introduction générale

Le colza (*Brassica napus* L.), issu du croisement naturel entre le chou (*Brassica oleracea* L.) et la navette (*Brassica campestris* L.), est la brassicacée la plus cultivée à travers le monde. Sur les continents américain et océanien, où les températures hivernales peuvent être très négatives, les variétés de colza de printemps sont majoritairement cultivées car elles présentent un cycle de développement court de 120 à 150 jours. Au contraire, sur le continent européen sont principalement cultivées les variétés de colza d'hiver en raison de leur rendement plus élevé. En effet, leur cycle de développement est plus long (environ 11 mois) et comprend une période de vernalisation compatible avec les températures hivernales plus modérées.

En 2023 en France, plus de 4 300 000 tonnes de graines de colza ont été produites. Avec une production en hausse depuis plus de 30 ans, la France est devenue le premier producteur de l'Union européenne, devant l'Allemagne et la Pologne. Première oléoprotéagineuse cultivée au sein de l'Union européenne, devant le tournesol et le soja, le colza s'est imposé notamment parce qu'il présente de nombreux débouchés tant alimentaires que non alimentaires. Ainsi, avec une graine riche en lipides (jusqu'à 43 % de la matière sèche) et en protéines (environ 19 % de la matière sèche) [Nesi *et al.*, 2008], le colza est utilisé dans deux filières principales :

— **la production de produits pour l'alimentation humaine ou animale** : réputée pour sa forte teneur en acides gras polyinsaturés tels que l'acide α-linolénique (C18 :3 ; ω_3) et l'acide linoléique (C18 :2 ; ω_6), l'huile de colza a montré de nombreux effets bénéfiques sur la santé humaine. De plus, le tourteau, co-produit issu de l'extraction de l'huile, présente des teneurs élevées en protéines (34 % de sa masse sèche) et en minéraux (phosphore (P) et calcium (Ca), notamment). Il est ainsi de plus en plus utilisé pour l'alimentation du bétail en substitution du tourteau de soja, principalement issu de l'importation,

— **la synthèse de produits de chimie verte pour les filières industrielles** : dans le secteur industriel, l'huile de colza est principalement utilisée pour la synthèse de biocarburant appelé biodiesel, un carburant biodégradable et non toxique. Même si, en théorie, le biodiesel pourrait remplacer intégralement les carburants d'origine fossile, très peu de véhicules (à l'exception de quelques flottes de poids lourds, de bus et de trains) sont aujourd'hui capables de fonctionner avec 100 % de biodiesel (B100). C'est pourquoi il est le plus souvent mélangé au

gazole dans des proportions allant de 5 % (B5) à 30 % (B30). Il peut ainsi être utilisé dans les moteurs actuels sans modification mécanique préalable. De manière plus marginale, l'huile de colza est également utilisée pour la synthèse de biolubrifiants, permettant le fonctionnement des machines agricoles ou de travaux publics, de tensioactifs, qui entrent dans la composition de lessives et de produits cosmétiques, de solvants, utilisés comme dégraissants, d'adjuvants de produits phytosanitaires ou encore d'encre d'imprimerie.

En dépit de ces nombreux débouchés, le colza nécessite de forts apports d'intrants (notamment azotés et soufrés) afin de garantir un rendement en graines et une qualité des produits récoltés satisfaisante (Tableau 1). En effet, il fait partie des plantes qui nécessitent le plus d'apports de fertilisants azotés (supérieurs à 200 $kg.ha^{-1}$) (Figure 1). Néanmoins, il présente également une efficience de remobilisation de l'azote (N) endogène qualifiée de médiocre, notamment lors de sa phase de développement végétatif [Avice et Etienne, 2014a].

TABLEAU 1 - Besoins d'une culture en fertilisant azoté (N) pour produire un quintal de graines (en $kg.q^{-1}$). Les doses d'N (en $kg.ha^{-1}$) correspondent aux doses nécessaires pour obtenir un rendement moyen (en $q.ha^{-1}$) en France. Modifié de RAGT

Culture	Besoin en N pour un quintal ($kg.q^{-1}$)	Rendement moyen en France ($q.ha^{-1}$) *(Source : Agreste 2020)*	Dose d'N ($kg.ha^{-1}$)
Colza	**7**	**29,6**	**207**
Blé	3	68,5	206
Sorgho	2.4	46,3	111
Orge	2.3	52,7	121
Maïs	2.3	29,6	207
Orge	2.3	52,7	121
Tournesol	1.8	20,6	38

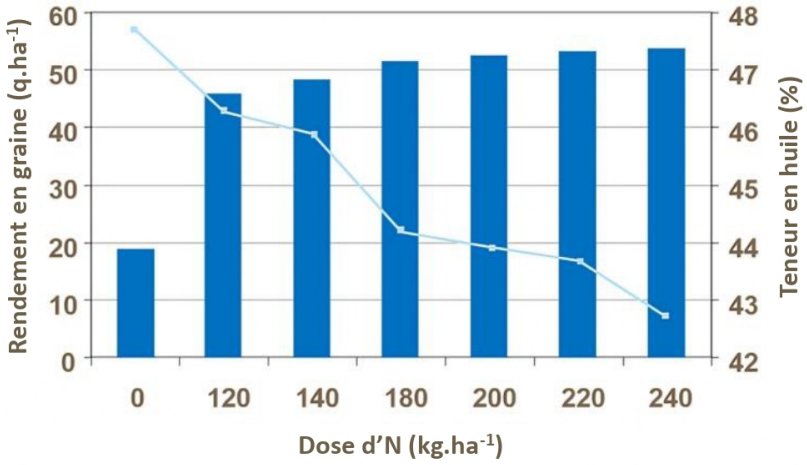


FIGURE1 – Évolution des rendements (histogramme) et des teneurs en huile (courbe) des graines de colza en fonction des doses (de 0 à 240 kg.ha^{-1}) de fertilisant azoté apportées. Source : Yara

Outre le coût financier non négligeable que représente l'achat des intrants azotés (indexés sur le cours du pétrole brut) pour l'agriculteur, l'utilisation excessive de ceux-ci s'accompagne de problèmes environnementaux [Srivastav, 2020]. En effet, la synthèse, le transport et l'épandage de ces fertilisants génèrent la libération de gaz à effet de serre (GES). De plus, une fois sur la parcelle, ces engrais peuvent se volatiliser et ainsi produire du protoxyde d'azote (N_2O), un puissant GES qui contribue activement à la destruction de la couche d'ozone et au réchauffement climatique [Manco *et al.*, 2024]. Enfin, les fortes quantités d'azote organique des feuilles chutées tout au long du cycle de culture peuvent être minéralisées et lessivées par les eaux de pluie, polluant ainsi les cours d'eau et/ou les nappes phréatiques.

Compte tenu de tous ces effets négatifs, il devient urgent de repenser l'agriculture de demain afin de maintenir, voire d'améliorer les rendements et la qualité des produits récoltés des plantes de grandes cultures telles que le colza, tout en limitant leurs empreintes environnementales.

L'analyse des pratiques couramment utilisées montre qu'il existe des leviers d'amélioration de la gestion de l'azote chez le colza. Ainsi, plusieurs stratégies peuvent être envisagées :

— **la sélection variétale de génotypes plus efficients** notamment en termes d'utilisation et de gestion de l'azote,
— **l'amélioration des pratiques culturales** actuelles *via* l'utilisation d'outils d'aide à la décision et/ou de diagnostic permettant un meilleur pilotage de la fertilisation azotée,
— **le développement de nouvelles pratiques culturales** visant à diminuer les apports d'intrants (notamment azotés) à la culture du colza en réalisant **des associations avec des fabacées**, capables de fixer le diazote atmosphérique

(N_2) et d'exsuder dans la rhizosphère des composés azotés, qui pourront être absorbés par le colza [Genard, 2016],

— **la mise au point et l'utilisation de biostimulants** d'origine naturelle qui, sans apporter d'éléments nutritifs en quantités significatives, favorisent la croissance et le développement des plantes. A titre d'exemple, chez le colza, des apports de biostimulants de compositions complexes d'extraits d'algues ou d'acides humiques [Jannin, 2012] et plus récemment des apports de silicium (Si) [Haddad, 2018] ont montré des effets bénéfiques sur l'absorption, l'assimilation de l'azote et/ou sa remobilisation.

L'utilisation combinée des différents leviers d'amélioration cités ci-dessus peut être envisagée, mais reste actuellement peu documentée dans la littérature. **Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous proposons d'apporter du silicium à l'association colza (*Brassica napus* L.) -trèfle incarnat (*Trifolium incarnatum* L.) dans le but d'évaluer si l'apport de ce biostimulant permet de potentiellement optimiser le fonctionnement de l'association.**

Ce mémoire de thèse débutera par une **"synthèse bibliographique"** (chapitre 1) résumant la place du colza dans la filière des oléoprotéagineux, son cycle de développement, et son bilan agro-environnemental. Cette synthèse présentera ensuite les différents leviers envisageables pour limiter l'empreinte environnementale de cette culture. La partie **"résultats"** (chapitre 2) seront ensuite présentés sous forme de quatre articles scientifiques (dont 3 acceptés et 1 en révision) qui seront répartis entre quatre sections (section 2.1, section 2.2, section 2.3 et section 2.4). Enfin, ce manuscrit de thèse se terminera par **"une discussion générale"** (chapitre 3) et par une présentation des **"principales perspectives"** (chapitre 4) qui découlent de ce travail.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

1.1 Le colza d'hiver (*Brassica napus* L.) : généralités, débouchés et cycle de développement

1.1.1 Généralités

Seconde oléoprotéagineuse la plus cultivée dans le monde (Source : FAO), le colza (*Brassica napus*) a su imposer sa suprématie dans nos campagnes depuis près de 20 ans. Issu du croisement naturel entre le chou (*Brassica oleracea* L.) et le navette (*Brassica campestris* L.) [Mason et Snowdon, 2016], le colza est une espèce amphidiploïde de la famille des Brassicacées (anciennement crucifères). Grâce à ses capacités d'acclimatation à de nombreuses latitudes et à ses nombreuses utilisations, le colza est cultivé sur la quasi-totalité du globe.

Deux types de colza, se différenciant par la durée de leur cycle de développement, sont principalement cultivés. Le premier, le colza de printemps, présentant un cycle de développement de 120 à 150 jours est principalement cultivé au Canada, en Australie ainsi que dans l'Est et le Nord de l'Europe. Le second, le colza d'hiver, est principalement cultivé sur le continent européen et présente un cycle de développement plus long, compris entre 250 et 330 jours. Il est semé à la fin du mois d'août et récolté durant l'été de l'année suivante. Le colza d'hiver nécessite une période de vernalisation, un processus physiologique induit par le froid de la saison hivernale permet d'entrer dans une phase de repos végétatif lorsqu'il est exposé au moins 5 jours consécutifs à une température inférieure à 5°C. Cette période de vernalisation permet l'élimination naturelle des individus les plus fragiles et est essentielle à l'initiation de la floraison [Chouard, 1960]. En Europe, le colza d'hiver est largement plébiscité en raison de son rendement élevé comparativement au colza de printemps.

Avec une production mondiale annuelle d'environ 89 millions de tonnes, la culture du colza occupait 34 millions d'hectares en 2023. Première productrice mondiale,

l'Union Européenne a contribué à 23 % de cette production mondiale (Figure 1.1). La France, premier producteur de colza au sein de l'Union Européenne, a généré 4,5 millions de tonnes de graines, réparties sur 1,3 million d'hectares, soit 5 % des surfaces arables françaises (Source : USDA, FAO).

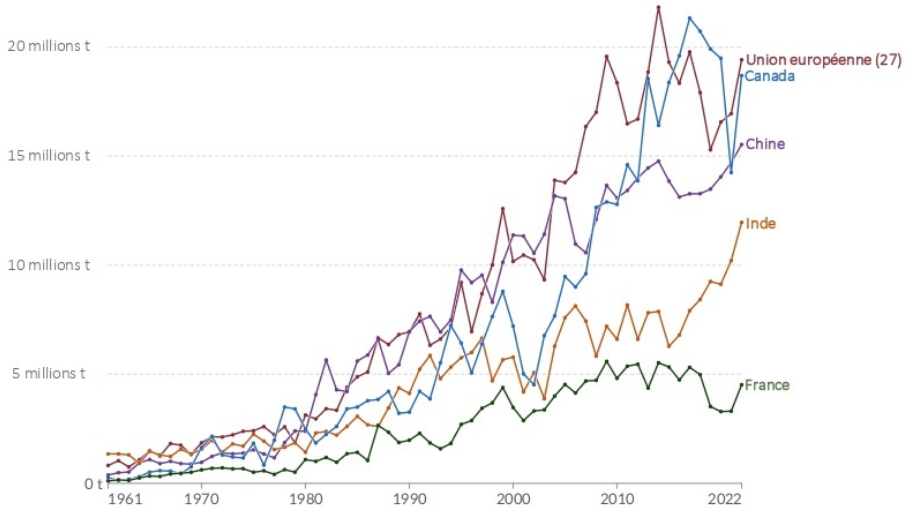


FIGURE 1.1 – Évolution de la production de graines de colza à travers le monde de 1961 à 2022 . Source : Food and Agriculture Organization of the United Nations

1.1.2 Débouchés et valorisation de la culture

Produisant une graine contenant plus de 40 % d'huile et 20 % de protéines [Wanasundara *et al.*, 2016], le colza est valorisé *via* deux principales filières : la filière alimentaire et la filière industrielle non alimentaire (Figure 1.2 A).

Grâce à son huile riche en acides gras insaturés, présentant une forte teneur en acides gras oméga-3 (ω_3) et une faible teneur en acide érucique [Lin *et al.*, 2013], le colza permet la production d'une des huiles les plus saines pour la santé humaine. Les acides gras les plus présents dans l'huile de colza sont les acides oléiques et linoléiques, tous deux contribuant à maintenir une cholestérolémie normale et à diminuer l'hypertension (Figure 1.2 B). En outre, l'huile de colza, grâce à sa composition en polyphénols, stérols, flavonoïdes, tocophérols et phospholipides, présente de multiples qualités anti-inflammatoires, immunostimulantes et anti-oxydantes [SzydOwska-Czerniak, 2013]. Plus largement, la littérature rapporte que la consommation d'huile de colza permet une diminution des risques de maladies cardiaques, d'accidents vasculaires cérébraux ischémiques, de cancers et d'autres maladies chroniques [Chew, 2020].

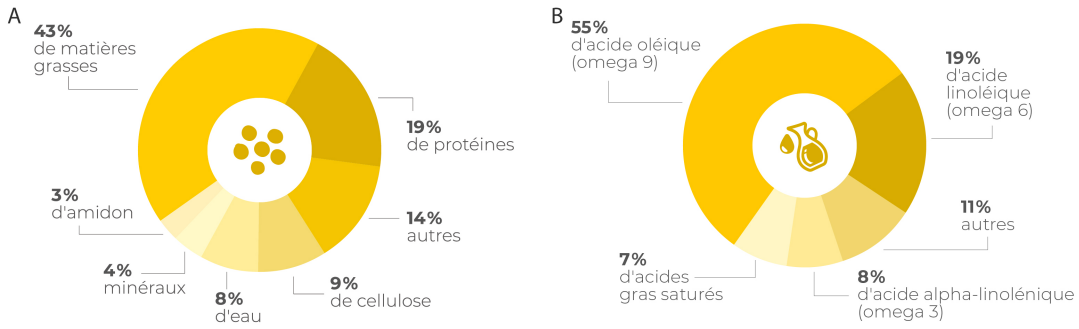


FIGURE 1.2 – Composition générale (A) et composition en acide gras (B) de la graine de colza. Source : Terre Univia

Par ailleurs, les résidus obtenus après la trituration des graines, appelés tourteaux, peuvent être utilisés dans l'alimentation animale. En effet, ce tourteau, riche en protéines et en minéraux, peut être directement incorporé dans les rations alimentaires des bovins, volailles et porcs [Mattila *et al.*, 2018]. En France, le tourteau de colza tend à remplacer progressivement le tourteau de soja dans l'alimentation animale. Bien qu'il présente des qualités nutritives légèrement inférieures à celles du tourteau de soja (34 % contre 46 %; Tableau 1.1), son coût de production 70 % moins élevé, le rend particulièrement compétitif. De plus, l'utilisation accrue des tourteaux de colza produits sur le territoire national ou européen contribue à l'autosuffisance protéique alimentaire et à la réduction des émissions de gaz à effet de serre liées à l'importation de soja en provenance principalement du continent américain. Enfin, les tourteaux de colza peuvent également être une source de protéines pour l'alimentation humaine, en remplacement des protéines d'origine animale dans des formulations végétaliennes (Exemple : YUMGO©, Avril©, DSM©).

TABLEAU 1.1 – Comparaison de la composition des tourteaux de colza et de soja. Source : [Trou *et al.*, 2023]

Par kg brut *(Source : INRA 2018)*	**Tourteau de colza**	**Tourteau de soja**
Matière sèche (%)	**89**	88
Protéines brutes (%)	33,9	46,3
Cellulose brute (%)	**12,8**	6
Matière grasse (%)	**2,2**	1,6
Ca absorbable (g/kg)	**4,2**	1,8
P absorbable (g/kg)	**8**	4,3

En plus de son utilisation dans l'alimentation humaine, l'huile de colza peut être utilisée dans de nombreux domaines industriels, tels que la synthèse de

biocarburants et la chimie verte biosourcée [Chew, 2020]. Pour la production de biocarburants, la transestérification des acides gras contenus dans l'huile permet l'obtention de deux produits : le glycérol et le biodiesel [Bouaid *et al.*, 2009]. Contrairement à son homologue pétrolier, le biodiesel est un biocarburant biodégradable et non toxique, permettant de réduire jusqu'à 78 % les émissions de CO_2 [Coronado *et al.*, 2009](Figure 1.3). De plus, les progrès réalisés dans le domaine de la chimie verte ont permis la synthèse de multiples produits biosourcés issus à la fois de l'huile et du tourteau de colza [Bandara *et al.*, 2018]. Ce sont alors des biolubrifiants, des tensioactifs, des encres ou encore des solvants qui ont vu le jour. Moins polluants et donc plus écologiques, ces produits s'intègrent directement dans un contexte de décarbonation et constituent de réelles alternatives à la chimie pétrolière.

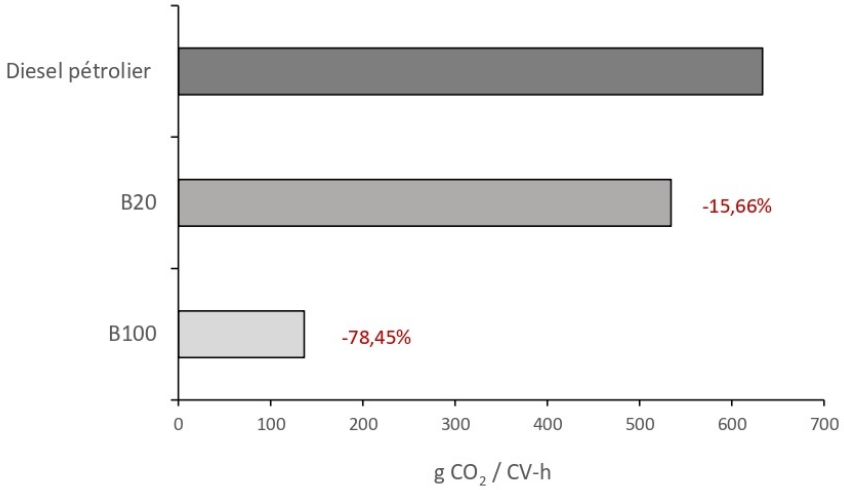


FIGURE 1.3 – Comparaison des émissions nettes CO_2 (en g CO_2 par cheval.h^{-1}) durant le cycle de vie complet d'un moteur thermique en fonction du type de carburant utilisé *i.e.* B20 (80% de diesel pétrolier et 20% de biodiesel) et B100 (100% de biodiesel). D'après [Coronado *et al.*, 2009]

1.1.3 Cycle de développement

En France, la culture du colza d'hiver s'étale sur environ 10 mois. Il est semé entre la fin du mois d'août et le début du mois de septembre, à une densité de semis allant de 30 à 60 graines par m^2. La récolte des graines a lieu entre les mois de juin et juillet de l'année suivante, selon les conditions climatiques. Durant le cycle, les différents stades de développement sont identifiés à l'aide de l'échelle Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und CHemische Industrie (BBCH), qui se base sur les différents stades phénologiques et/ou l'accumulation de degrés jours [Lancashire *et al.*, 1991]. Le cycle de développement du colza est composé de deux phases principales : la phase végétative et la phase reproductive (Figure 1.4).



Phase végétative				Phase reproductive			
Germination	Levée des semis	Développement des feuilles	Montaison	Formation des bourgeons	Floraison	Formation des gousses	Murissement
GS 0 – 09	GS 10 – 19	GS 20 – 27	GS 30 – 39	GS 40 – 59	GS 60 – 69	GS 70 – 79	GS 80 – 89
Août	Août	Septembre	Mars/Avril	Avril	Mai	Mai/Juin	Juin/Juillet

FIGURE1.4 – Différents stades de développement du colza d'hiver. Source : Yara

La phase végétative débute par la germination, durant laquelle la plante utilise les réserves disponibles dans la graine pour développer son système racinaire (radicelle) et ses deux cotylédons. À ce stade, la croissance de la plante est lente et modulée par l'absorption et la synthèse de composés carbonés et azotés. Une fois que la plante a atteint le stade où elle possède une vingtaine de feuilles "vraies" et un pivot, elle est qualifiée de rosette. Durant la période automnale, le colza démontre une capacité d'absorption de l'N du sol supérieure à celle d'autres plantes de grandes cultures, telles que les poacées ou les légumineuses [Laine *et al.*, 1993]. Au cours de cette phase du cycle de développement, une partie de l'N absorbé est stockée sous forme de protéines racinaires spécifiques (VSP, vegetative storage protein), qui constitueront une source d'N remobilisable vers les organes en croissance (tiges, feuilles et graines) dès la reprise de la végétation au printemps [Noquet *et al.*, 2004].

Par ailleurs, durant toute la phase végétative, la sénescence foliaire séquentielle du colza participe à la remobilisation de l'N des feuilles les plus âgées vers les organes en croissance. Ce processus est essentiel car il permet un recyclage de l'N endogène nécessaire à la croissance de la plante et notamment à la transition vers la phase reproductive en conditionnant le nombre de ramifications, l'initiation des premiers primordiaux floraux dont découlera le nombre de fleurs et les futures siliques [Bouchet *et al.*, 2016]. Néanmoins, ce processus de remobilisation n'est pas optimal puisque les feuilles chutant lors du stade végétatif présentent des teneurs en N élevées (allant de 2 à 4,5 % de la masse sèche) et contribuent à un retour important d'N au sol qui, après minéralisation, peut entraîner des pollutions environnementales [Triboi-Blondel *et al.*, 1988, Dejoux *et al.*, 2000].

Durant la phase reproductive, les capacités d'absorption racinaire d'N chutent drastiquement et l'N endogène devient la seule source disponible pour le remplissage des graines [Rossato, 2001]. Dans ce contexte, la remobilisation d'N des tissus végétatifs tels que les tiges, feuilles et le pivot [Malagoli, 2005] fait appel à un type de sénescence qualifié de monocarpique, un processus généralisé à tous les organes de la plante qui permet une remobilisation de l'N endogène au profit de la graine.

Contrairement à la sénescence séquentielle, cette sénescence monocarpique est particulièrement efficace puisque les feuilles chutant lors de cette phase reproductive présentent des teneurs en N très faibles (de l'ordre de 1 % de la matière sèche).

1.2 Fertilisation et bilan agro-environnemental de la culture de colza

L'obtention de rendements optimaux du colza nécessite l'application de fertilisants minéraux et/ou organiques. Dans le sol, l'N, le soufre (S), le potassium (K) et le phosphore (P) peuvent être en concentrations limitantes et doivent être apportés à la culture. Par ailleurs, certains éléments comme le bore (B) et le molybdène (Mo) peuvent être ajoutés pour favoriser le développement de la plante. Comparativement à d'autres espèces de grande culture, le colza, qualifié de nitrophile, requiert des apports de fertilisants azotés (allant de 160 à 250 unités) [Rathke *et al.*, 2005] mais aussi soufrés (30 unités) importants [Oenema et Postma, 2003].

1.2.1 Besoins en soufre et fertilisation soufrée

La prise de conscience de l'impact anthropique sur les changements climatiques a conduit de nombreux états à conclure des protocoles d'accords visant à réduire les émissions de polluants atmosphériques. Par exemple, concernant les émissions de dioxyde de soufre (SO_2), la ratification des protocoles d'Helsinki (1985) et d'Oslo (1994) a conduit à une forte diminution des émissions de SO_2 anthropiques au cours des trente dernières années, entraînant une réduction des dépôts soufrés sur les terres arables (Figure 1.5).



FIGURE 1.5 – Évolution des émissions de dioxyde de soufre (SO_2) en France entre 1960 et 2020 suite à la ratification des protocoles d'Helsinki (1985) et d'Oslo (1994) et de leur prolongement lors de la COP18 de Doha (2012). Source : CITEPA

Dans ce contexte, de nombreuses cultures telles que le colza, exigeantes en S, ont été confrontées à une oligotrophisation en S des sols, entraînant des carences nutritionnelles. Le S est un élément essentiel à la synthèse d'acides aminés soufrés, tels que la cystéine et la méthionine, de sulfolipides et de composés volatils (nitrile, thiocyanate et isothiocyanate), mais également à l'élaboration du rendement et de la qualité des produits récoltés [Poisson *et al.*, 2019]. Ainsi, chez le colza, l'application de fertilisants soufrés est devenue essentielle pour maintenir un rendement satisfaisant et une bonne qualité de l'huile et du tourteau [Rathke *et al.*, 2005].

Cependant, l'application de 30 unités de S préconisée par les instituts techniques et/ou les chambres d'agriculture est souvent une dose définie par défaut et de manière empirique, qui ne prend en compte ni les types de sols ni les précédents culturaux et ne correspond pas toujours aux besoins réels en S des plantes. En effet, les travaux réalisés par Sarda *et al.* ont mis en évidence qu'il est essentiel de se baser sur des paramètres plus larges, tels que le génotype, le travail du sol, le type de sol, les apports de matières organiques, ou encore les précipitations pour calculer les apports en S au plus juste et ainsi éviter les situations de carence en S mais aussi les apports excessifs de fertilisants soufrés [Sarda *et al.*, 2014]. Ces résultats montrent l'importance de développer des outils de diagnostic permettant d'identifier les situations de carences en S au champ et ainsi de mieux piloter la fertilisation en S en l'apportant seulement aux parcelles déficitaires.

Par ailleurs , les travaux de thèse réalisés par Maillard *et al.* ont mis en évidence une accumulation importante de Mo dans des colzas carencés en S. Cette accumulation pouvant être expliquée par le fait que les transporteurs racinaires impliqués dans

l'absorption du sulfate (SO_4^{2-})(SULTR1.1 et SULTR1.2) peuvent également transporter le Mo [Maillard *et al.*, 2016a]. Ainsi, il a été démontré que la surexpression de ces transporteurs lors d'une carence en S s'accompagnait d'une augmentation significative des teneurs en Mo. Face à ce constat, ces auteurs ont proposé un indicateur spécifique et précoce (Figure 1.6) basé sur le calcul du ratio des teneurs foliaires en Mo et en S ([Mo] / [S]), dont la valeur est d'autant plus forte que la carence en S est sévère [Maillard *et al.*, 2016b]. Utilisable en condition de plein champ, cet indicateur pourrait permettre de détecter précocement les carences en S au sein d'une parcelle et d'apporter la fertilisation S nécessaire avant que les symptômes de carences ne soient visibles et avérés.

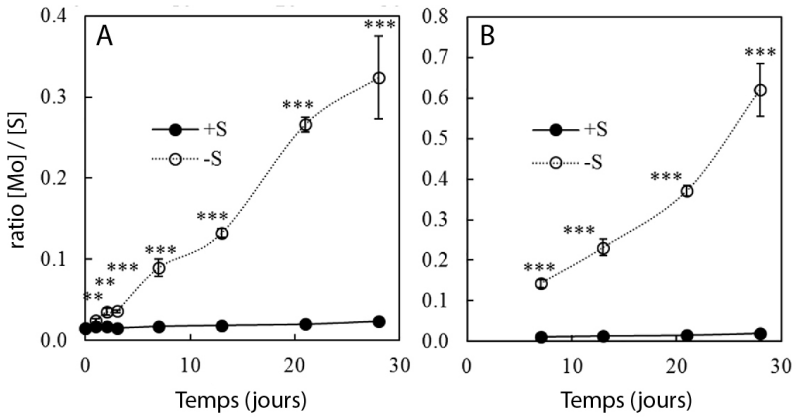


FIGURE 1.6 – Évolution du ratio des teneurs en molybdène et en soufre ([Mo]/[S]) chez le colza en fonction du nombre de jours de carence en S (-S) ou non (+S). Dans les feuilles déjà présentes au moment de la carence en S (**A**) et dans les feuilles émises durant la carence (**B**). Source : [Maillard *et al.*, 2016b]

1.2.2 Besoins en azote du colza

Composant essentiel à la synthèse des protéines, l'N est un élément majeur qui conditionne le rendement ainsi que la qualité des produits récoltés. Dans le but d'évaluer la capacité d'une culture à valoriser l'N prélevé dans le sol, un indicateur est utilisé : l'Efficience d'Usage de l'Azote (EUA), définie comme étant le rendement en grain obtenu par unité de N disponible dans le sol [Avice et Etienne, 2014b]. L'EUA peut être divisée en deux sous-composantes : l'**E**fficience d'**Ab**sorption de l'**A**zote (EAbA) et l'**E**fficience d'**Ut**ilisation de l'**A**zote (EUtA) (Figure 1.7).

$$EUA = EAbA + (EAA + ERA) \times EUtA$$

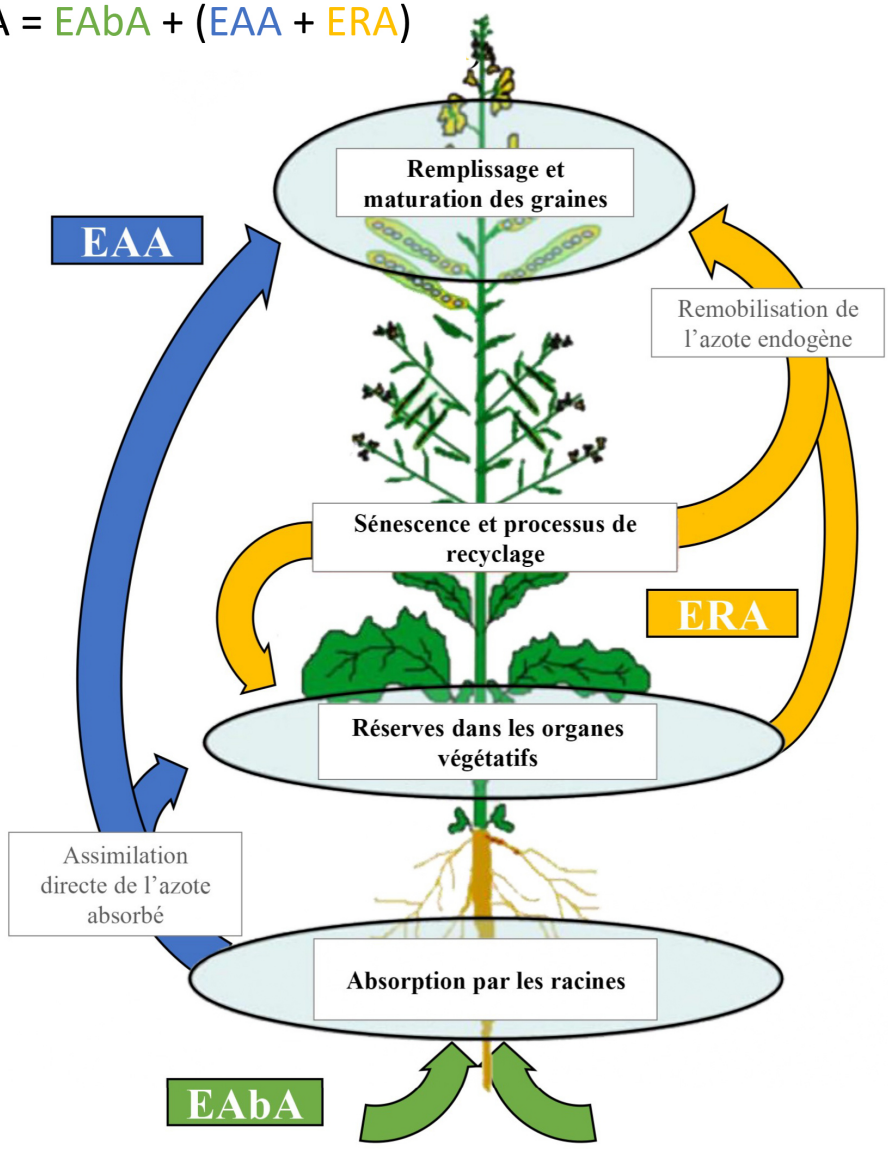


FIGURE1.7 – Schéma des différentes composantes de l'**E**fficience d'**U**sage de l'**A**zote (EUA) chez le colza. EUA : **E**fficience d'**U**sage de l'**A**zote ; EAbA : **E**fficience d'**Ab**sorption de l'**A**zote ; EUtA : **E**fficience d'**Ut**ilisation de l'**A**zote ; EAA : **E**fficience d'**A**ssimilation de l'**A**zote ; ERA : **E**fficience de **R**emobilisation de l'**A**zote. Source : [Dechaumet, 2018]

L'Efficience d'Absorption de l'Azote (EAbA) est définie comme la capacité du système racinaire à absorber l'N présent dans le sol. Chez le colza, l'EAbA est modérée mais stable durant les premières phases du développement (période automno-hivernale), puis devient très élevée en sortie d'hiver, lors de la reprise de végétation, avant de diminuer drastiquement pendant la floraison [Malagoli, 2005].). Compte-tenu de l'augmentation significative de la biomasse à partir du printemps, les apports en intrants N sont alors généralement effectués durant cette période afin de compléter le pool d'N disponible dans le sol. En France, les apports d'N sont fractionnés et réalisés à trois stades clés du développement : la reprise de végétation, le début de la

montaison et le stade boutons floraux séparés (Source : Terres Inovia). L'absorption des différentes formes d'N disponibles dans le sol fait intervenir deux systèmes de transport à haute (HATS) et à faible affinité (LATS). Ainsi, les transporteurs HATS et LATS vont permettre aux plantes d'absorber respectivement l'N pour de faibles (< 1 mM) et de fortes concentrations (> 1 mM).

L'Efficience d'Utilisation de l'Azote (EUtA), la seconde composante de l'EUA, est subdivisée en deux sous-composantes : l'Efficience d'Assimilation de l'Azote (EAA) et l'Efficience de Remobilisation de l'Azote (ERA). La première (EAA) est définie comme la capacité de la plante à assimiler l'N minéral absorbé dans le sol. La seconde (ERA) est définie par la capacité de la plante à remobiliser l'N endogène des tissus sénescents (sources) vers des tissus en croissance (puits). Chez le colza, les capacités d'assimilation sont considérées comme efficaces alors que l'efficience de remobilisation est qualifiée de médiocre [Avice et Etienne, 2014b]. Différents travaux ont mis en évidence que cette faible ERA serait principalement due à une faible remobilisation de l'N foliaire lors de la sénescence séquentielle durant la phase végétative. Par exemple, des travaux conduits sur l'ensemble du cycle de développement ont montré que les feuilles chutant lors des stades végétatifs peuvent contenir des teneurs en N élevées de l'ordre de 2 à 4,5 % de leur masse sèche [Malagoli, 2005] alors que celles tombant lors des stades de remplissage des graines contiennent seulement 1 % d'N (N structurel). En outre, des travaux de modélisation ont démontré qu'une optimisation de la remobilisation de l'N endogène des organes sénescents vers les graines durant les stades végétatifs permettrait (i) une augmentation du rendement de 15 % sans augmentation des apports en intrants N et (ii) de réduire la quantité d'N restituée au sol d'environ 15 % [Malagoli, 2005]. L'ensemble de ces travaux montre que l'ERA constitue le levier majeur d'optimisation de l'EUA du colza.

Pour pallier à ces problèmes de remobilisation, la culture du colza requiert de fortes doses d'intrants N pour assurer des rendements et une qualité des produits récoltés optimaux, ce qui n'est pas sans conséquence sur son bilan économique et environnemental. En effet, en plus de constituer un poste de dépenses important pour l'agriculteur, la fertilisation N est également à l'origine d'effets néfastes sur l'environnement qui sont liés à la fabrication des intrants et à leur utilisation. Par exemple, lors de fortes précipitations, l'azote nitrique présent dans le sol (issu des fertilisants N et/ou de la minéralisation de la matière organique) est lessivé et entraîne la pollution des eaux superficielles et souterraines, contribuant à l'acidification et à l'eutrophisation des cours d'eau, ainsi qu'à la prolifération des algues vertes dans les milieux estuariens. Par ailleurs, les processus de volatilisation de l'N ammoniacal et de dénitrification participent aux pertes d'N en libérant respectivement dans l'atmosphère de l'ammoniac (NH_3) et du protoxyde d'azote (N_2O), troisième gaz à effet de serre le plus abondant après le dioxyde de carbone (CO_2) et le méthane (CH_4).

Face à ce constat, la France a adopté, en 1991, la directive nitrate 91/676/CEE dans le but de limiter les pertes d'N dans l'environnement. Celle-ci interdit les apports de

NO_3^- sur les cultures durant la période automno-hivernale, afin de limiter les lessivages consécutifs lors d'épisodes de fortes précipitations. Cette interdiction n'a que peu d'impact sur le rendement des cultures puisqu'il est admis que la disponibilité en N du sol durant cette période est suffisante pour couvrir les besoins en N de la culture [Colnenne, 1998]. En outre, cette directive nitrate limite les apports en NO_3^- à 170 $kg.ha^{-1}$ dans les zones classées vulnérables (Figure 1.8) où le lessivage de NO_3^- peut menacer, à court terme, la qualité des milieux aquatiques et plus particulièrement les nappes phréatiques.

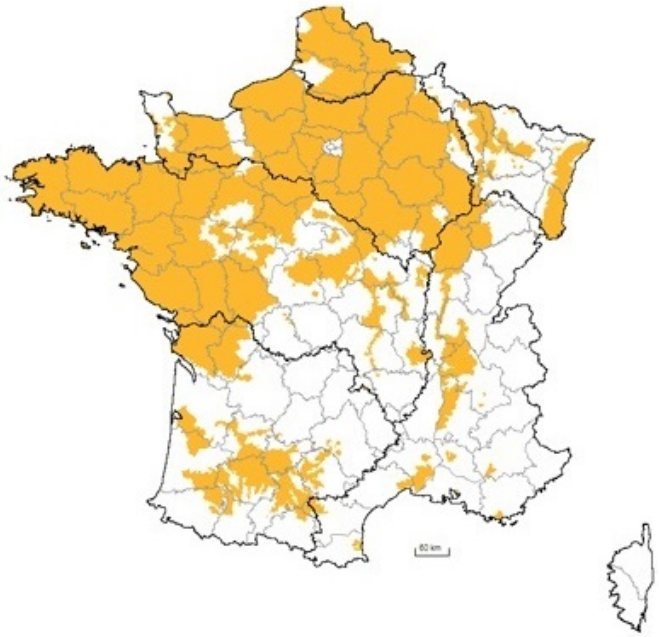


FIGURE 1.8 – Zones françaises classées comme "vulnérables" à la pollution par le nitrate d'origine Source : [Benoît, 2013]

Ainsi, les limitations d'apports d'intrants imposées par la directive nitrate peuvent être combinées avec des stratégies alternatives visant à améliorer la gestion de l'N par les plantes de grande culture telles que le colza. Ces stratégies reposent sur la sélection/amélioration variétale ainsi que sur le développement et la mise en place de pratiques culturales innovantes.

1.3 Les différents leviers d'optimisation des performances agro - environnementales du colza

1.3.1 Variétés de colza présentant une meilleure efficience d'utilisation de l'azote

Dans le but d'optimiser les apports en N, de multiples génotypes de colza présentant des EUA accrues ont été sélectionnés au cours de ces dernières décennies. Pour cela, deux techniques sont principalement utilisées : la création d'organismes génétiquement modifiés (OGM) et la sélection variétale.

La création d'OGM consiste à modifier l'expression de gènes impliqués dans l'assimilation ou la remobilisation de l'N. Par exemple, comparativement à des plantes sauvages alimentées avec 200 U d'N, des colzas génétiquement modifiés surexprimant au niveau racinaire une alanine aminotransférase d'orge présentent un prélèvement d'NO_3^- augmenté de 76 % et un rendement équivalent avec une dose d'N inférieure de 40 % [Good *et al.*, 2007]. Ces travaux montrent que l'obtention d'OGM peut être une stratégie pertinente pour augmenter les performances agronomiques du colza tout en réduisant les doses d'intrants N. Cependant, bien que la culture d'OGM à des fins commerciales soit autorisée dans divers pays à travers le monde, elle est interdite depuis 2008 en France et en Europe (à l'exception de certains pays autorisés à cultiver le maïs MON810 synthétisant un insecticide efficace contre la noctuelle (*Sesamia nonagrioides*) et la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*)) (Source : ministère de l'Agriculture). Dans ce contexte, l'obtention d'OGM est réservée à des fins de recherche fondamentale visant notamment à mieux appréhender les différents mécanismes impliqués dans l'usage de l'N chez les végétaux. Par conséquent, d'autres voies d'amélioration des performances agro-environnementales du colza doivent être explorées.

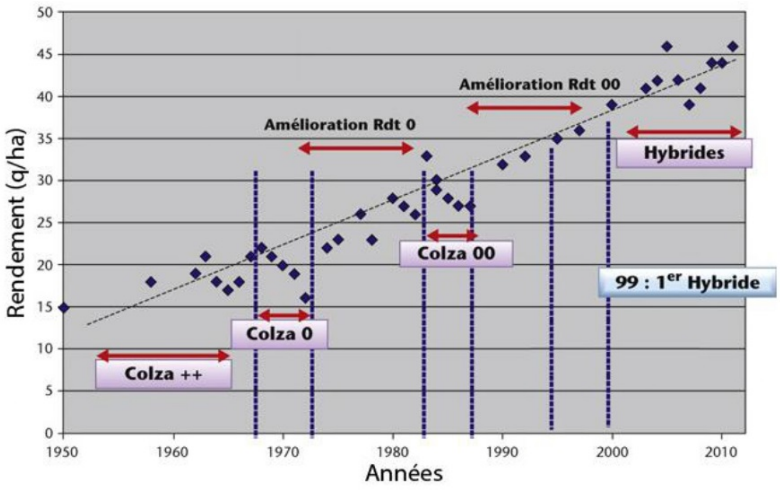


FIGURE 1.9 – Évolution des rendements au cours des diverses améliorations des variétés de colza. **Colza ++** : apparition des 1ères variétés résistantes à des maladies telles que le phoma provoqué par *Leptosphaeria maculans* ; **Colza 0** : variétés sans acide érucique ; **Colza 00** : variétés sans acide érucique et sans glucosinolate ; **Hybrides** : Variété mise au point *via* l'utilisation de l'hybridation interspécifique. Source : OCL

La sélection variétale a permis l'obtention de variétés de colza dites "simple zéro, (0)" dépourvues d'acide érucique puis "double zéro, (00)" dépourvues d'acide érucique et de glucosinolates (Figure 1.9). Les colzas 00 ont la particularité de produire des graines sans acide érucique, responsable de maladies cardio-vasculaires, et sans glucosinolates, composés non appétents pouvant se retrouver dans le tourteau consommé par le bétail [Chèvre *et al.*, 1998].

Afin d'améliorer les rendements, l'utilisation de la variabilité génétique a été peu à peu remplacée par l'utilisation de l'hybridation interspécifique [Nabloussi, 2015]. Cette technique a permis d'augmenter la diversité génétique du colza, en le croisant avec des espèces proches telles que la ravenelle (*Raphanus raphanistrum*). Cependant, la sélection variétale et l'hybridation ont été réalisées pendant la Révolution Verte (1960-1990) et avaient pour objectif principal d'identifier des variétés à haut rendement sans limitation des doses d'N apportées. Ainsi, les variétés issues de ces programmes de sélection ne correspondent pas aux préoccupations actuelles qui visent à maintenir les rendements tout en limitant les apports d'intrants.

C'est dans ce contexte qu'est né le projet Investissements d'avenir RAPSODYN (2012-2019, Responsable Dr N. Nési, Directrice de recherche à l'INRAE UMR 1349 IGEPP, Le Rheu), associant divers laboratoires de recherche publique, instituts techniques et sociétés privées, dont l'objectif consistait à identifier de nouvelles variétés de colza à forte efficience d'usage de l'N en condition de faibles apports de fertilisants azotés. Ce projet a notamment permis d'exploiter la variabilité génotypique naturelle et d'identifier des variétés qui assimilent et remobilisent mieux l'N issu de la fertilisation et de la minéralisation des matières organiques. Par exemple, les travaux de Girondé *et al.* visant à cribler une dizaine de génotypes présentant des efficiences

de remobilisation de l'N foliaire contrastées ont permis de montrer que les génotypes les plus efficients étaient ceux qui avaient la plus forte activité protéolytique associée à de fortes activités des protéases à cystéine, sérine et aspartate [Girondé *et al.*, 2015b]. Parmi les protéases identifiées, certaines telles que les protéases RD21-like et SAG12 ont même été proposées comme des candidats potentiellement utilisables pour cribler et identifier des génotypes de colza à forte efficience d'usage de l'N dès le stade cotylédonaire [Poret *et al.*, 2017].Ces travaux d'importance ouvrent de nouvelles perspectives et notamment, celle de disposer prochainement de variétés de colza qui seront plus économes en intrants et plus efficaces dans la gestion de leur pool d'N endogène.

L'identification de ces variétés plus efficientes n'est pas incompatible avec le développement d'autres stratégies visant à améliorer les pratiques culturales existantes. Dans ce contexte, le développement d'outils de diagnostic (*cf.* ratio [Mo]/[S] présenté ci-avant) et/ou de pilotage de la fertilisation, mais également le développement de nouvelles pratiques culturales, constituent d'autres voies d'approche.

1.3.2 Amélioration des pratiques culturales existantes

En 1998, le Centre d'Etudes Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains (CETIOM qui a fusionné en 2015 avec l'UNIP (Union Nationale Interprofessionnelle des plantes riches en Protéines) pour devenir Terre Inovia) a conduit de nombreuses expérimentations sur les besoins en N des grandes cultures. Les résultats issus de ces travaux ont permis de proposer un outil appelé "Réglette azote colza", toujours utilisé de nos jours. Cet outil prenant en compte différents facteurs tels que le type de sol (superficiel ou profond), l'apport de matières organiques, les objectifs de rendement, le poids frais du colza en entrée et en sortie d'hiver ainsi que l'Indice de Nutrition Azotée (INN) de la culture, propose aux agriculteurs des doses d'N à apporter qui sont ajustées aux besoins de la plante.

Depuis, d'autres outils, utilisant des technologies plus récentes et pouvant être classés en fonction de leurs échelles d'utilisation et de précision, se sont développés. Par exemple, les satellites de télédétection (Farmstar©, par exemple), basés sur l'analyse de prises de vues d'une parcelle cultivée, permettent d'obtenir un état des lieux de son statut N et de préconiser les doses d'N à appliquer en fonction des différentes zones identifiées (Figure 1.10)

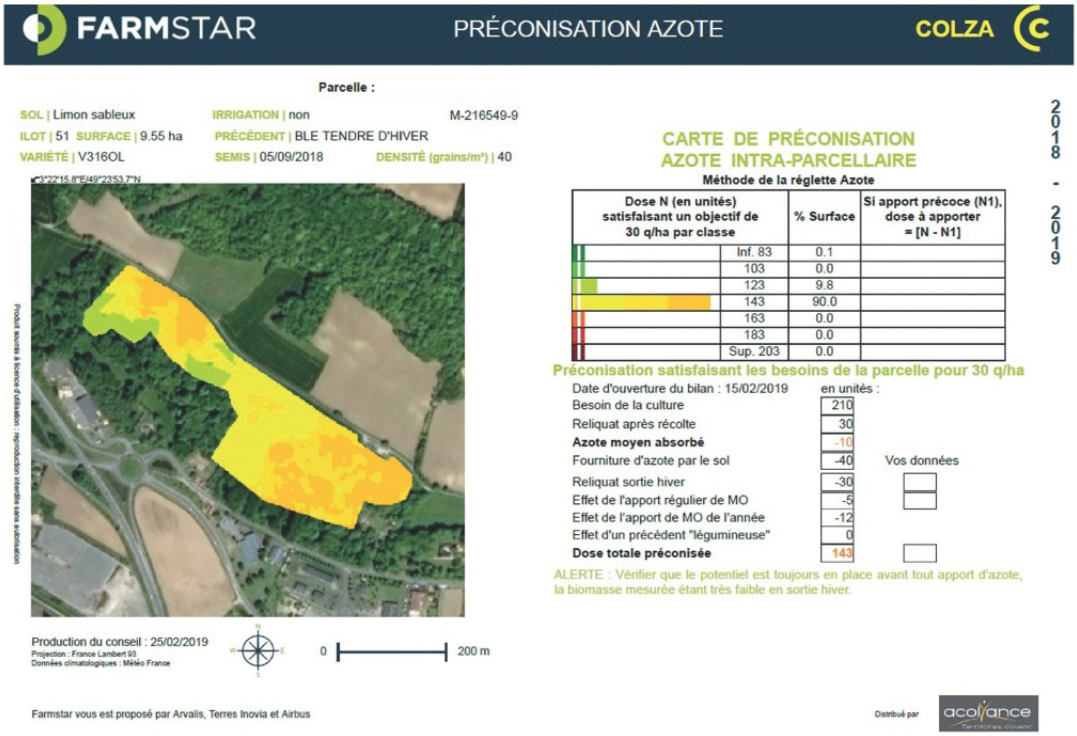


FIGURE 1.10 – Rapport généré par le satellite de télédétection Farmstar©. En combinant l'analyse des images satellites, des précédents culturaux et la composition du sol, cet outil permet de cartographier précisément les besoins de la culture en intrants azotés au niveau d'une parcelle de blé et de préconiser les doses d'N à apporter. Source : Farmstar©

Dans le même esprit, des capteurs embarqués sur les engins agricoles ou les drones, utilisant la réflectance et/ou l'analyse d'images, permettent aussi de connaître le statut nutritionnel de zones spécifiques au sein d'une parcelle. À l'échelle de l'individu, des outils portatifs non destructifs utilisant des capteurs de transmittance/réflectance tels que la pince SPAD© (Konica Minolta Inc., Japon) ou de fluorescence tels que le Multiplex© (Force-A, Orsay, France) permettent quant à eux d'évaluer le statut azoté et/ou les teneurs en chlorophylles, en flavonoïdes et en anthocyanes de la plante [Rosso *et al.*, 2022]. Enfin, différents outils de fluorescence à rayons X portatifs (XRF) peuvent générer rapidement et précisément un bilan élémentaire complet de la plante [Poisson *et al.*, 2019].

En outre, la spectrométrie proche infrarouge (NIRS) permet la réalisation d'analyses rapides et non destructives d'échantillons végétaux. Cette technologie permet de déterminer la teneur en N des feuilles, mais aussi la teneur en protéines et en lipides des graines [Wan *et al.*, 2018]. Cependant, bien que présentant une polyvalence intéressante, l'utilisation de la spectrométrie proche infrarouge reste limitée en raison des traitements informatiques importants nécessaires pour exploiter les données.

Outre l 'utilisation de ces outils, le fractionnement des épandages de fertilisants (notamment N) pourrait être reconsidéré afin de mieux correspondre aux besoins

nutritionnels de la plante à des stades clés de sa croissance et ainsi d'optimiser leurs prélèvements.

Par ailleurs, l'utilisation de nouvelles formulations d'engrais N à libération lente et contrôlée pourrait également être une stratégie pour limiter les pertes d'N par volatilisation. Ces engrais innovants pourraient, par exemple, inclure dans leur formulation des inhibiteurs d'uréases et de nitrification, permettant de limiter la volatilisation d'ammoniac (NH_3), le lessivage du nitrate (NO_3^-) et la production de protoxyde d'azote (N_2O). Par exemple, chez le colza, Arkoun *et al.* ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs d'uréases et de la nitrification couplée à un apport d'engrais uréique ou ammoniacal permet de limiter les pertes d'N par volatilisation de 43 %, la lixiviation de NO_3^- de 23 % et s'accompagne d'un meilleur prélèvement d'N issu du fertilisant chez le colza [Arkoun *et al.*, 2012].

1.3.3 Les cultures associées

Les cultures associées sont définies comme la coculture de deux ou plusieurs espèces sur la même parcelle lors d'une partie significative de leurs cycles de développement [Willey, 1979].Ce type de pratique permet l'échange de services entre les différentes plantes de l'association. Ces services peuvent être des services de fertilisation [Génard *et al.*, 2016, Génard *et al.*, 2017a]), de répulsion d'insectes ou de maladies [Trenbath, 1993, Hauggaard-Nielsen et Jensen, 2001]), de limitation de la prolifération des adventices, ou encore de support [Lopez-Ridaura *et al.*, 2021]. L'utilisation de ce type de pratique avait progressivement disparu dans nos campagnes, mais la volonté de résoudre les problématiques environnementales actuelles les a remises sur le devant de la scène. En effet, cette pratique culturale peut permettre de diminuer les apports en intrants et en produits phytosanitaires, mais aussi de réduire les pressions exercées sur l'environnement et la biodiversité. Dans ce contexte, et de par la place prépondérante des Poacées dans les systèmes de culture actuels, les associations Fabacées - céréales ont été les plus étudiées [Duchene *et al.*, 2017].Cependant, l'utilisation de ce type de système dans le cadre de la culture de Brassicacées a vu récemment son intérêt grandir.

Deux stratégies d'association Brassicacées - Fabacées peuvent être envisagées : la première, la plus étudiée, consiste à utiliser des variétés de Fabacées à caractère gélif. Dans ce cas de figure, l'action de la Fabacée est concentrée entre l'automne et une partie de l'hiver, les basses températures hivernales induisant par la suite la mort de la Fabacées. Des essais réalisés par Terres Inovia et l'INRAE ont mis en évidence une augmentation des quantités d'N disponible pour le colza d'hiver et provenant de la Fabacée de l'ordre de 10 à 15 $kg.ha^{-1}$, lors d'une association entre le colza et une Fabacée gélive telle que la lentille (*Lens culinaris*), la vesce (*Vicia sativa*), la féverole (*Vicia faba*) , la gesse (*Lathyrus sativus*) ou encore le trèfle d'Alexandrie (*Trifolium alexandrinum*) [Malagoli, 2005].En outre , ces essais ont permis de montrer

que l'utilisation de ce type d'association permet de réduire les apports d'intrants azotés d'environ 30 $kg.ha^{-1}$ sans impacter le rendement du colza. Au contraire, des travaux réalisés sur l'association moutarde (*Brassica juncea* L.) - lentille (*Lens culinaris* M.) ont montré une diminution de rendement d'environ 50 % chez les deux plantes partenaires [Chardon *et al.*, 2012].Cette étude montre que l'association d'une Fabacée avec une Brassicacée d'intérêt peut négativement impacter le rendement de cette dernière et s'explique principalement par une compétition forte entre les deux plantes pour l'espace, la lumière et certains nutriments. Ces observations mettent en avant le caractère prépondérant de la sélection des espèces à associer, afin de limiter l'impact sur la production de graines de la plante d'intérêt agronomique. En outre, l'association Brassicacées-Fabacées a montré de nombreux bénéfices dans le cadre de la lutte contre les ravageurs. Ainsi, l'utilisation de l'association colza-féverole permet de diminuer de façon significative le nombre de pucerons cendrés (parasite du colza) [Jamont *et al.*, 2014] et de réduire les dommages induits par le charançon et l'altise sur le colza [Cadoux *et al.*, 2015].Enfin, l'utilisation de Fabacées à caractère gélif permet une couverture homogène des sols et permet de réduire le développement d'adventices [Morison *et al.*, 2014].

Bien que moins étudiées, l'utilisation de Fabacées à caractère non gélif présente elle aussi de nombreux bénéfices. De par leurs implantations s'étalant sur tout le cycle de croissance de la plante d'intérêt, les Fabacées à caractère non gélif peuvent fournir des services à des moments clés du cycle de développement de la Brassicacée. Ces Fabacées tolérant les basses températures rencontrées pendant l'hiver peuvent alors "rhizodéposer" des composés azotés issus de la fixation du N_2 atmosphérique qui seront potentiellement prélevés par le colza tout au long de son cycle de culture et plus particulièrement, lors de la reprise de végétation jusqu'au remplissage des graines. Néanmoins, les Fabacées non gélives étant implantées durant des périodes plus longues, il est essentiel de sélectionner les espèces utilisées afin d'optimiser les processus de fixation de N_2 atmosphérique et de transfert de composés racinaires exsudés vers la Brassicacée tout en limitant la compétition (nutriments et eau du sol, lumière) entre les deux plantes.

Dans ce contexte, les travaux de Génard (2012-2016) ont permis de cribler sept espèces de Fabacées en association avec le colza. Ces travaux réalisés en conditions contrôlées ont permis de retenir trois fabacées pertinentes (le lupin blanc (*Lupinus albus* L.), la vesce commune (*Vicia sativa* L.) et le trèfle incarnat (*Trifolium incarnatum* L.)) qui présentent toutes une augmentation de leur capacité à fixer le N_2 atmosphérique lorsqu'elles sont associées au colza (Figure 1.11). Pour expliquer ces résultats, cet auteur indique que le colza, plante nitrophile, diminue très fortement la concentration en NO_3^- dans la solution du sol, ce qui a pour effet de stimuler la fixation de N_2 atmosphérique de la Fabacée compagne, comme ceci a été montré dans plusieurs études [Xia *et al.*, 2017a, Corre-Hellou *et al.*, 2006, Jensen, 1996]. Parmi ces trois espèces, le lupin, en dépit de ses fortes capacités de fixation de N_2 atmosphérique (Figure 1.11)) et d'exsudation lorsqu'il est associé au colza [Génard *et al.*, 2016],

n'a pas été retenu car il s'est avéré non adapté aux conditions pédoclimatiques locales. Par ailleurs, la vesce, particulièrement efficace pour fixer le N_2 atmosphérique lorsqu'elle est associée au colza (Figure 1.11), n'a pas été sélectionnée car elle présente l'inconvénient d'utiliser le colza comme tuteur naturel et d'entrer en compétition pour la lumière, avec pour conséquence une réduction de la croissance de ce dernier. En se basant alors sur les paramètres de croissance du colza étudiés au stade rosette ainsi que sur les capacités de la Fabacée à se développer mais surtout à fixer le N_2 atmosphérique et à rhizodéposer des composés azotés dans le sol en présence de la Brassicacée, ce criblage a permis de retenir l'association colza (*Brassica napus* L.) - trèfle incarnat (*Trifolium incarnatum* L.).

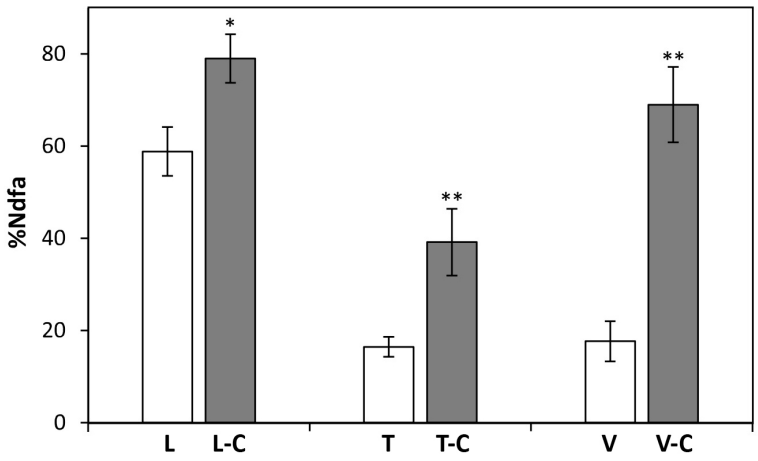


FIGURE 1.11 – Pourcentage d'N provenant de la fixation atmosphérique (Ndfa) chez le lupin blanc (L), le trèfle incarnat (T) et la vesce (V) commune cultivés seuls (histogrammes blancs) ou en association (histogrammes gris) avec le colza (C). Les valeurs indiquent les moyennes ± erreur standard (n=5). Les astérisques * ($p<0,05$) et ** ($p<0,01$) indiquent des différences significatives entre la monoculture et l'association. Source : [Génard *et al.*, 2017a]

Enfin, en complément des effets bénéfiques apportés par les modifications des pratiques culturales présentées précédemment, il est possible d'améliorer la croissance et le développement des plantes, la qualité des produits récoltés, ainsi que leur résistance face à certains stress en utilisant des biostimulants d'origine biologique.

1.3.4 Les biostimulants

Selon l'article EU 2019/1009, "un biostimulant est un produit qui stimule les processus de nutrition des végétaux indépendamment des éléments nutritifs qu'il contient, dans le seul but d'améliorer une ou plusieurs des caractéristiques suivantes des végétaux ou de leur rhizosphère : (i) l'efficacité d'utilisation des éléments nutritifs, (ii) la tolérance au stress abiotique, (iii) les caractéristiques qualitatives et/ou (iv) la disponibilité des éléments nutritifs confinés dans le sol ou la rhizosphère".

Les biostimulants vont améliorer la croissance des plantes, leur rendement et la qualité nutritive des produits ainsi que l'assimilation d'éléments nutritifs [Kabir *et al.*, 2020, Maignan *et al.*, 2021] (Figure 1.12). Concernant l'N, il a été montré que certains biostimulants sont capables d'augmenter son prélèvement [Dellagi *et al.*, 2020] et/ou sa remobilisation [Maignan *et al.*, 2020]). De par leurs capacités à augmenter l'efficience d'utilisation de l'N des végétaux, les biostimulants prennent de plus en plus de place dans le paysage agricole en venant en complément des engrais conventionnels sans les remplacer et en permettant de diminuer leurs apports [Rouphael et Colla, 2018, Xu et Geelen, 2018].

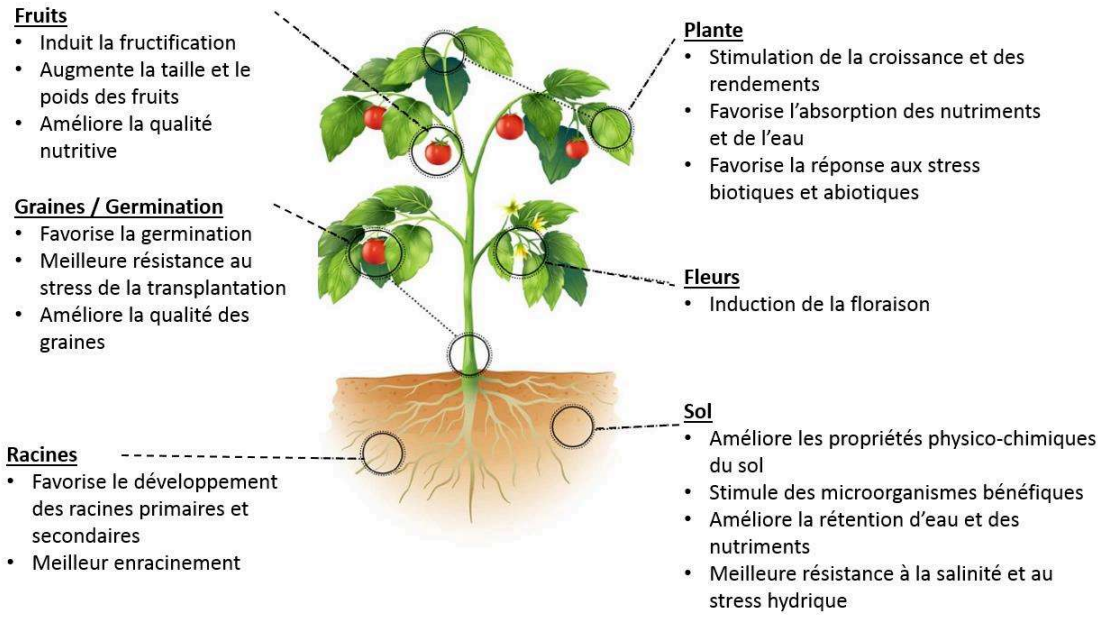


FIGURE 1.12 – Principaux modes d'action des biostimulants retrouvés dans la littérature chez l'ensemble des végétaux. Source : [Hellequin, 2019]

Les biostimulants peuvent se présenter sous différentes formes telles que des extraits d'algues, des hydrolysats de protéines (1/3 des biostimulants vendus), des substances humiques ou encore des micro-organismes [Cristofano *et al.*, 2021]. Bien que les effets de ces différents biostimulants soient avérés chez plusieurs espèces végétales, l'état de l'art ci-après se focalisera uniquement sur ceux ayant montré des effets bénéfiques chez le colza.

Ainsi, l'application d'un extrait d'origine algale (AZAL5, extrait d'*Ascophyllum nodosum*) sur des cultures de colza a montré que celui-ci permet une augmentation de la biomasse totale (+23 % pour les parties aériennes et +102 % pour les racines) et de la teneur en chlorophylles ainsi qu'une amélioration de l'absorption du NO_3^- associée à l'induction des gènes codant les transporteurs dédiés (*BnaNRT1.1* et *BnaNRT2.1*) [Jannin, 2012]. En outre, l'application d'un acide humique (HA7, extrait de tourbe) sur des plantes de colza s'accompagne également d'une augmentation de

la croissance et des teneurs en fer (Fe) et en soufre (S), associée à une augmentation de l'expression des transporteurs *COPT2* et *SULTR* (*1.1* et *1.2*), impliqués respectivement dans leur absorption racinaire [Billard *et al.*, 2014].

Par ailleurs, des microorganismes agissant directement ou indirectement sur la plante, nommés Plant Growth Promoting (PGP) [Glick, 2012], peuvent améliorer la croissance et le rendement de la culture de colza. Par exemple, un apport de bactéries PGP *Pseudomonas fluorescens* permet d'augmenter la biomasse des plantes (+23,97 %) en conditions de plein champ [Lally *et al.*, 2017]. De plus, l'apport de PGP peut permettre d'atténuer les effets négatifs des stress biotiques. Ainsi, il a été montré que des bactéries de la famille *Bacillus*, endophytes du colza, possèdent des propriétés atténuant la maladie de la jambe noire provoquée par une infection de la bactérie pathogène *Leptosphaeria maculans* [Lipková *et al.*, 2021].

Enfin, des éléments minéraux qualifiés d'éléments bénéfiques non essentiels pour la croissance des plantes (tels que le cobalt (Co), le sélénium (Se) et le silicium (Si)) sont aussi considérés comme des biostimulants du fait de leur capacité à favoriser le développement des plantes lorsque celles-ci sont confrontées à des stress biotiques ou abiotiques [du Jardin, 2015]. Parmi les biostimulants minéraux de composition très simple, le rôle du Si chez les végétaux est actuellement particulièrement étudié, comme le montre l'augmentation du nombre de publications ayant trait à ce dernier au cours de la dernière décennie [Pavlovic *et al.*, 2021] (Figure 1.13)

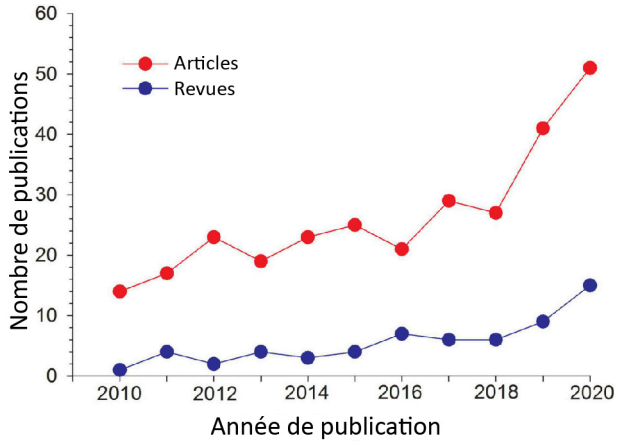


FIGURE 1.13 – Nombre de publications relatives aux effets biostimulants du silicium chez les plantes de 2010 à 2020. Source : [Pavlovic *et al.*, 2021]

Second élément le plus abondant au sein de la croûte terrestre après l'oxygène (O ; [Landré *et al.*, 2020]), le Si représente environ 27 % de la masse totale terrestre [McKeague et Cline, 1963] (Figure 1.14).

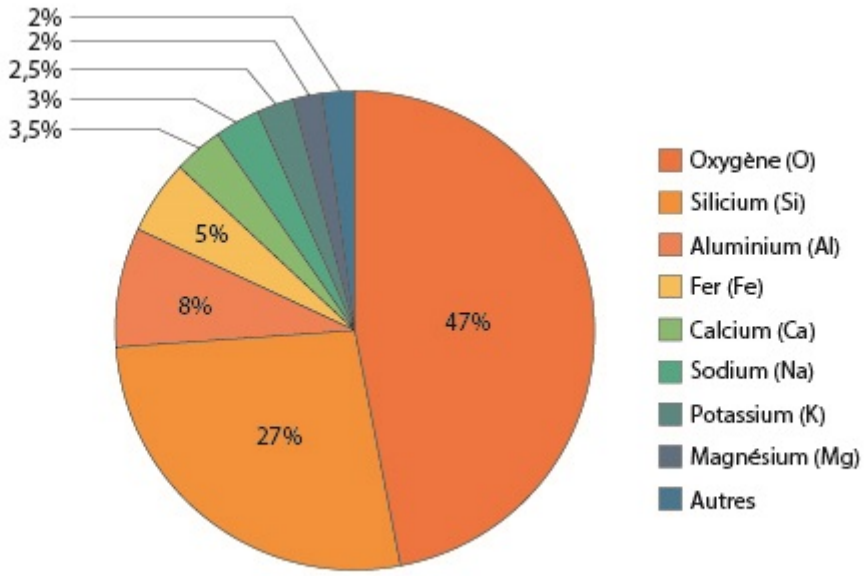


FIGURE1.14 – Composition élémentaire relative de la croûte terrestre. Source : Adaptation de : [McLeod et Shaulis, 2018]

Bien qu'il ne soit pas considéré comme un élément essentiel pour les plantes, le Si a montré de nombreux effets bénéfiques sur la croissance, le développement et la santé de nombreuses espèces végétales [Zajaczkowska *et al.*, 2020]. Toutes les plantes cultivées à travers le monde contiennent du Si. Cependant, sa teneur au sein des tissus (allant de 0,2 à 10 % de la matière sèche) varie très fortement en fonction des espèces et peut parfois atteindre des valeurs égales voire supérieures à celles de macronutriments essentiels tels que le calcium (Ca), le magnésium (Mg) ou encore le phosphore (P ; [Epstein, 1994, Epstein, 1999]).

Ainsi, une classification des espèces végétales en trois catégories a été proposée en fonction de leur teneur en Si mesurée dans la matière sèche [Takahashi *et al.*, 1990] :

— **les fortes accumulatrices** (telles que la prêle (*Equisetum arvense*), le riz (*Oryza sativa*) ou le maïs (*Zea mays*)) dont les teneurs en Si sont comprises entre 1,5 à 10% de la matière sèche,
— **les accumulatrices intermédiaires** (telles que le concombre (*Cucumis sativus*)), dont les teneurs en Si varient de 0,5 à 1,5% de la matière sèche,
— **les faibles accumulatrices** (telles que la tomate (*Solanum lycopersicum*) ou le colza (*Brassica napus*)) chez lesquelles le Si représente moins de 0,5% de la matière sèche.

Même si d'autres hypothèses peuvent être émises (voir partie "perspectives"), les différences de teneurs en Si endogène seraient principalement liées à la présence ou non de transporteurs racinaires (Lsi) de type aquaporines (NIP : Nodular-26-like Intrinsic Proteins) dédiés à l'absorption de Si sous la forme d'acide

monosilicique [Ma et Yamaji, 2015]. Ainsi, si chez des espèces telles que le riz, les transporteurs racinaires (Lsi) ont été identifiés et bien caractérisés, la recherche de gènes hétérologues est restée vaine chez les espèces non accumulatrices telles que le colza.

Chez ces plantes non accumulatrices, l'absorption plus modeste de Si pourrait se faire via d'autres aquaporines moins spécialisées dans le transport de cet élément [Kaur et Greger, 2019]. Une fois absorbé, une grande majorité du Si (99 %) est déposé sous forme de phytolithes (dépôts de silice amorphe) au niveau des parois pectocellulosiques, des méats et des espaces intercellulaires [Meunier, 2003, Meunier *et al.*, 2017] et contribue ainsi à épaissir la paroi (Figure 1.15), qui constitue une barrière physique renforcée limitant par exemple l'infection d'agents pathogènes [Van Bockhaven *et al.*, 2013] et permet également un meilleur port des plantes. Le 1 % de Si restant est sous forme soluble dans les cellules et serait capable de moduler l'activité de certaines enzymes (notamment celles impliquées dans le stress oxydatif et dans la défense des plantes) et/ou de moduler l'expression de nombreux gènes. D'un point de vue physiologique, la plupart des études suggèrent qu'en l'absence de stress biotique ou abiotique, le Si n'a que peu voire pas d'effet [Coskun *et al.*, 2019]. En revanche, en condition de stress, le Si peut permettre aux plantes de croître d'une manière quasi similaire aux plantes témoins n'ayant pas subi de stress.

Bien que de nombreuses études présentent les effets bénéfiques d'un apport de Si lors de stress biotiques et abiotiques chez de nombreuses espèces végétales, peu d'études se focalisent sur ses effets chez le colza. Il a été notamment montré que le Si atténue chez cette plante les effets d'une infection par le champignon *Sclerotinia sclerotiorum*, responsable de la pourriture blanche, ou par le champignon *Plasmodiophora brassicae*, provoquant la hernie du chou, en induisant notamment des gènes impliqués dans la synthèse de molécules antioxydantes [Feng *et al.*, 2021, Sarkar *et al.*, 2023].

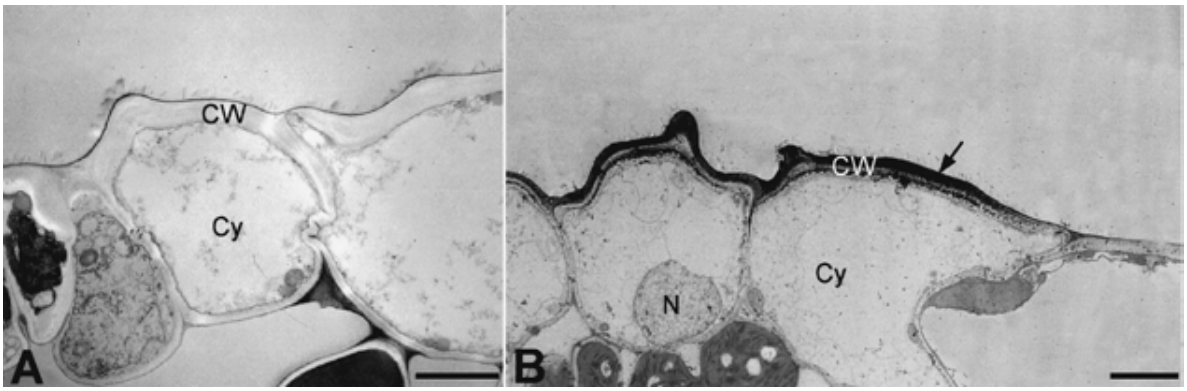


FIGURE 1.15 – Cellules foliaires de riz alimenté (B) ou non (A) en silicium (Si), observées au microscope électronique à transmission. La flèche (B) indique les dépôts pariétaux de Si. N : noyau ; Cy : cytoplasme ; CW : paroi pectocellulosique. Source : [Kim *et al.*, 2002]

Par ailleurs, la littérature rapporte que le Si permet d'atténuer une grande variété de stress abiotiques, notamment les carences nutritionnelles, en particulier chez les plantes accumulatrices de Si (36 publications entre 2010 et 2020, Figure 1.16). L'effet du Si chez les plantes non accumulatrices cultivées en conditions de stress nutritionnel est plus modestement étudié, avec seulement 9 études en 10 ans, dont 6 en réponse à des carences en micronutriments (3 pour le bore (B), 2 pour le zinc (Zn) et 1 pour le Fe) et seulement 3 en réponse à des carences en macronutriments (2 pour l'N et 1 pour le potassium (K)) (Figure 1.16).

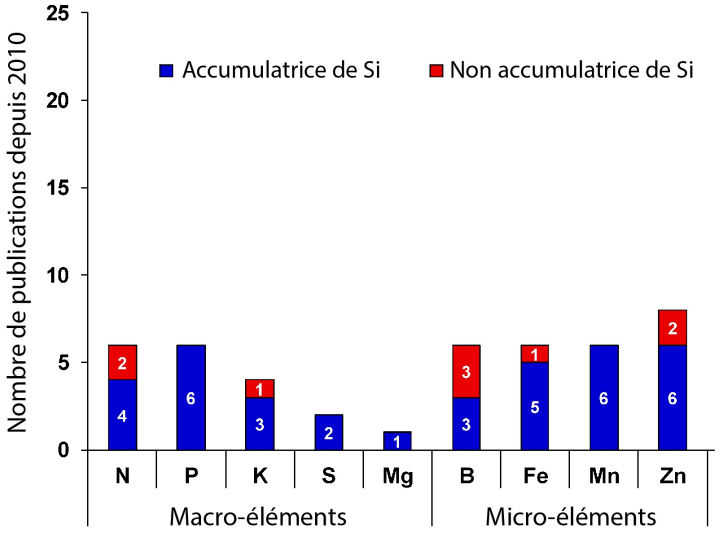


FIGURE 1.16 – Recensement des publications traitant des effets d'apport de Si lors de carence en macro et microéléments chez des plantes accumulatrices (bleu) ou non (rouge) depuis 2010. Adaptation de : [Ali *et al.*, 2020]

Parmi les travaux portant sur la carence en N, ceux menés par Haddad (2015-2018) ont permis de mieux comprendre les effets d'un apport de Si chez le colza. Ces études montrent qu'en condition limitante en N, une plante traitée (+Si) avec 12 $kg.ha^{-1}$ de Si (apporté sous forme d'acide silicique) présente des capacités de prélèvement de l'N du sol augmentées (+130 % comparativement aux plantes témoins -Si). Ce résultat peut notamment s'expliquer par l'augmentation de l'expression du gène *BnaNRT2.1* (codant un système de transport à forte affinité pour le NO_3^-) en réponse au Si constatée en conditions contrôlées [Haddad *et al.*, 2018].

Par ailleurs, il a également été montré qu'un ajout de Si permet de retarder la sénescence foliaire séquentielle et d'augmenter les capacités photosynthétiques des feuilles matures, notamment en augmentant leur durée de vie (Figure 1.17A ; [Haddad *et al.*, 2018]). Ces résultats pourraient s'expliquer par une meilleure détoxification des formes actives de l'oxygène comme l'indique la chute des teneurs foliaires en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2, Figure 1.17B) et malondialdéhyde (MDA , Figure 1.17C), deux marqueurs du stress oxydatif.

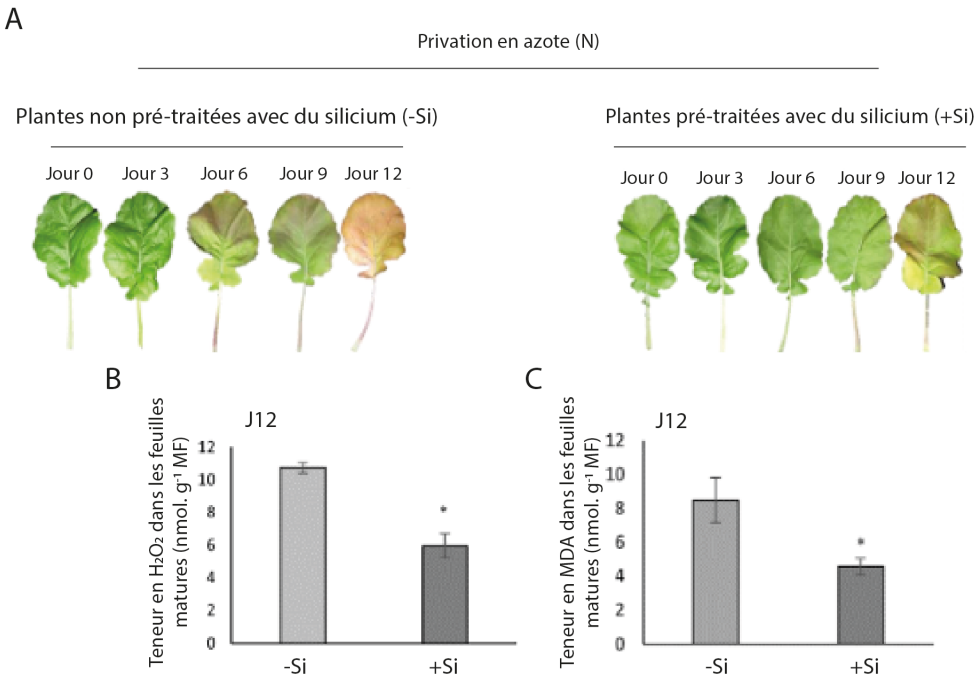


FIGURE1.17 – Évolution de la sénescence foliaire séquentielle (**A**) chez des plantes de colza carencées en N pendant 12 jours et prétraitées ou non avec du Si (1,7 mM sous forme de silicate de sodium) et des teneurs foliaires en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2, **B**) et en malondialdéhyde (MDA, **C**) au 12ème jour de carence en N. Source : [Haddad *et al.*, 2018]

Considérant les travaux de modélisation de Malagoli *et al.*, cette augmentation de la durée de vie des feuilles pourrait être favorable à une augmentation du rendement en graines du colza [Malagoli, 2005]. Ceci a été confirmé lors de l'expérimentation en condition de plein champ (apport de 12 kg.ha^{-1} de Si), où il a été constaté (i) un retard de la sénescence foliaire au stade montaison et (ii) une augmentation du rendement en graines de +16 % [Laîné *et al.*, 2019]. Ces travaux montrent qu'un apport de Si s'accompagne d'une atténuation du stress N du colza, et ce, en dépit de sa faible capacité à accumuler cet élément. Le colza étant également très exigeant en S, il peut être supposé qu'un apport de Si pourrait s'avérer bénéfique lorsque celui-ci se trouve en carence en S. Néanmoins, à ce jour, aucune étude visant à appréhender ses potentiels effets n'a été entreprise.

En outre, le Si permet d'augmenter la tolérance aux stress biotiques et abiotiques chez les Fabacées [El Moukhtari *et al.*, 2022b]. Par exemple, des études montrent qu'un apport de Si améliore la symbiose entre les cellules racinaires et les bactéries du genre *Rhizobium* et permet, *in fine*, d'augmenter les capacités de fixation du N_2 atmosphérique chez les Fabacées cultivées en conditions de stress hydrique ou salin [Putra *et al.*, 2020]. Ainsi, d'une manière générale, il est admis qu'un apport de Si à des Fabacées cultivées en conditions de stress abiotiques augmente significativement le nombre de nodules, leurs teneurs en nitrogénase, ainsi que leurs teneurs en léghemoglobine, améliorant directement leurs capacités de fixation du N

atmosphérique [Putra *et al.*, 2021].

Bien que ces résultats aient été constatés chez de nombreuses Fabacées, telles que le soja, le pois chiche, ou la luzerne, les effets d'un apport en Si sur le trèfle incarnat, et en particulier chez des plantes carencées en S ou ne disposant que de N_2 atmosphérique comme unique source d'N, n'ont jusqu'à présent jamais été étudiés.

1.4 Objectifs et stratégies de recherche

Les travaux développés dans ce manuscrit de thèse visent à compléter les résultats obtenus lors de deux thèses précédemment réalisées et soutenues au sein de l'UMR INRAE-UNICAEN 950 EVA. La première thèse, réalisée par Génard (2012-2016), avait pour objectifs d'analyser et de comprendre le fonctionnement de l'association colza-Fabacée, et plus particulièrement d'évaluer l'impact de la présence de la Fabacée sur les performances agronomiques (biomasse, nutritions azotée et soufrée, rendement grainier et qualité des graines) du colza (plante d'intérêt) cultivé en condition de faibles intrants en N. La seconde thèse, conduite par Haddad (2015-2018), avait pour but d'étudier les effets d'un apport en Si sur la gestion de l'N chez le colza, et plus particulièrement sur les capacités d'absorption de l'N et les processus de remobilisation de l'N associés à la sénescence foliaire séquentielle du colza cultivé en condition de carence en N.

Les travaux réalisés dans le cadre de ces deux thèses laissent penser qu'un apport de Si à l'association colza-trèfle incarnat pourrait permettre une potentialisation du fonctionnement de l'association et une meilleure gestion de la ressource azotée. Dans ce contexte, l'objectif finalisé des travaux développés dans cette thèse vise à mieux appréhender **les effets d'un apport de Si sur les performances agronomiques du colza cultivé en association avec le trèfle incarnat (*Trifolium incarnatum* L.).** Au sein de cette association, la présence de deux plantes exigeantes en S (colza et trèfle) et d'une plante nitrophile (colza) laisse supposer que les deux plantes vont être rapidement confrontées à une carence en S et que le trèfle devra, quant à lui, faire face à de faibles disponibilités en N dans le sol. Par conséquent, l'effet d'un apport de Si sera évalué, d'une part, chez le colza et le trèfle cultivés en monoculture en situation de carence en S et, d'autre part, chez le trèfle cultivé en l'absence de N dans la solution nutritive. Enfin, la dernière partie de cette thèse visera à appréhender l'effet d'un apport de Si sur le fonctionnement du colza et du trèfle cultivés en association.

Chapitre 2

Résultats

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse sont présentés sous forme de quatre articles (à ce jour : deux publiés, un en attente de validation finale par l'éditeur et en révision) :

— **Section 2.1 - Article 1 :** Assessing the effect of silicon supply on root sulfur uptake in S-fed and S-deprived *Brassica napus* L. Plants, 2022, https ://doi.org/10.3390/plants11121606,

— **Section 2.2 - Article 2 :** Silicon supply improves nodulation and dinitrogen fixation and promotes growth in *Trifolium incarnatum* L. subjected to a long-term sulfur deprivation. Plants, 2023, https ://doi.org/10.3390/plants12122248,

— **Section 2.3 - Article 3 :** Ionomic and proteomic changes highlight the effect of silicon supply on the nodules functioning of *Trifolium incarnatum* L. Frontiers in Plant Science, 2024 (en attente de validation finale par l'éditeur),

— **Section 2.4 - Article 4 :** Silicon supply improves the N rhizodeposition and N transfer from *Trifolium incarnatum* L. to *Brassica napus* L. in intercrops (En révision dans Héliyon).

2.1 Évaluation de l'effet d'un apport en silicium sur les capacités d'absorption du soufre chez *Brassica napus* L. carencé ou non en soufre

plants

MDPI

Article

Assessing the Effect of Silicon Supply on Root Sulfur Uptake in S-Fed and S-Deprived *Brassica napus* L.

Philippe Laîné [1,†], Raphaël Coquerel [1,†], Mustapha Arkoun [2], Jacques Trouverie [1,†] and Philippe Etienne [1,*,†]

[1] Unicaen, INRAE, UMR 950 EVA, SF Normandie Végétal (FED4277), Normandie Université, 14000 Caen, France; philippe.laine@unicaen.fr (P.L.); raphael.coquerel@unicaen.fr (R.C.); jacques.trouverie@unicaen.fr (J.T.)

[2] Laboratoire de Nutrition Végétale, Agro Innovation International-TIMAC AGRO, 35400 Saint-Malo, France; mustapha.arkoun@roullier.com

* Correspondence: philippe.etienne@unicaen.fr

† These authors contributed equally to this work.

2.1.1 Préambule

Contexte : Depuis les années 80, la diminution des émissions soufrées d'origine anthropique dans l'atmosphère s'est accompagnée d'une oligotrophisation en soufre (S) des sols, ce qui a conduit à des carences en S chez la plupart des plantes de grandes cultures. Ainsi, chez *Brassica napus* L., très exigeante en S, ces carences en S impactent négativement le rendement et la qualité des produits récoltés. Pour pallier à ces carences, un apport en fertilisant soufré de l'ordre de 30 $kg.ha^{-1}$ est généralement préconisé afin de limiter les effets négatifs sur la croissance de cette plante. Alors que de nombreuses études rapportent qu'un apport de silicium (Si) permet de limiter les impacts négatifs liés à de nombreuses carences nutritionnelles, à ce jour, aucune étude n'a évalué si un apport en Si permettait d'atténuer les effets négatifs de la carence en S chez *Brassica napus* L. [Ali *et al.*, 2020, Pavlovic *et al.*, 2021]

Objectifs et démarche expérimentale : Cette étude a donc pour but d'évaluer les effets d'un apport en Si sur des plantes de *Brassica napus* L. soumises ou non à une carence en S, en se focalisant notamment sur leur croissance et l'expression de transporteurs racinaires (*BnaSultr1.1* et *BnaSutr1.2*) impliqués dans l'absorption du sulfate (SO_4^{2-}). Pour ce faire, des plantes ont été cultivées en hydroponie sous quatre modalités différentes : alimentées (+S) ou non en S (-S) et additionnées (+Si) ou non en Si (-Si). Les plantes ont été récoltées trois semaines après le début de l'application de ces traitements et 72 heures après une réalimentation en S des plantes privées de S (-S).

Faits marquants : Un apport de Si **n'a pas d'effet sur la diminution de croissance observée chez les plantes privées de S (-S+Si).** Toutefois, comparativement aux plantes -S-Si, l'apport de Si **a modéré la surexpression de *BnaSultr1.1*, sans pour autant affecter l'absorption racinaire de sulfate.** Après 72 heures de réapprovisionnement en S, l'apport de Si (-S+Si) permet **un maintien de la surexpression du gène *BnaSultr1.1***, qui est fortement réprimé chez les plantes n'ayant pas reçu de Si (-S-Si).

2.1.2 Introduction

Since the 1980s, the occurrence of sulfur deficiencies has been increasingly observed in field crops [Blake-Kalff *et al.*, 2001, Kost *et al.*, 2008]. This low availability of S in soils is due to the combination of several factors including a significant decrease in S atmospheric emissions from anthropic activities, a decrease in the use of organic fertilizers and use of sulfur-free fertilizers associated with intensive management practices [Grant *et al.*, 2012, McNeill *et al.*, 2005]. In this context, plants are increasingly exposed to S deficiencies that are particularly detrimental for plants with high sulfur requirements for growth and seed production. This is notable in *Brassica napus* L. whose seed yield and seed quality are negatively affected by S deficiency [D'Hooghe *et al.*, 2014, Mondal *et al.*, 2022]. Phenotypically, S deficiency usually leads to a decrease in growth, a yellowing of young leaves, and production of anthocyanin in mature leaves [De Bang *et al.*, 2021]. Moreover, some studies have reported that genes encoding $^{34}SO_4^{2-}$ transporters, especially those encoding *BnaSultr1.1* and *BnaSultr1.2* (both of which are high-affinity transporters mainly involved in root sulfate uptake) were strongly up-regulated in roots of oilseed rape subjected to S-deficiency [Sorin *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2015]. Studies performed in numerous plant species have reported that because S is a constituent of cysteine and methionine, S deficiency leads to a disruption of many aspects of plant metabolism including S and N metabolism [Sorin *et al.*, 2015, Aarabi *et al.*, 2020, Courbet *et al.*, 2021b]. In the same way, because S is also required for the synthesis of phytohormones [Mir *et al.*, 2022] and non-enzymatic antioxidant compounds such glutathione and S-adenosine methionine [Bin *et al.*, 2017, Dubreuil-Maurizi *et al.*, 2011, Watanabe *et al.*, 2021], S deficiency is usually associated with an alteration of growth and defense mechanisms in plants facing biotic or biotic stresses [Kopriva *et al.*, 2019].

Interestingly, the addition of Si, especially to crops under biotic and abiotic stress conditions, improves their resistance and the quality and yield of the crops harvested [Korndörfer *et al.*, 2001, Epstein, 2009, Souri *et al.*, 2021]. Although most work has been conducted on plants with high Si accumulation such as rice [Ma *et al.*, 2006], several studies have also shown that Si supply can be beneficial in plants with low Si accumulation, such as *Brassica napus*. In general, one of the common defense mechanisms triggered by Si to mitigate biotic and abiotic stresses is the detoxification of reactive oxygen species (ROS) [Ahanger *et al.*, 2020]. For example, in cucumber roots infected with *Pythium* spp., Cherif et al. [Chérif *et al.*, 1994] reported that Si supply induced peroxidase and polyphenoloxidase activities. In particular, in *Brassica napus* and *Brassica juncea* exposed to salinity or drought, Si was shown to upregulate a wide range of non-enzymatic (ascorbate and glutathione pools) and enzymatic antioxidants activities [Alamri *et al.*, 2020, Bukhari *et al.*, 2021, Hasanuzzaman *et al.*, 2018a, Hasanuzzaman *et al.*, 2018b]. In addition to alleviating drought and salinity stresses, many studies report that Si supply is also beneficial

in helping plants overcome main macronutrient (N, P, K) deficiencies. Two main mechanisms for Si-mediated deficiency mitigation have been highlighted : increased nutrient uptake in roots, and improved nutrient utilization in plant tissues (for review : [Pavlovic *et al.*, 2021]). For example, in rice cultivated under N starvation, Si has been reported to enhance the rate of N assimilation [Wu *et al.*, 2017] and to improve the performance of ammonium transporters (*OsAMT*), but it does not induce *OsAMT* gene expression [Sheng *et al.*, 2018]. In N-deprived *Brassica napus* L. plants, Si supply induced the expression of genes encoding root nitrate transporters (*BnaNTR1.1* and *BnaNTR2.1*) and led to an improved nitrogen uptake and growth recovery when the plants were resupplied with N for 12 days [Haddad *et al.*, 2018]. Unlike other macronutrients, only a few studies have dealt with Si and S interactions [Pavlovic *et al.*, 2021, Ali *et al.*, 2020] and the early results seem to depend on the plant species. Indeed, Buchelt, et al. [Buchelt *et al.*, 2020] reported no effect of Si on S uptake accumulation in forage crops, while other authors have indicated that Si supply results in a decreased expression of genes encoding sulfur transporters (*OsSultr1.1* and *OsSultr2.1*) [Réthoré *et al.*, 2020] and a consistently decreased S accumulation in shoots [Réthoré *et al.*, 2020, Maillard *et al.*, 2018] in rice or barley subjected to S deficiency. For *Brassica napus* L., which unlike the above-mentioned species does not accumulate Si and has a high demand for sulfur, there are no studies to date on S-Si interactions [Ali *et al.*, 2020].

In this context, the aims of this study were to assess whether a Si supply (i) alleviated stress associated with S deficiency in *Brassica napus* L. and/or (ii) modulated the root sulfate transporters activity and S accumulation in plants. For this, the effect of Si supply on growth, expression of root sulfate transporter genes (*Bnasultr1.1* and *Bnasultr1.2*) were monitored. To evaluate the activity of sulfate transporters in plants fed with (+S) or without (-S) sulfate during 21 days (D21), sulfate influx was measured at D21 using short-term labelling with $^{34}SO_4^{2-}$. Finally, the effect of Si supply on modulating the expression of S transporters observed in this study and its consequences on S uptake during a 72h S re-feeding are discussed.

2.1.3 Materials and methods

Plant Growth Conditions and Experimental Design

The experimental design is summarized in Figure 2.1. In a greenhouse, seeds of *Brassica napus* L. var. Citizzen were germinated on perlite over deionized water for four days in the dark. Then seedlings were transferred to natural light conditions and supplied with nutrient solution for two weeks containing : KNO_3 (1mM), KH_2PO_4 (0.25mM), KCl (1mM), $CaCl_2$ (3mM), $MgSO_4$ (0.5mM), EDTA-2NaFe (0.2mM), H_3BO_3 (14μM), $MnSO_4$ (5μM), $ZnSO_4$ (3μM), $CuSO_4$ (0.7μM), $(NH_4)_6(Mo)_7O_{24}$ (0.7μM), $CoCl_2$ (0.1μM). This nutrient solution classically used for *Brassica napus* cultivated in

hydropnic conditions is derived from Hoagland nutrient solution and results in mineral levels in plant tissues comparable to those observed in field-grown plants [Maillard *et al.*, 2016b, Courbet *et al.*, 2021a, Etienne *et al.*, 2018]. Just after first leaf emergence (*i.e.*, after 2 weeks), seedlings were transplanted for one week into a plastic tank (20L) containing the nutrient solution described above. Natural light was supplied by high pressure sodium lamps (Philips, MASTER GreenPower T400W) with photosynthetically active radiation of 450μmol photons $m^{-2}s^{-1}$ at canopy height.At the emergence of the fourth leaf (D0), plants were separated into four batches : the first two batches corresponded to plants maintained on S (+S; 500μM) and supplied (+S+Si) or not (+S-Si) with 1.7 mM silicon for 21 days (D21), the maximal concentration for which Si remained soluble [Ma *et al.*, 2001]. The nutrient solution described above with the addition of sodium metasilicate (Na_2SiO_3) to reach a final concentration of 1.7mM Si was provided to +S+Si plants. The other two batches corresponded to plants deficient in S (-S; 0μM) and supplied (+Si) or not (-Si) with silicon (1.7mM). For these plants, nutrient solution was modified as follows to suppress S : KNO_3 (1mM), KH_2PO_4 (0.25mM), KCl (1mM), $CaCl_2$ (3mM), $MgCl_2$ (0.5mM), EDTA-2NaFe (0.2mM), H_3BO_3 (14μM), $MnCl_2$ (5μM), $ZnCl_2$ (3μM), $CuCl_2$ (0.7μM), $(NH_4)_6(Mo)_7O_{24}$ (0.7μM), $CoCl_2$ (0.1μM). Whatever the S treatment, Si-deprived plants were supplied with NaCl (final concentration : 3.4mM) to compensate the sodium supplied by Si treatment. From D21, irrespective of the treatment, the plants were grown for 72 h (D21+72 h) with S (+ S_{72h}; 500μM) using the initial nutrient solution. During plant cultivation, nutrient solutions were renewed every three days and their pH was adjusted to 5.8±0.2. As described in several studies [Diago *et al.*, 2016, Pinelli *et al.*, 2018, Maignan *et al.*, 2020], the chlorophyll and anthocyanin contents were assessed in aerial parts at day 21 (D21) with an optical sensor system (Multiplex© fluorometer, Force A, Orsay, France). Plants were harvested at D0, D21 and D21+72 h (Figure 2.1). At each harvest, shoots and roots were separated and then frozen in liquid N and stored at -80°C for further analysis. An aliquot of each tissue was dried in an oven (60°C) for dry weight (DW) determination and elemental analysis.

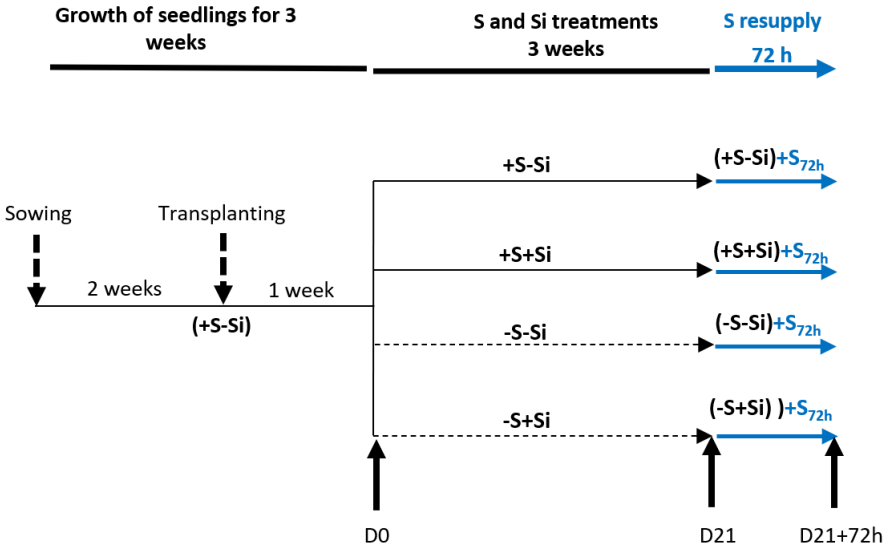


FIGURE2.1 – Experimental design used to study the effect of silicon supply on *Brassica napus* L. grown with or without sulfur for 21 days followed by S supplementation for 72 h. After three weeks of cultivation with sulfur (+S; 500μM) (D0), plants were separated into four batches : the first two batches (filled black arrow) corresponded to plants that continued to be fed with S (+S; 500μM) and supplied (+Si; 1.7mM) or not (-Si) with silicon for 21 days (D21). The other two batches (dotted black arrow) corresponded to plants deficient in S (-S) and supplied (+Si; 1.7mM) or not (-Si) with silicon. From D21, irrespective of the treatment, all plants were resupplied for 72 h (D21+72 h) with S (+ S_{72h}; 500μM) (filled blue arrow).

Measurement of Sulfate Influx

The root sulfate influx was performed at D21 by using a short-term sulfate uptake labeling experiment ($^{34}SO_4^{2-}$). Briefly, roots were washed twice for 1 min in a solution of $Ca(NO_3)_2$ (1 mM) before immersion for 5 min in a solution of 200μM $Na_2\,^{34}SO_4^{2-}$ (90% of atom excess) to study root sulfate influx in plants grown with or without S and Si. Roots were then rinsed twice in a solution of $Ca(NO_3)_2$ (1mM) at 4°C for 1 min to stop the SO_4^{2-} uptake. Roots and shoots were separated and weighed before drying in an oven (60°C) for dry weight (DW) determination. Total S and ^{34}S contents in roots and shoots were determined with 6 mg of fine powder placed in tin capsules before analysis in an isotope-ratio mass spectrometer (Delta V Advantage, ThermoFisher, Bremen, Germany) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). The value of the isotope abundance (A%) given by the IRMS in sample or natural standard is calculated as :

$$A\% = 100 \times {}^{34}\mathrm{S}/({}^{34}\mathrm{S} + {}^{32}\mathrm{S})$$

Then, the content of ^{34}S ($Q^{34}S$) in each sample was calculated as following :

$$A\% = Q^{34}\mathrm{S} = (\mathrm{A}\%_{\mathrm{sample}} - \mathrm{A}\%_{\mathrm{natural.standard}}) \times QS/100$$

where QS represents the total sulfur contents and $A\%_{naturalstandard}$ represents the natural abundance of ^{34}S, *i.e.*, 4.2549%.

Finally, sulfate influx was expressed as the total ^{34}S content in whole plant ($Q^{34}S$) per gram of dry roots and per hour.

Determination of Total S and Si Contents

In roots and shoots from unlabeled plants, Si and S contents were quantified with approximately 1g of dry weight powder analyzed with an X-ray-fluorescence spectrometer (XEPOS, Ametek, Berwyn, PA, United States) using calibration curves obtained from international standards with known contents.

Extraction and Quantification of RNAs, Reverse Transcription (RT) and Q-PCR Analysis

At D21 and D21+72 h, total RNAs were extracted from frozen root tissue previously ground in a mortar containing liquid nitrogen. 200 mg of powder was suspended in 750μL extraction buffer (100mM LiCl, 100mM TRIS, 10mM EDTA, 1% SDS (w/v), pH 8) and 750μL of hot phenol (80°C, pH 4). After vortexing for 40 s, 750μL of chloroform :isoamylalcohol (24/1, v/v) was added. After centrifugation of the mixture (15,000 g, 5 min, 4°C) the supernatant was collected and 750μL of 4M LiCl solution (w/v) was added before overnight incubation at 4°C. After centrifugation at 15,000 g for 20 min at 4°C, the pellet containing total RNAs was resuspended with 100μL of sterile water before purification with an RNeasy Mini Kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Courtaboeuf, France). Total RNA was quantified by spectrophotometry at 260nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before reverse transcription (RT) step.

For RT, 1μg of total RNAs was converted to cDNA with an iScript cDNA synthesis kit according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). Relative expression of genes encoding sulfate transporters (*BnaSultr1.1*; accession number : AJ416460 and *BnaSultr1.2*; accession number : AJ311388) was monitored in roots using quantitative polymerase chain reaction (q-PCR). Q-PCR amplifications were performed using specific primers for each housekeeping gene (EF1-α (accession number : DQ312264); forward : 5'-gcctggtatggttgtgacct-3', reverse : 5'-gaagttagcagcacccttgg-3' and 18S rRNA (accession number : X16077); forward : 5'-cggataaccgtagtaattctag-3', 5'-reverse : gtactcattccaattaccagac-3') and target genes (*BnaSultr1.1* : forward : 5'-agatattgcgatcggaccag-3', reverse : 5'-gaaaacgccagcaaagaaag-3' and *BnaSultr1.2* : 5'-ggtgtagtcgctggaatggt-3', 5'-aacggagtgaggaagagcaa-3').

q-PCRs were performed with 4μL of 100x diluted cDNA, 500nM of primers, and 1x SYBR Green PCR Master Mix (BioRad, MarnelaCoquette, France) in a thermocycler (CFX96 Real Time System, BioRad, MarnelaCoquette, France). A program composed of an activation step at 95°C for 3 min and 40 cycles of a denaturing step at 95°C for 15 s followed by an annealing and extending step at 60°C for 40 s, was used. For each pair of primers, PCR efficiency was around 100% and the specificity of PCR amplification was monitored though the presence of a single peak in the melting curves after the q-PCR. In addition, the q-PCR product was sequenced to confirm that the correct amplicon was produced from each pair of primers (Eurofins, Ebersberg, Germany). For each sample, the subsequent q-PCRs were performed in four biological replicates (n=4). At each harvest time (D21 and D21+72 h), the relative expression of the genes in each sample was compared with the referent sample (corresponding to the +S-Si treatment) using the delta Ct ($\Delta\Delta$Ct) method and the following equation :

Relative expression = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, with $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{sample} - \Delta Ct_{referent}$ and with ΔCt =

$Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{housekeeping gene}}$, where Ct refers to the threshold cycle determined for each gene (housekeeping or target) in the exponential phase of PCR amplification. Using this analysis method, the relative expression of the target gene in the referent sample (+S-Si) was equal to 1 [Livak et Schmittgen, 2001].

Statistical Analysis

The experiment was performed with four independent replicates. Thus, all data are indicated as the mean±SE (n = 4). Statistical analyses were performed using R software (version 4.2.0 : R Core Team, 2022) and Rcmdr (version 2.7-2). After normality analysis (Shapiro-Wilk test), data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and mean values were compared using Tukey's HSD post-hoc test. For gene expression and S contents (Figure 2.6 and Figure 2.7), significant differences between data at D21 and D21+72 h were determined using Student's t-test ($p < 0.05$).

2.1.4 Results

Effect of S Deficiency Associated or Not Associated with Si Supply on *Brassica napus* Growth

For each treatment, a representative image of the plants cultivated under hydroponic conditions is shown in Figure 2.2A. Visually, regardless of the Si treatment (+Si or -Si), it can be observed that plants deprived of S (-S) for 21 days were smaller than plants well supplied with S (+S). In agreement with the images in Figure 2.2A, the total dry weight of -S plants was significantly reduced compared to +S plants. Indeed, between D0 and D21, the total dry weight of plants evolved from 0.96±0.01 $g.plant^{-1}$ to 11.51±1.22, 12.46±1.18, 8.19±0.71 and 8.79±1.17 $g.plant^{-1}$ for +S-Si, +S+Si, -S-Si and -S+Si, respectively (Figure 2.2B). This difference was due to a tendency for the shoot biomass to decrease and especially to a significant decrease in the dry weight of the roots of -S plants compared to the +S plants. Irrespective of the treatment, the shoot/root ratio at D21 did not change significantly (4.11±0.49, 4.71±0.46, 4.80±0.33 and 4.83±0.57 for +S-Si, +S+Si, -S-Si and -S+Si, respectively). In addition, Figure 2.2B shows that whatever the S supply (+S or -S), Si treatment had no significant effect on shoot and root dry weight.

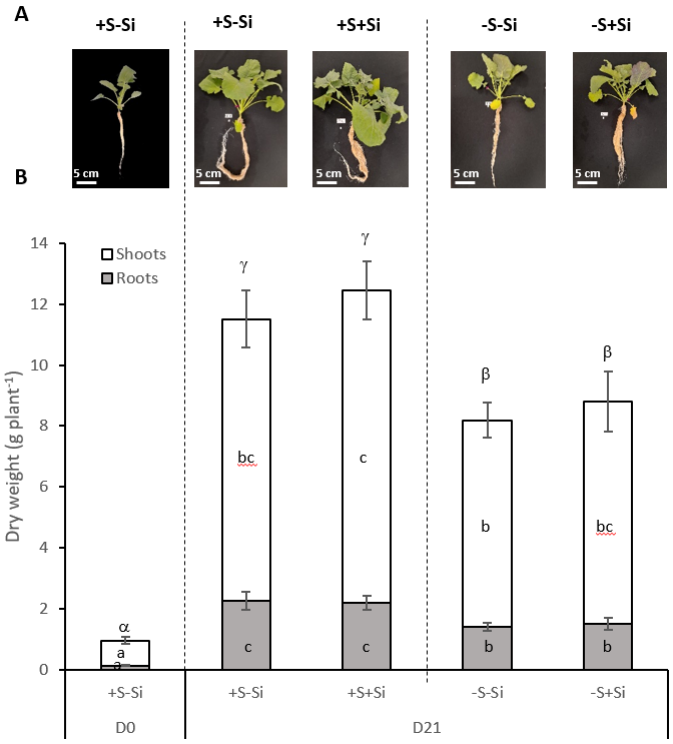


FIGURE2.2 – Representative pictures (A) and dry weights (B) of roots and shoots of *Brassica napus* L. plants cultivated in hydroponic conditions for 21 days (from D0 to D21) with (+S; 500μM) or without sulfur (-S; 0μM) and with (+Si; 1.7mM) or without silicon (-Si) supply. Italic values indicate the whole plant biomass. Data are means±SE (n = 4). Different Latin letters indicate that the mean dry weight of whole plant or of each plant compartment (roots or shoots) are significantly different ($p < 0.05$).

Leaf Chlorophyll and Anthocyanin Indices

In agreement with several previous studies [Diago *et al.*, 2016, Pinelli *et al.*, 2018], an optical sensor (Multiplex©) was used to evaluate the chlorophyll and anthocyanin indices of *Brassica napus* leaves subjected to the different treatments (+S-Si; +S+Si, -S-Si, and -S+Si) for 21 days (Figure 2.3A,B). Regardless of the treatment, the chlorophyll (SFR_R and SFR_G) index remained constant (around 5) (Figure 2.3A). Figure 2.3B shows that when plants were fed with S (+S), silicon supply (+Si) there was no significant effect on the anthocyanin index of aerial parts. In contrast, in S-deprived plants (-S), silicon supply (+Si) significantly increased the anthocyanin index of aerial parts (from 0.005±0.004 to 0.021±0.003 in -S-Si and -S+Si plants, respectively). Moreover, our results indicated that a typical increase in the anthocyanin index in response to S deprivation was significant only when plants were fed with Si (+Si). This result correlates with the purplish coloration of leaves that can be observed in the -S+Si plants in Figure 2.2A.

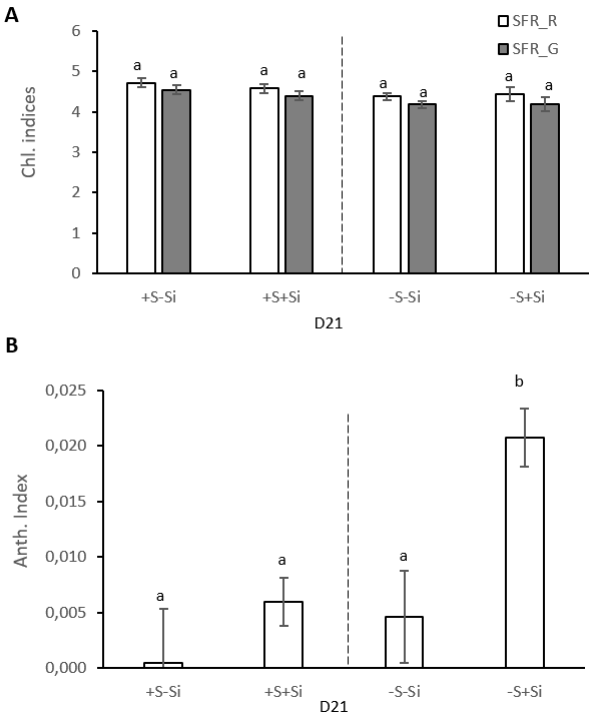


FIGURE2.3 – Chlorophyll (Chl., **A**) and anthocyanin (Anth., **B**) indices measured with an optical sensor (Multiplex©) in shoots of *Brassica napus* L. cultivated in hydroponic conditions for 21 days (D21) with (+S; 500μM) or without sulfur (-S; 0μM) concentrations and with (+Si; 1.7mM) or without silicon (-Si) supply. Data are means±SE (n=4). Different lowercase letters indicate significant difference in the indices ($p < 0.05$).

Contents of Sulfur and Silicon in Plants

As expected, whatever the Si treatment (+Si or -Si), the S content in S-deprived whole plants at D21 was significantly lower (around 10-fold) than in S-fed plants (+S) and comparable to that in plants at D0 (Figure 2.4A). However, the distribution of the S between roots (25%) and shoots (75%) did not change, irrespective of the treatment. As is usually reported for Si content, despite the use of nutrient solution without Si, -Si plants showed an increase in the content of Si between D0 and D21 (Figure 2.4B). Nevertheless, addition of sodium metasilicate (Na_2SiO_3) in the nutrient solution for 21 days led to a significant increase in the Si content in whole plants compared to plants cultivated without Si (-Si), regardless of the S supply (+S or -S). Furthermore, among the +Si plants, the content of Si in the S-fed plants (+S) was significantly higher than in S-deprived plants -S). Interestingly, this increase in the content of Si was mainly due to Si accumulation in roots, for example, from 2.5±0.2 to 11.6±1.5 mg · plant^{-1} between +S-Si and +S+Si plants (around 4.5-fold), whereas the Si content was less increased (around 1.5-fold) in leaves of the same plants (Figure 2.4B).

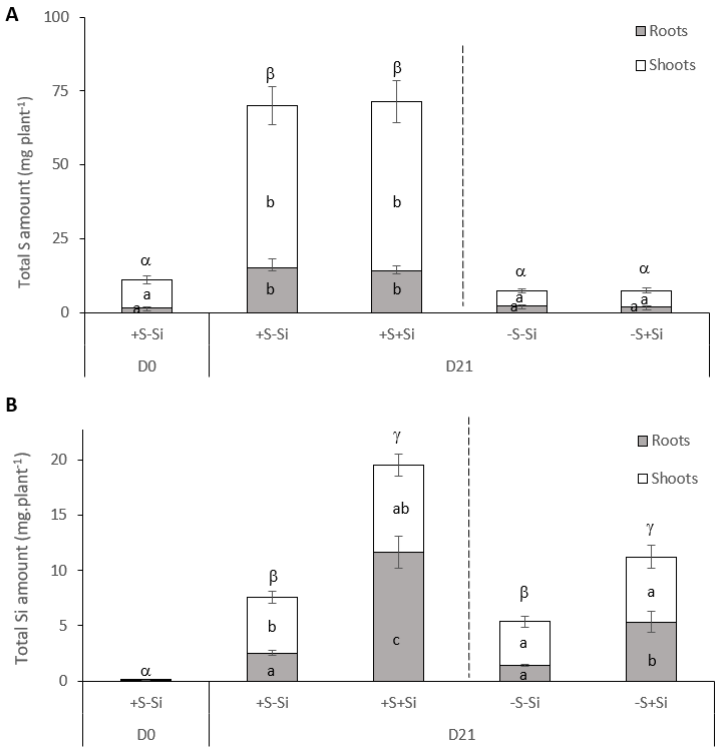


FIGURE2.4 – Roots, shoots and total contents of S (**A**) and Si (**B**) in *Brassica napus* L. cultivated in hydroponic conditions for 21 days (21D) with (+S; 500μM) or without sulfur (-S; 0μM) concentrations and with (+Si; 1.7mM) or without silicon (-Si) supply. Italic values indicate the content S or Si in whole plant ($mg \cdot plant^{-1}$). Data are means±SE (n = 4). Different Latin letters indicate that the S or Si content in whole plant or in each plant compartment (roots or shoots) are significantly different ($p < 0.05$).

Relative Gene Expression of *BnaSultr1.1* and *BnaSutr1.2* in Roots

In S-fed plants (+S), the relative expression of genes encoding the two sulfate transporters, *BnaSutr1.1* and *BnaSultr1.2*, was not modified in response to Si supply. Compared to +S plants, S deprivation led to a strong induction of the genes encoding both transporters (Figure 2.5A,B). For example, the expression of *BnaSultr1.2* in S-deprived plants was increased 30-fold on average, regardless of the Si supply (-Si or +Si) (Figure 2.5B). Interestingly, even though the expression of *BnaSultr1.1* was also very strongly induced in response to S deprivation, it is notable that this induction was around two fold lower (75 vs. 160) in -S+Si plants than in -S-Si plants.

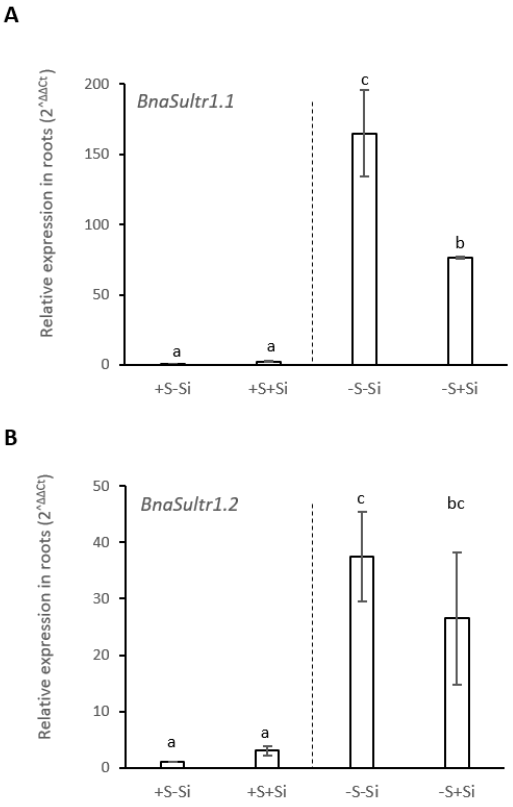


FIGURE2.5 – Relative expression of genes encoding the sulfate transporters *BnaSultr1.1* (**A**) and *BnaSultr1.2* (**B**) in roots of *Brassica napus* L. cultivated in hydroponic conditions for 21 days with (+S; 500μM) or without sulfur (-S; 0μM) concentrations and with (+Si; 1.7mM) or without silicon (-Si) supply. Data are means$\pm$SE (n = 4). Different lowercase letters indicate that means are significantly different ($p < 0.05$).

Root Sulfate Transporters Activity

The activity of sulfate transporters in plants fed with (+S) or without (-S) sulfate during 21 days (D21) was determined by measuring sulfate influx at D21 using short-term labelling with $^{34}SO_4^{2-}$ (Figure 2.6A). In S-fed plants (+S), the root sulfate transporter activity reached around 6.5μmol SO_4^{2-} g^{-1} of root DW h^{-1}, irrespective of the Si treatment (-Si or +Si). In S-deprived plants, the activity of root sulfate transporters is stronger than in S-fed plants and achieves 15μmol SO_4^{2-} g^{-1} of root DW in both -S-Si and -S+Si plants (Figure 2.6A). Interestingly, despite a negative effect of Si supply on expression of genes encoding root transporters (especially *BnaSultr1.1*) in S-deprived plants, the root sulfate transporters activity of the -S-Si and -S+Si plants were similar. To explore this further, the total S taken up by plants was determined after 3 days of S resupply (+ S_{72h}). The results indicated that the S amount taken up during the 72 h of S resupply by previously S-fed plants (+S) was similar, regardless of the Si treatment (around 5mg S. $plant^{-1}$ in both (+S-Si) + S_{72h} and (+S+Si) + S_{72h} plants) (Figure 2.6B). In plants previously subjected to S deprivation (-S), the S amount taken up was increased

much more strongly than in +S plants, and reached around 25mg S. plant^{-1} in both +Si ((-S+Si) + S_{72h}) and -Si ((-S-Si) + S_{72h}) plants. Consistent with the results discussed above, compared to 21 day, this strong sulfate uptake led to an increase in S contents in both plant compartments in (-S-Si) + S_{72h} and (-S+Si) + S_{72h} plants (2- and 3-fold in roots and shoots, respectively), while the S contents in roots and shoots of +S plants remained similar (Figure 2.6C).

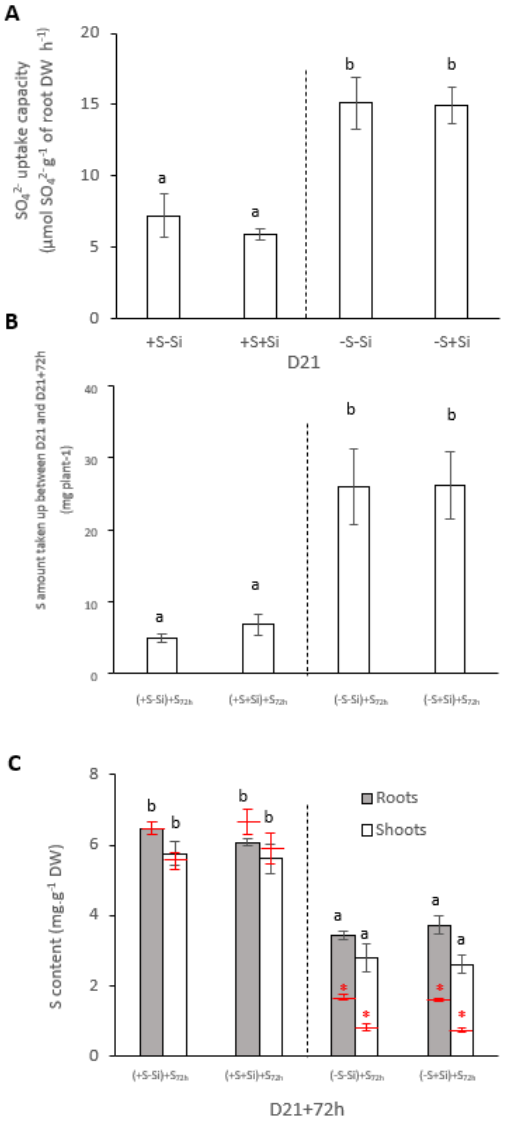


FIGURE2.6 – Activity of root sulfate transporters of *Brassica napus* L. at D21 (**A**), the S amount taken up between D21 and D21+72 h (**B**), and the S content in the root and shoot compartments of plants at D21+72 h (**C**). Plants were previously cultivated in hydroponic conditions for 21 days with (+S; 500μM) or without sulfur (-S; 0μM) concentrations and with (+Si; 1.7mM) or without Si (-Si) supply and then were resupplied with S for 72 h (+ S_{72h}; 500μM). Data are means±SE (n = 4). Different lowercase letters indicate that the means are significantly different ($p < 0.05$). (**C**) for each treatment, red marks indicate the mean±SE (n = 4) of S content in the plant compartments at 21 days. For each treatment, the red asterisk indicates significant differences ($p < 0.05$) between the S amounts at D21 and at D21+72 h.

Relative Expression of Genes Encoding Root Sulfate Transporters in Plants Resupplied with S

Compared to D21, the relative expression of the genes encoding the *BnaSultr1.1* and *BnaSultr1.2* sulfate transporters in +S plants remained similar at D21 + 72 h (+S-Si) + S_{72h} and (+S+Si) + S_{72h} (Figure 2.7). Compared to D21, in previously S-deprived plants without Si ((+S-Si) + S_{72h}), the S resupply for three days (D21 + 72 h) resulted in a significant down-regulation of expression of both genes (around 3-fold) (Figure 2.7). In previously S-deprived plants fed with Si ((+S+Si) + S_{72h}), the S resupply also led to a down regulation of *BnaSultr1.2* (Figure 2.7B) while expression of *BnaSutr1.1* remained high and at the same level as at D21 (Figure 2.7A).

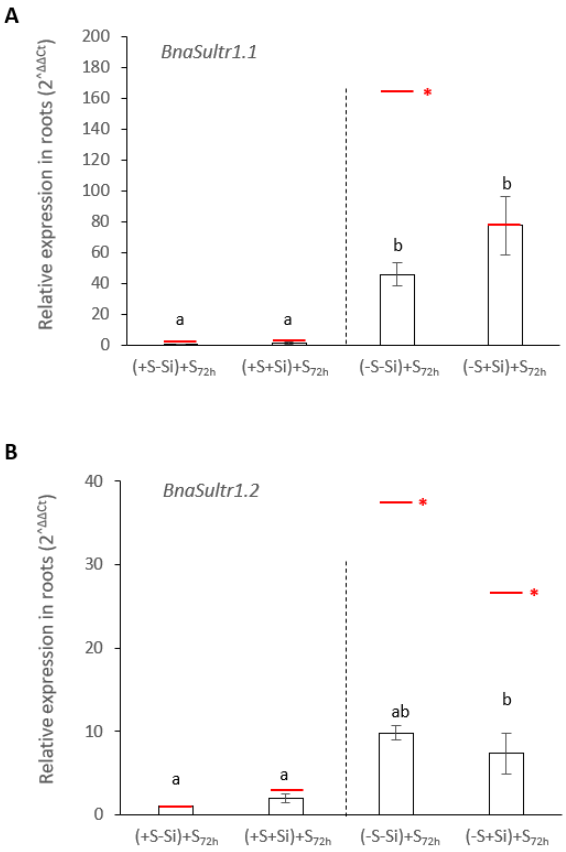


FIGURE2.7 – Relative expression of genes encoding the sulfate transporters *BnaSultr1.1* (**A**) and *BnaSultr1.2* (**B**) in roots of *Brassica napus* L. at D21+72 h : plants were previously cultivated in hydroponic conditions for 21 days with (+S; 500μM) or without sulfur (-S; 0μM) concentrations and with (+Si; 1.7mM) or without Si supply (-Si) and then were resupplied with S for 72 h (+ S_{72h}; 500μM). Data are means±SE (n = 4). Different lowercase letters indicate that means are significantly different ($p < 0.05$). For each treatment, red marks represent the relative expression of each gene observed in roots at 21 days (Figure 2.6). For each treatment and each gene, asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$) between the relative expression at D21 and at D21+72 h.

2.1.5 Discussion

The aim of this study was to evaluate the effect of Si supply on growth and sulfate root transporters activity in *Brassica napus* fed with or without sulfate. After 21 days, plant biomasses were significantly lower in the S-deprived plants than in the S-fed plants (Figure 2.2), as reported in previous studies performed on *Brassica napus* grown under similar hydroponic conditions and the same duration of S deficiency [Maillard *et al.*, 2016b]. In the current study, despite the addition of Si being accompanied by an increase in the content of Si in the plant (Figure 2.4B), there was no impact on plant growth (Figure 2.2) regardless of the sulfur treatment (-S or +S). These results are in agreement with previous studies that generally reported minor or no beneficial effects of Si on biomass production in unstressed plants [Epstein, 2009, Van Bockhaven *et al.*, 2013], nor on plants subjected to severe deficiencies in essential macronutrients such as N, P and K [Good *et al.*, 2004, Laîné *et al.*, 2019]. A previous study showed that one of the beneficial effects of Si supply was to delay chlorophyll degradation in *Brassica napus* under N deficiency [Haddad *et al.*, 2018]. Therefore, chlorophyll content was monitored to assess whether Si supply had a similar effect on plants grown in S deficiency. As shown in Figure 2.3A, such an effect was not observed on the chlorophyll indices in either +S plants, which was expected, or in -S plants. The lack of effect of Si on S-deprived plants can also be explained because a delay in chlorophyll degradation by Si is usually reported when senescence is induced by nutritional stress [Haddad *et al.*, 2018, Markovich *et al.*, 2017] and because S deprivation is instead known to not induce or even sometimes to delay senescence [Abdallah *et al.*, 2011]. In contrast to chlorophyll, the leaf anthocyanin content was strongly increased when S-deprived plants were fed with Si compared to -S-Si plants (Figure 2.2A and Figure 2.3B). This result agrees with earlier studies reporting that Si treatment leads to an increase in anthocyanin content in several plant species [Karagiannis *et al.*, 2021, Thind *et al.*, 2021, Yao *et al.*, 2011]. This accumulation of anthocyanins under Si treatment could be an advantage in coping with biotic and abiotic stresses due to the anthocyanins non-enzymatic antioxidant properties, which is particularly important under -S conditions. Indeed, whatever the Si supply, the low content of S in -S plants (Figure 2.4A) suggested, as classically reported, that S compounds and specifically those with antioxidant properties (such as glutathione) might be lacking. This is especially true when plants are supplied with Si because it was demonstrated that Si further lowered the low glutathione content in S-deprived plants [Maillard *et al.*, 2018].

As already reported in many studies [Sorin *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2015, Courbet *et al.*, 2021b], sulfur deficiency led to a strong induction of the expression of genes encoding two transporters (*BnaSultr1.1* and *BnaSutr1.2* ; Figure 2.5A,B) that are mainly involved in sulfate uptake by roots [Gigolashvili et Kopriva, 2014]. Nevertheless, it can be highlighted that in -S plants, supplying Si was associated with a lower induction of *BnaSutr1.1* gene expression than in -S-Si plants (Figure 2.5A). This result

is consistent with other work performed in rice where expression of the Sultr1.1 gene was lower when S-deprived plants were cultivated in the presence of Si compared to S-deprived plants grown without Si supply [Réthoré *et al.*, 2020]. However, this result contrasts with what is observed in plants deprived of N or P, where silicon supply induces the root expression of transporters involved in the uptake of these nutrients [Haddad *et al.*, 2018, Kostic *et al.*, 2017]. Because sulfur is involved in the maintenance of redox status, it is possible that the lower induction of *BnaSultr1.1* in the presence of Si could be due to a lower need for sulfur as Si is known to have a beneficial effect on the redox status of plants [Haddad *et al.*, 2018, Mostofa *et al.*, 2021]. This beneficial effect could be a consequence of an increase in sulfur-free antioxidant metabolites such as the anthocyanin accumulation described previously in -S+Si plants (Figure 2.3B) but also of the induction of many ROS detoxifying enzymes by Si, as reported in many studies (for review : [Kim *et al.*, 2017]). This assumption is reinforced by the lower hydrogen peroxide (H_2O_2) and malondialdehyde (MDA) contents in shoots of -S+Si plants than in -S-Si plants observed in our study (Supplementary Data 2.8). Due to the S-transporter gene expression induction being observed in the complete absence of S supply, the contents of sulfur observed at D21 were not significantly different from D0 (from 7 to 10 mg.plant^{-1} ; Figure 2.4A) and do not allow to evaluate the effect of Si on the actual sulfur uptake during this period. To overcome this, the instantaneous root sulfate transporters activity of plants was measured at D21 using ^{34}S-labelled sulfate (Figure 2.6A). Despite a strong induction in S-deprived plants and contrasting levels of induction according to the Si level (160- and 75-fold for *BnaSultr1.1* and 35- and 26-fold for *BnaSultr1.2* in -S-Si and -S+Si plants, respectively), the variable expression of the genes encoding sulfate transporters results in a sulfate transport activity that was only double the levels in the +S plants. This apparent mismatch between the high level of expression of genes encoding S transporters and the capacity to take up S suggests a limitation in the ability of S-deprived plants to synthesize (post-transcriptional regulation) or operate sulfate transporters (metabolic perturbation). For example, this limitation of transporter synthesis could be a consequence of the numerous metabolic disturbances and more particularly, the decrease in the biosynthesis of sulfur amino acids and proteins usually observed in S-deprived plants [Courbet *et al.*, 2021b, Li *et al.*, 2020]. A previous study showed that S resupply was accompanied by a strong increase in de novo synthesis of amino acids and proteins [Zhang *et al.*, 2015]. If transporter synthesis is indeed prevented by S availability, then it cannot be excluded that the higher expression of *BnaSultr1.1* in -S-Si plants (compared to -S+Si plants) under S resupply may result in higher transporter synthesis that might be associated with higher sulfate uptake (and vice versa) upon S resupply. To check this hypothesis, the amount of sulfur taken up as well as the S contents were evaluated in plants previously deprived of sulfur and re-fed with sulfur for 72 h (Figure 2.6B,C). After 72 h of S re-supply, the increase in tissue contents of S-replenished plants indicated that in addition to using the absorbed S for growth (+3 g in 3 days, data not shown), such plants were again able to store S in their tissues and use it locally to sustain S metabolism. Moreover, even though the cumulative quantity of S absorbed in 72 h

was significantly higher in -S plants than in +S plants, it is interesting to note that the amount of sulfur absorbed during this period was independent of the Si treatment. This result parallels work performed on forage crops, which demonstrated that Si supply did not affect uptake and accumulation of S [Buchelt *et al.*, 2020]. Furthermore, after 72 h of S resupply in Si-treated plants we observed a repression of the gene expression of both of the sulfate transporters (from 160- to 46-fold for *Bnasultr1.1* and from 37- to 10-fold for *BnaSultr1.2* between D21 and D21 + 72 h; Figure 2.7) as typically observed in such situations [Zhang *et al.*, 2015, Bielecka *et al.*, 2015]. More surprisingly, our study highlights no repression of the *BnaSultr1.1* gene after 72 h of S resupply in Si-treated plants (Figure 2.7A). Under S starvation, it has been shown that the genes encoding the sulfate transporters Sultr1.1 and Sultr1.2 are induced by a low sulfur assimilation capacity, which leads in particular to a non-use of OAS and to its accumulation [10,52] [Aarabi *et al.*, 2020, Koprivova et Kopriva, 2014]. In contrast, when sulfur is resupplied, the decrease in OAS content following the resumption of sulfur metabolism leads to a repression of these root transporters [Kopriva *et al.*, 2019]. During the S resupply performed in our study, the absence of repression of *BnaSultr1.1* gene expression in S-deprived and Si-treated plants alone suggested that silicon might interact directly or not with the regulatory pathway described above. In any case, the different expression patterns of *BnaSultr1.1* that manifested in the presence or absence of Si supply (*i.e.*, a strong expression at D21 followed by a strong repression at D21 + 72 h in -S-Si plants versus a more moderate expression (Œ75) at D21 but maintained over time (D21 + 72) in -S+Si plants) might provide an explanation for the similar amounts of sulfur taken-up during the 72 h S re-supply in plants previously deprived of S, irrespective of the Si treatment.

In conclusion, according to a recent review [Ali *et al.*, 2020], the current study is only the third to investigate S-Si interactions and the first to explore the effect of Si supply on S uptake in *Brassica napus* L., a field crop of substantial agronomic interest with high sulfur requirements and low Si accumulation. This study reveals that although Si supply does not lead to changes in sulfur status, a significant effect on the expression of genes encoding sulfate transporters has been observed. This apparent discrepancy raises questions about the impact of Si on the transcriptional and post-transcriptional regulatory pathways of S transporters in *Brassica napus* cultivated under S deficiency. Future investigations combining comparative omics approaches should be undertaken to decipher the mechanisms involved in these regulatory pathways.

Supplemental data

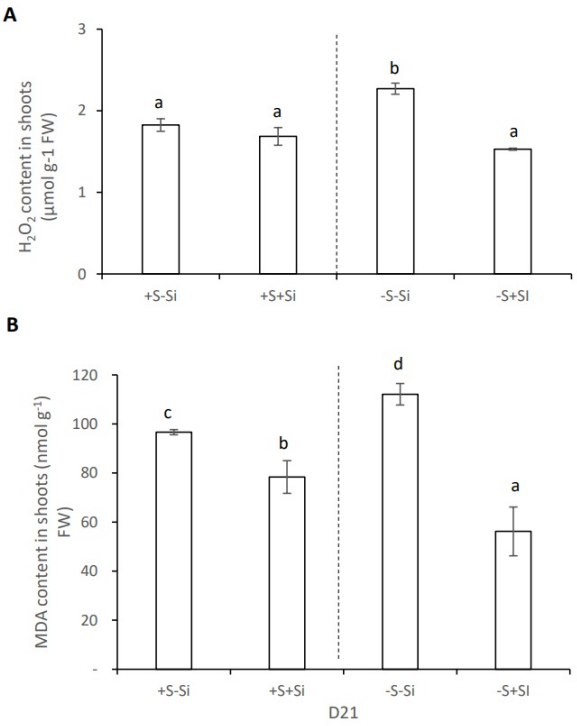


FIGURE2.8 – Hydrogen peroxide (H_2O_2) and malondialdehyde (MDA) contents in shoots of *Brassica napus* L. cultivated in hydroponic conditions for 21 days (D21) with (+S; 500 μM) or without sulfur (S; 0 μM) concentrations and with (+Si; 1.7 mM) or without silicon (-Si) supply. Data are means $\pm$ SE (for n = 4). Different lowercase letters indicate significant difference in the indices ($p < 0.05$). Hydrogen peroxide (H_2O_2) and malondialdehyde (MDA) contents were determined according to methods previously described by Haddad et al.

2.2 Un apport en silicium améliore la nodulation et la fixation de l'azote et favorise la croissance de *Trifolium incarnatum* L. en condition de carence en soufre

plants

MDPI

Article

Silicon Supply Improves Nodulation and Dinitrogen Fixation and Promotes Growth in *Trifolium incarnatum* Subjected to a Long-Term Sulfur Deprivation

Raphaël Coquerel [1], Mustapha Arkoun [2], Quentin Dupas [1], Fanny Leroy [3], Philippe Laîné [1,†] and Philippe Etienne [1,*,†]

[1] Unicaen, INRAE, UMR 950 EVA, SF Normandie Végétal (FED4277), Normandie Université, 14000 Caen, France; raphael.coquerel@unicaen.fr (R.C.); quentin.dupas@unicaen.fr (Q.D.); philippe.laine@unicaen.fr (P.L.)
[2] Laboratoire de Nutrition Végétale, Agro Innovation International-TIMAC AGRO, 35400 Saint-Malo, France; mustapha.arkoun@roullier.com
[3] Plateau Technique d'Isotopie de Normandie (PLATIN'), Unité de Services EMERODE, Normandie Université, 14000 Caen, France; fanny.leroy@unicaen.fr
* Correspondence: philippe.etienne@unicaen.fr
† These authors contributed equally to this work.

2.2.1 Préambule

Contexte : Chez les Fabacées, plusieurs études montrent que la carence en S diminue de façon significative leur capacité à fixer le diazote atmosphérique (N_2), notamment en réduisant leur nombre de nodules racinaires et leur teneur en nitrogénase [Varin *et al.*, 2010, Scherer *et al.*, 2008]. Le Si est reconnu comme étant un élément permettant d'atténuer de nombreux stress nutritionnels. Cependant, les effets d'un apport en Si chez des Fabacées soumises à une carence en S n'ont, jusqu'alors, jamais été étudiés. Une telle étude s'avère particulièrement pertinente si l'on considère que certaines Fabacées, telles que le trèfle incarnat (*Trifolium incarnatum* L.), cultivées en association avec le colza (plante très exigeante en S), seront confrontées à une carence en S résultant de la forte compétition entre les deux plantes pour la ressource en S du sol.

Objectifs et démarche expérimentale : Les effets d'un apport en Si ont été étudiés sur de plantes de *Trifolium incarnatum* L. soumises à une carence en S pendant 63 jours. Pour ce faire, les plantes ont été cultivés en hydroponie selon quatre modalités : alimentées (+S) ou non en S (-S), et additionnées (+Si) ou non en Si (-Si). L'effet d'un apport de Si sur la croissance, la nodulation, et la capacité de fixation de l'N_2 de la plante a été étudié. En outre, un marquage ^{15}N a été réalisé afin de discriminer l'origine de l'N (solution nutritive ou atmosphère) contenu dans les plantes.

Faits marquants : Après 63 jours de culture, quel que soit les conditions de fertilisation S (+S ou S), un apport de Si **augmente la biomasse et la capacité de fixation du N_2 du trèfle ainsi que l'abondance en nitrogénase des nodules racinaires**. De manière très intéressante, il est également constaté qu'un apport de Si induit **une augmentation du nombre et de la biomasse totale des nodules seulement chez les plantes privées en S** qui conduit à une **augmentation des capacités d'absorption de N_2 qui est significativement supérieure à celle observées chez les plantes +S+Si**.

2.2.2 Introduction

At the end of the 20th century, various policies were implemented to drastically decrease SO_2 emissions into the atmosphere [Hoesly *et al.*, 2018, Aas *et al.*, 2019] in order to improve air quality and reduce the negative effects of these emissions on human health [Orellano *et al.*, 2021]. Consequently, this legislation has led to a strong decrease in sulfur (S) deposits on agricultural soils and has increased the occurrence of S deficiency [Feinberg *et al.*, 2021], especially in plants requiring high S such as brassicas [D'Hooghe *et al.*, 2013, Sorin *et al.*, 2015, Etienne *et al.*, 2018] and legumes [Varin *et al.*, 2010, Zuber *et al.*, 2013, Gao *et al.*, 2016, Becana *et al.*, 2018]. A sulfur deficiency can lead to many metabolic perturbations [Raza *et al.*, 2020b, Ristova et Kopriva, 2022] such as reduced atmospheric dinitrogen (N_2) fixation [Scherer *et al.*, 2008, Varin *et al.*, 2010] and nitrogen (N) uptake from soil [Karmoker *et al.*, 1991] and it usually leads to sharp drops in the yield and quality of the harvested product [Zuber *et al.*, 2013, Girondé *et al.*, 2015a]. Finally, due to the decrease in seed quality, sulfur deficiency has indirect negative impacts on the health of human and animal consumers [Yu *et al.*, 2021]. Currently, use of S fertilizers at a dose of about 30 kg S.ha^{-1} [Génard *et al.*, 2017b] is the most widely used strategy to support S deficient crops. However, in the global agroecological context of reducing inputs, it is urgent that other strategies be developed to alleviate the stress of plants experiencing S deficiency. Among them is consideration of supplementation with silicon (Si), whose beneficial effects on plants subjected to biotic [Verma *et al.*, 2021, Bakhat *et al.*, 2018] and abiotic [Moraes *et al.*, 2022] stresses has been widely described in the literature. For example, a recent review reported that Si mitigates the negative effect of abiotic stresses as early as seed germination [El Moukhtari *et al.*, 2022b] and several studies have reported that Si supply enables alleviation of plants experiencing drought [Wang *et al.*, 2021] or heat stress [Mustafa *et al.*, 2021]. In the same way, a Si supply enables better tolerance to salt stress by sustaining various biological process such as photosynthesis or by stimulating detoxification of reactive oxygen species (ROS) [El Moukhtari *et al.*, 2022a]. Moreover, it has been shown that Si supplementation is beneficial in plants subjected to nutrient deficiency, such as deficits in N, P and K, and to a lesser extent S [Haddad *et al.*, 2018, Pavlovic *et al.*, 2021, Laîné *et al.*, 2022]. In legumes, the beneficial effects of silicon have also been demonstrated in plants subject to a large panel of abiotic stresses. For example, in several legume species exposed to salt stress, Si supply leads to maintenance of atmospheric N_2 fixation by increasing the number of nodules and their leghemoglobin concentration and nitrogenase activity [El Moukhtari *et al.*, 2022c, Putra *et al.*, 2021]. Although Si has several beneficial effects under a variety of adverse conditions, there are currently no studies that have focused on the effects of Si application to legumes subjected to S-deficiency. Indeed, currently only three studies demonstrate beneficial effects of Si application in barley [Maillard *et al.*, 2018], rice [Réthoré *et al.*, 2020] and rapeseed [Laîné *et al.*, 2022] subjected to S-deficiency. In this study, we focused on *Trifolium incarnatum* L. because previous studies have shown that

this legume species is of agroecological interest especially when it cultivated in mixed crops. For example, in *Trifolium incarnatum* L. - *Brassica napus* L. intercrop, several works recently report shown that the transfer of nitrogenous compounds from clover to rapeseed improved the agronomic performance of this field crop [Génard *et al.*, 2017b, Génard *et al.*, 2017a, Génard *et al.*, 2016].

The objectives of this study were to assess the effect of Si supply in *Trifolium incarnatum* L. subjected (or not) to a long-term S deficiency (63 days). For this, the effect of Si supply on the growth, nodulation (number, biomass and nitrogenase abundance of nodules) and atmospheric N_2 fixation capacity was performed in S-deprived or S-fed plants and those supplied or not with Si (1.7 mM) over 21, 42 and 63 days. Finally, the beneficial effects of Si supply on growth, nodulation and N_2 fixation observed in S-fed and mainly S-deprived plants have been discussed.

2.2.3 Materials and methods

Plant Growth Conditions and Experimental Design

The experimental design is summarized in Figure 2.9. In a greenhouse, seeds of *Trifolium incarnatum* L. were germinated on perlite over deionized water for four days in the dark [Génard *et al.*, 2017b]. When the first leaf emerged, seedlings were transferred to natural light conditions and supplied with nutrient solution for two weeks containing : KNO_3 (1 mM), KH_2PO_4 (0.25 mM), KCl (1 mM), $CaCl_2$ (3 mM), $MgSO_4$ (0.5 mM), EDTA-2NaFe (0.2 mM), H_3BO_3 (14 μM), $MnSO_4$ (5 μM), $ZnSO_4$ (3 μM), $CuSO_4$ (0.7 μM), $(NH_4)_6(Mo)_7O_{24}$ (0.7 μM),$CoCl_2$ (0.1 μM). After two weeks, the seedlings were transplanted in hydroponics tanks (20 L, nine plants per tank) containing the nutrient solution described above and inoculated with *Rhizobium leguminosarum bv trifolii* (T354) [Génard *et al.*, 2017a] previously grown in YEM liquid medium [Gulati, 1979] for 72 h. After four weeks (D0), plants were separated into four sets : the first two sets corresponded to plants maintained on S (+S; 500 μM) and supplied (+S+Si) or not (+S-Si) with 1.7 mM silicon for 63 days (D63). The nutrient solution described above with the addition of 1.7 mM silicon (Si as sodium metasilicate : Na_2SiO_3) or NaCl (3.4 mM to compensate the sodium supplied by the Si treatment) to the +S+Si and +S-Si plants, respectively. The other two sets corresponded to plants deficient in S (-S) and supplied (-S+Si) or not (-S-Si) with silicon for 63 days. For this, the nutrient solution was modified as follows to remove S : KH_2PO_4 (0.25 mM), KCl (1 mM), $CaCl_2$ (3 mM), $MgCl_2$ (0.5 mM), EDTA-2NaFe (0.2 mM), H_3BO_3 (14 μM), $MnCl_2$ (5 μM), $ZnCl_2$ (3 μM), $CuCl_2$ (0.7 μM), $(NH_4)_6(Mo)_7O_{24}$ (0.7 μM) and $CoCl_2$ (0.1 μM). In addition, plants were supplied with $K^{15}NO_3$ (1 mM, 0.5% isotopic excess) in order to discriminate between the N taken up from nutrient solution and the N derived from atmospheric fixation in the plants. Throughout the culture duration, natural light was supplied by high pressure sodium lamps (Philips, MASTER GreenPower T400W) with photosynthetically

active radiation of 450 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} at canopy height. Nutrient solutions, continuously aerated with a compressed air bubbling system, were replaced every three days. The pH of the nutrient solution was monitored each day and adjusted if necessary to 5.8 $\pm$ 0.2. At each solution renewal, 10 mL of medium containing *Rhizobium leguminosarum bv trifolii* (T354) was added to each tank. After 21, 42 and 63 days of cultivation, plants were harvested (Figure 2.9). At each harvest, the nodules were counted, separated from roots, weighed and frozen at -80°C. In addition, shoots and roots were separated and weighed. Then, an aliquot of each plant compartment was placed in liquid nitrogen and stored at -80°C and the rest was dried at 60°C. After dry weight determination, samples were ground to perform the elemental analyses.

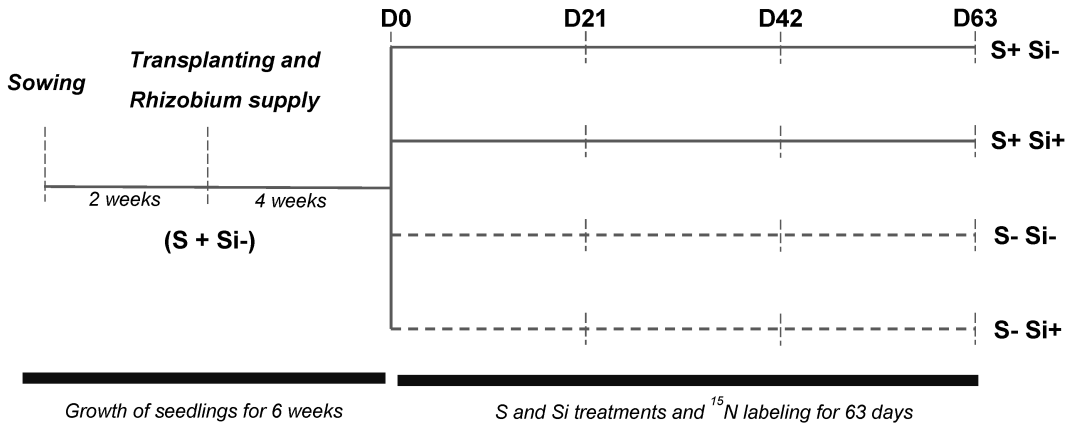


FIGURE2.9 – Experimental design used to study the effect of silicon supply on *Trifolium incarnatum* L. grown with (+S) or without (-S) sulfur. After six weeks of cultivation with sulfur (+S; 500 μM) (D0), plants were separated into four batches : the first two batches (full line) corresponded to plants that continued to be fed with S (+S; 500 μM) and supplied (+Si; 1.7 mM) or not (-Si) with Si for 63 days (D63). The other two batches (dotted lines) corresponded to plants deficient in S (-S) and supplied (+Si; 1.7 mM) or not (-Si) with silicon. At D0, all plants were fed with $K^{15}NO_3$ (1 mM, 0.5% isotopic excess).

Determination of Total, S, Si, N and ^{15}N Concentrations and Calculation of the Distribution of Nitrogen Sources in Plants

For S and Si concentration determinations, approximately 1 g of the dried powder was analyzed with an X-ray-fluorescence spectrometer (XEPOS, Ametek, Berwyn, PA, USA) using calibration curves obtained from international standards.

To determine the total N and ^{15}N concentrations, 1.5 mg of each dried powder was precisely weighed and placed into tin capsules before analysis with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Horizon, NU Instruments, Wrexham, UK) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). The total N amount (*Ntot*) in each organ or in the whole plant was calculated as :

$$Ntot = \frac{\%N \; x \; DW}{100}$$

The amount of ^{15}N (^{15}N) was determined by the following :

$$^{15}\mathrm{N} = \frac{\%^{15}\mathrm{N} \; x \; Ntot}{100}$$

As the nutrient solution was labeled with a 0.5% isotopic excess, it was possible to calculate the total amount of nitrogen taken up from the nutrient solution (N_{ns}) :

$$\mathrm{N_{ns}} = \frac{^{15}\mathrm{N}total \; x \; 100}{0.5}$$

The amount of nitrogen from dinitrogen (N_2) atmospheric fixation (N_{atm}) was then obtained by subtracting the amount of nitrogen taken up from the nutrient solution from the total nitrogen in the plant. Then, the proportion of each N source (% of N_{ns} or % N_{atm}) was calculated as follows :

$$\%\mathrm{N_{ns}} \; (or \; \%\mathrm{N_{atm}}) = \frac{\mathrm{N_{ns}}(or \; \mathrm{N_{atm}}) \; x \; 100}{\mathrm{Ntot_{whole.plant}}}$$

Extraction and Quantification of Proteins from Nodules

Total proteins were extracted from nodules using the protocol described by [Varin *et al.*, 2010]. Fresh nodules were ground in liquid nitrogen in a mortar and approximately 30 mg of the resulting powder was mixed in 2 mL of cold acetone containing 10% trichloroacetic acid (w/v). This mixture was centrifuged at 16,000x g (4 min at 4 °C), the supernatant was then removed the pellet was resuspended with 1.75 mL of ammonium acetate (0.1 M)/methanol (80%) buffer to precipitate the proteins. After centrifugation at 16,000x g (3 min at 4 °C), the supernatant was removed, and the pellet was washed with 1 mL of acetone (80%) and centrifuged again. The resulting pellet was resuspended with 800 μL of phenol pH 8 and 800 μL of sodium dodecyl sulfate (SDS) buffer [30% saccharose (w/v), 2% SDS (w/v), 0.1 M TRIS-HCl (w/v), 0.5% β-mercaptoethanol (v/v), pH 8] then centrifuged at 16,000x g (10 min at 4 °C). The upper phenolic phase was recovered and 800 μL of ammonium acetate (0.1 M)/methanol (80%) buffer was added. After storing overnight at -20 °C, the mixture was centrifuged at 16,000x g (10 min at 4 °C). Then the pellet was washed with 1 mL of methanol (100%) and after centrifugation at 16,000x g (10 min at 4 °C) it was washed again with 1 mL of acetone (80%). The pellet was resuspended with a buffer containing dithiothreitol (DTT, 11.11 mM), thiourea (2.22 M), urea (6.66 M) and Tris buffer 2 M (33.33 mM) and used for the determination of the protein concentration using the

Bradford method [Bradford, 1976].

Immunodetection and Quantification of Nitrogenase in Root Nodules

The abundance of nitrogenase in nodules was determined after Western blotting of 20 μg of total proteins previously separated by SDS-PAGE (12% polyacrylamide gels at a constant current : 250 V, 75 mA, 1 h). Western blots were carried out on a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Immobilon-PVDF, Millipore Bedford, USA) by semi-dry electroblotting (Pierce™ G2 Fast Blotter, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Conditions for protein transfer and immunoblotting were carried out as previously described [Varin *et al.*, 2010]. Briefly, after Western blotting, PVDF membrane was incubated overnight with chicken polyclonal anti-nitrogenase (NifH) from IgG antibodies (Agrisera, SE 911, Vanadas, Sweden; dilution 1 :2000). Subsequently the PVDF membrane was washed four times with TBST (Tris-base 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8, 0.1% Tween 20) before incubation with secondary antibody (rabbit anti chicken immunoglobin Y coupled to phosphatase alkaline; dilution 1 :6000) for 1 h. The nitrogenaseantibody complex was revealed using the Bio-Rad alkaline phosphatase kit as a single signal at a molecular weight between 25 and 37 kDa (supplementary figure 2.15). Independently performed gels and Western blots were scanned and analyzed using the Millipore Bioimage computerized image analysis system to determine the intensity of signal (U.A.) that was proportional to the nitrogenase abundance in each nodule sample. The nodule nitrogenase concentration (U.A. g^{-1} FW) was calculated by dividing the intensity value by the fresh nodule biomass (20 μg) used for Western blot analysis. Then the total abundance of nitrogenase in all the nodules of one plant was estimated by multiplying the nitrogenase concentration by total nodule biomass of this plant. Finally, at each harvest time, the results were expressed relative to the abundance of nitrogenase in the total nodules from control plants (+S-Si).

Statistical Analysis

The experiment was performed with five independent replicates. All data are indicated as the mean$\pm$S.E (n = 5). Statistical analyses were performed using R software (version 4.2.0 : R Core Team, 2022). At each harvest date (D21, D42 and D63), significant differences between treatments were determined using Student's t-test ($p < 0.05$).

2.2.4 Results

Effect of Si Supply on Growth of *Trifolium incarnatum* Subjected or Not to S-Deprivation

At D21, whole plant biomasses were similar and reached about 5 g plant^{-1}, regardless of the S and Si supplies. At day 42, irrespective of the Si supply (-Si or +Si), S-deprivation had no impact on whole plant biomasses (Figure 2.10). However, it is notable that the Si supply led to a significant increase in shoot biomass (around 1.5-fold) in both S-fed and S-deprived plants. In comparison to S-fed plants, at D63 a S-deprivation led to a significant decrease in total biomass when plants were cultivated without Si, which was as expected. In contrast, whichever S treatment was considered (+S or -S), Si supplementation resulted in an increase in total plant biomass (by 1.2- and 2-fold in +S+Si and -S+Si plants, respectively; Figure 2.10). In S-fed plants (+S+Si), this effect is explained by an increase in shoot biomass alone. In S-deprived plants, this was partly the result of an increase in root biomass, but mainly due to a strong increase in shoot biomass. Interestingly, it could be highlighted that a Si supply offset the negative effect of S deprivation on plant growth because the total biomass of -S+Si plants was increased by around 13g. plant^{-1} compared to -S-Si plants, and reached a biomass similar to S-fed plants (24.75g. plant^{-1} $\pm$ 2.5 g) (Figure 2.10).

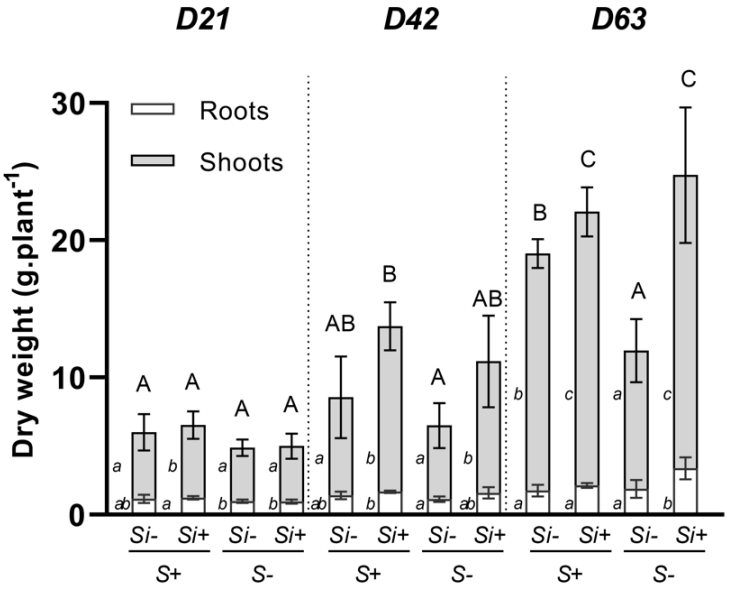


FIGURE2.10 – Root and shoot dry weights of *Trifolium incarnatum* plants cultivated in hydroponic conditions for 21 (D21), 42 (D42) and 63 days (D63) with (+S; 500 μM) or without (-S) sulfur and supplied with (+Si; 1.7 mM) or without (-Si) Si. Data are means $\pm$ SE (n = 5). Different lowercase and uppercase letters indicate that the mean dry weight between organs or whole plants harvested at the same time (D21, D42 or D63) are significantly different ($p < 0.05$), respectively.

Determination of Total Sulfur (S) and Silicon (Si) Concentrations in Plants

As expected, the S concentration in roots and shoots in S-deprived plants were always lower than in those of S-fed plants (Figure 2.11A,B), whatever the harvest date (D21, D42 or D63). In general, Si supply had no effect on S concentrations in plants compartments except at D21 where the S concentrations in roots and shoots in -S+Si plants were slightly lower than those of -S-Si plants (Figure 2.11A,B). In the same manner, whichever S treatment was considered (-S or +S), the Si concentrations in roots and shoots of plants cultivated without Si (+S-Si or -S-Si) were always lower than those of plants supplied with Si (-S+Si or +S+Si). Moreover, in plants supplied with Si, it was evident that the Si concentrations in roots increased throughout the treatment (from 1.8 to 3.5mg.g^{-1} DW on average), while the Si concentration in shoots was always lower and remained stable (around 1.1mg.g^{-1} DW), regardless of the harvest date (Figure 2.11C,D). These data show that, as previously demonstrated in *Brassica napus* by [Haddad *et al.*, 2018], *Trifolium incarnatum* preferentially accumulates Si in roots. Finally, it was observed that Si concentrations were not affected by the presence or the lack of S in the nutrient solution (Figure 2.11C,D).

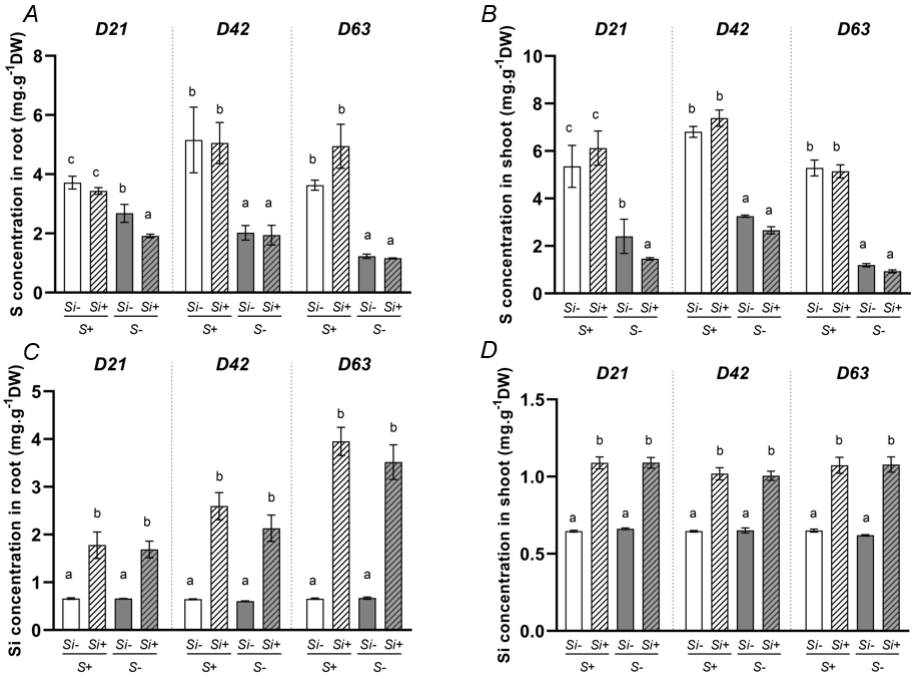


FIGURE2.11 – Sulfur (*A,B*) and silicon (*C,D*) concentrations in roots and shoots of *Trifolium incarnatum* plants cultivated in hydroponic conditions for 21 (D21), 42 (D42) and 63 days (D63) with (+S; 500 μM) or without (-S) sulfur and supplied with (+Si; 1.7 mM) or without (-Si) Si. Data are means $\pm$ SE (n = 5). Different lowercase letters indicate that the means between plants harvested at the same time (D21, D42 or D63) are significantly different ($p < 0.05$).

Effect of Silicon Supply on Root Nodulation

In S-fed plants, regardless of the harvest date (D21, D42 or D63) or whether plants were treated with or without Si, the number of nodules per plant (approximately 7000 nodules $plant^{-1}$; Figure 2.12A), the weight of a single nodule (Figure 2.12B), and the weight of all nodules per plant (Figure 2.12C) remained similar. Compared to +S-Si plants, in -S-Si plants, the number of nodules (around 4000 $nodules.plant^{-1}$), the weight of a single of nodule (Figure 2.12B) and the weight of all nodules by plant (Figure 2.12C) decreased for all treatment durations. These results showing a negative effect of S-deprivation on nodulation agree with previously reported work performed in Trifolium repens, another clover species [[Varin *et al.*, 2010]. In contrast, surprisingly, the provision of a Si supply to -S+Si plants alleviated the negative effect of S deprivation on the number of nodules per plant, which again was similar to the observations in S-fed plants at D21 and D42 (between 6000 and 7000 $nodules.plant^{-1}$) and even to a high increase at 63 days (15,000 vs. 7000 $nodules.plant^{-1}$ in -S+Si and +S-Si, respectively) (Figure 2.12A). In addition, while the addition of Si in these -S+Si plants did not affect the weights of individual nodules or even decreased their individual weights at D63, it nevertheless led to an increase in the total weight of the nodules per plant at D21 (around 2-fold), D42 (around 1.5-fold) and more especially at D63 (around 4-fold) compared to the -S-Si plants (Figure 2.12C).

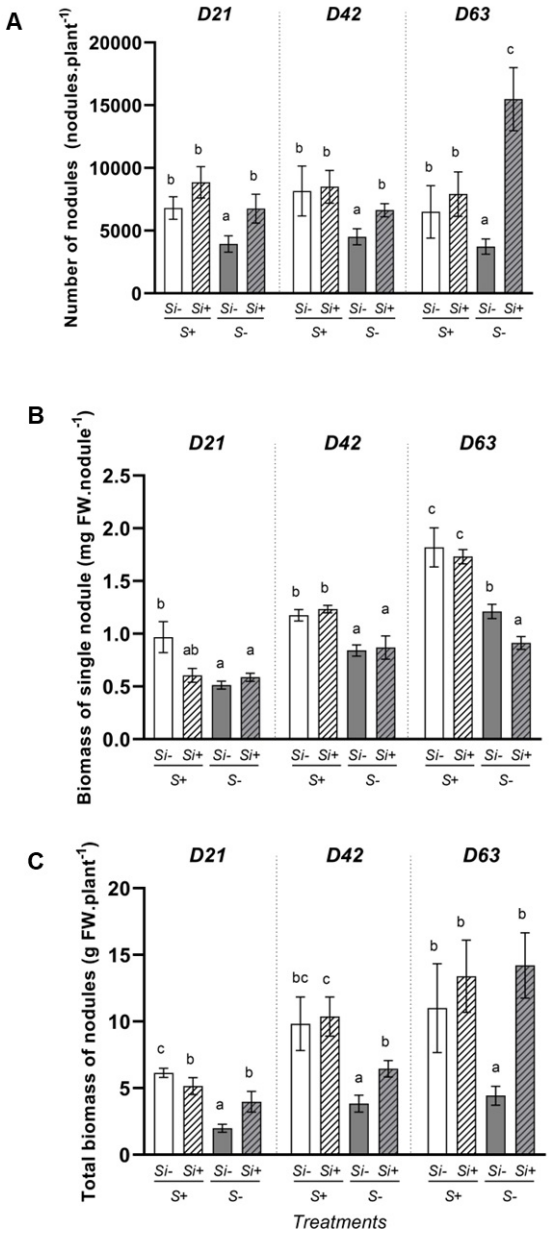


FIGURE2.12 – Number of nodules (**A**), fresh weight of individual nodules (**B**) and total fresh weight of all the nodules (**C**) of *Trifolium incarnatum* plants cultivated in hydroponic conditions for 21 (D21), 42 (D42) and 63 days (D63) with (+S; 500 μM) or without (-S) sulfur and with (+Si; 1.7 mM) or without (-Si) Si supply. Data are means $\pm$ SE (n = 5). Different lowercase letters indicate that the means between plants harvested at the same time (D21, D42 or D63) are significantly different ($p < 0.05$).

Effect of Silicon Supply on the Total Plant N Derived from Uptake and N_2 Fixation

Whatever the S treatment (+S or -S), at D21 the Si supply had no effect on either the amount of N taken up from nutrient solution or the amount of N derived from atmospheric N_2 fixation (Figure 2.13A). In contrast, at D42, a Si supply led only to an

increase in the N amount derived from atmospheric N_2 fixation in plants cultivated with or without S. For example, at D42, in S-fed plants, the Si supply led to an increase in the amount of N_2 derived from the atmosphere by around 1.8-fold and contributed to an increase in the total N amount from 296 ± 28 to 434 ± 23 mgplant^{-1} compared to +S-Si plants (Figure 2.13A). In addition, at D63, it can be pointed out that in plants grown without Si, S deprivation significantly reduced (by 1.5-fold) the total amount of nitrogen in plants from 644 ± 45 to 400 ± 41 mg.plant^{-1}. This decrease is explained by a decrease in the amount of nitrogen taken up from the nutrient solution and especially by a decrease in N_2 fixation capacity, which dropped from 45 to 30% (Figure 2.13B). At this harvest time, irrespective of the S treatment (+S or -S), a Si supply increased the N_2 fixation capacity, which resulted in an increase in the total N amount in plants. However, this Si effect was exacerbated in S-deprived plants. Indeed, in a spectacular way, supplying Si to S-deprived plants allowed a strong increase in both the amount of N fixed (around 2.7-fold) and the total N (around 1.8-fold), which reached values comparable to those observed in S-fed plants. Thus, by improving the N_2 fixation of S-deprived plants (by 30-55%; Figure 4B), a Si supply mitigates the negative effect of S deprivation on N nutrition and thus maintains the total amount of N in -S plants at a level similar to that observed in +S plants (Figure 2.13A).

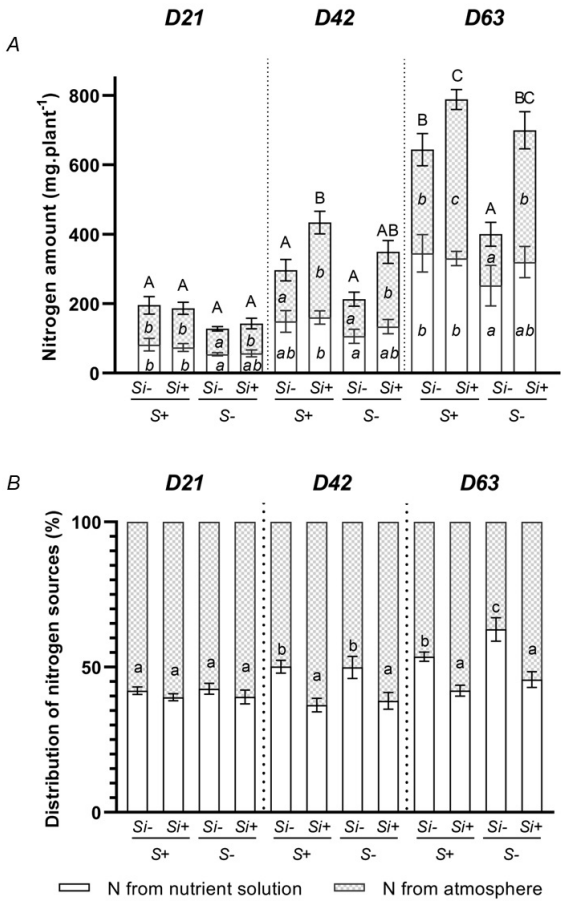


FIGURE2.13 – Root and shoot total nitrogen amounts (**A**) and distribution of nitrogen sources (**B**) in *Trifolium incarnatum* plants cultivated in hydroponic conditions for 21 (D21), 42 (D42) and 63 days (D63) with (+S; 500 μM) or without (-S) sulfur and with (+Si; 1.7 mM) or without (-Si) Si. Data are means $\pm$ SE (n = 5). Different lowercase italic letters to the left of the histogram and different uppercase letters above or inside of the histogram indicate that the means between plants harvested at the same time (D21, D42 or D63) are significantly different ($p < 0.05$).

Effect of Silicon Supply on Abundance of Nitrogenase in Nodules

At each harvest date and for each treatment, the concentration of nitrogenase in nodules (U.A. mg^{-1} FW) was determined using Western blot analysis (supplementary figure 2.15). From these data, at each harvest date, the total abundance of nitrogenase in all nodules of one plant was assessed (see Materials and Method for details) and expressed relative to +S-Si plants (considered as controls) to study the effects of S and Si treatments on this parameter (Figure 2.14). At D21, a negative effect of S-deprivation on nitrogenase relative abundance was observed and Si supply had no effect on this parameter, irrespective of the S treatment. At 42 and D63, the negative effect of S-deprivation on nitrogenase relative abundance was observed only in plants cultivated without Si. Indeed, compared to -S-Si plants, the Si supply increased the nitrogenase relative abundance by 5-fold and 6-fold at D42 and D63, respectively. This increase is a consequence of the increase in nitrogen concentration in nodules (supplementary figure 2.15) and of the increase in the total nodule biomass (Figure 2.12C) in -S+Si plants compared to -S-Si plants. Interestingly, the nitrogenase relative abundance in -S+Si plants at D63 again became similar to the values observed in +S+Si plants, suggesting a new time period in which supplying Si alleviated the negative effect of S-deprivation. In S-fed plants, even though a Si supply also resulted in an increase (around 3-fold) in the nitrogenase relative abundance at D42 and D63 (Figure 2.14), this increase was only due to an increase in the nitrogenase concentration in nodules of +S+Si plants (supplementary figure 2.15) because the total biomass of nodules was similar in +S-Si and +S+Si plants (Figure 2.12C).

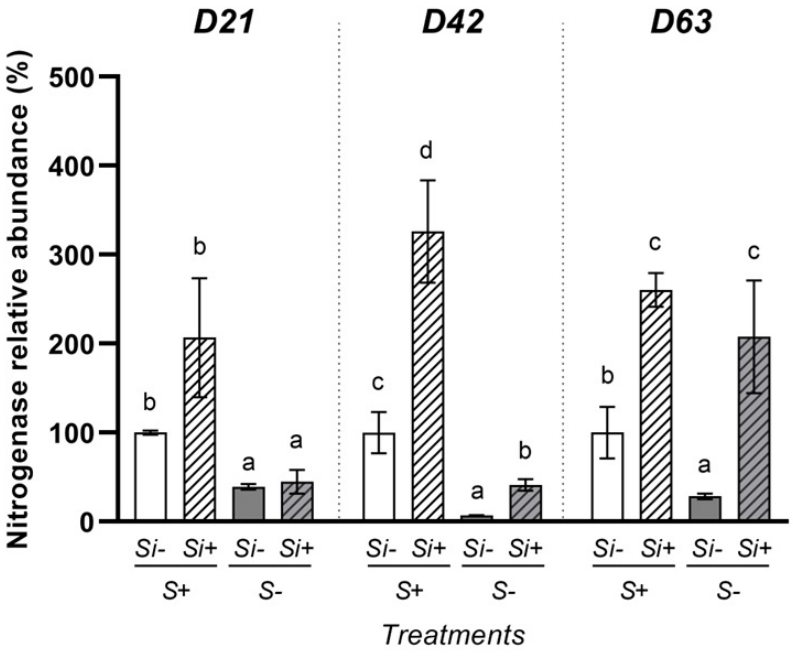


FIGURE2.14 – Change in the total amount of nitrogenase in nodules of *Trifolium incarnatum* cultivated in hydroponic conditions for 21 (D21), 42 (D42) and 63 days (D63) with (+S; 500 μM) or without (-S) sulfur and with (+Si; 1.7 mM) or without (-Si) Si supply. For each time (D21, D42, or D63) and each treatment the total amount of nitrogenase was expressed relative to the value obtained for the +S-Si plants. Data are means $\pm$ SE (n = 3). Different lowercase letters indicate that the mean between plants harvested at the same time (D21, D42 or D63) are significantly different ($p < 0.05$).

2.2.5 Discussion

Silicon is largely known to alleviate negative effects of abiotic stress in plants [Haddad *et al.*, 2018, Laîné *et al.*, 2022, Mostofa *et al.*, 2021, Laîné *et al.*, 2019] and to improve plant health [Putra *et al.*, 2021]. However, the effect of Si supply on S-deprived plants is currently poorly documented, as reported by [Pavlovic *et al.*, 2021, Ali *et al.*, 2020]. The main objective of this study was to evaluate the effect of Si supply on the growth, nodulation and atmospheric N_2 fixation capacity of *Trifolium incarnatum* subjected (or not) to long-term sulfur deprivation (63 days). This study demonstrated that the growth of *Trifolium incarnatum* was not affected by S deficiency during the 21 first days of treatment (Figure 2.10). This result agrees with previous work performed in *Brassica napus* cultivated in hydroponic conditions and subjected to the same duration of S-deprivation [Laîné *et al.*, 2022]. In contrast, when the S-deprivation was prolonged (D63), this study showed that a strong decrease in both shoot and total biomasses occurred in -S-Si plants compared to +S-Si plants (Figure 2.10). This result agrees with previous studies reporting that long-term S deficiency limits growth in several leguminous plant species [Varin *et al.*, 2010, Zuber *et al.*, 2013]. A supply of

Si to these S-deprived plants led to an increase in shoot biomass at D42, and more interestingly to an increase in root and shoot biomass at D63, which allowed -S+Si plants to reach a total biomass similar to and even higher than that of S-fed plants (Figure 2.10). These beneficial effects of Si on the biomass of S-deprived plants agree with earlier studies showing that Si alleviates the negative effects on growth of plants experiencing macronutrient deficiencies (for review see [Pavlovic *et al.*, 2021]) such as N [Haddad *et al.*, 2018], K [Dos Santos Sarah *et al.*, 2021] or P [Hu *et al.*, 2020, Beier *et al.*, 2022]. However, with the beneficial effects of Si being poorly documented in plants subjected to S-deficiency [Pavlovic *et al.*, 2021, Ali *et al.*, 2020], this study is the first to demonstrate enhancement of growth of S-deprived clover plants following application of Si. In addition, in our study, it was surprising to find that Si supply also promoted the growth of S-fed plants by enhancing shoot biomass from D42 to D63 (Figure 2.10). Indeed, in the literature it is usually stated that the benefits of Si for growth are mainly observed in plants under biotic and abiotic stresses [Epstein, 1999].

To explain these beneficial effects of Si in *Trifolium incarnatum*, our study has focused on N nutrition, which is one of the major macronutrients and considered the most important component for supporting plant growth [Engels, C et Marschner, H., 1995, Leghari, S.J. *et al.*, 2016]. Our results show that at D63, compared to S-fed plants, the S-deprivation in -S-Si plants resulted in a significant decrease in the total amount of N, and this was mainly explained by a significant decrease in N_2 atmospheric fixation while the uptake of N from the nutrient solution was not affected (Figure 2.13). This decrease in N_2 fixation is associated with a decrease in the number of nodules, the biomass of individual nodules and the total biomass of nodules per plant (Figure 2.12). Further, it was also associated with a significant decrease in total nitrogenase abundance (Figure 2.14) in roots in -S-Si plants, which occurred after 21 days of S-deficiency. These negative effects of S-deficiency on N_2 fixation, the number and biomass of nodules the nitrogenase abundance all agree with previous studies [Jamal *et al.*, 2010, Zenda *et al.*, 2021]. In particular, there are close parallels with work performed on *Trifolium repens* by [Varin *et al.*, 2010], who reported that S-deficiency reduced cysteine and methionine contents, both of which are key amino acids for nitrogenase synthesis. As previously reported, these responses to S-deprivation could be explained by an increase in ROS [Chandra et Pandey, 2014], which will directly impact the structures and the activity of nodules [Mhadhbi *et al.*,]. Compared to -S-Si plants, supplying Si to S-deprived plants (-S+Si) led to an increase in the amount of total N, mainly due to the strong increase in N_2 fixation from D42 onwards (Figure 2.13B). This improvement in N_2 fixation was associated with an increase in number and total biomass of nodules from D21 (Figure 2.12) and later (from D42) with a higher nitrogenase abundance in the nodules (Figure 2.14 and supplementary figure 2.15) of -S+Si plants relative to -S-Si plants. This beneficial effect of Si agrees with numerous studies that have reported exogenous Si supply as being one of the most effective strategies to enhance nodulation and N_2 fixation in legumes under stressed conditions, including metal toxicity, salinity, alkalinity and pathogen attack [El Moukhtari *et al.*, 2022c, Putra *et al.*, 2021, Putra *et al.*, 2022]. Since nitrogen is a

macronutrient required for plant growth, the increase in nitrogen fixation caused by Si leads to an increase in the amount of total nitrogen -S+Si plants (Figure 2.13) and improves their growth (Figure 2.10). However, our study is currently the only one to show these beneficial effects of Si in response to S-deficiency. Given the central role of S in numerous biological processes (such as N_2 fixation, nitrogenase and leghemoglobin synthesis and ROS detoxification), it is therefore difficult to explain how a Si supply is able to alleviate the negative impacts of S-deprivation, and particularly regarding nodulation and N_2 fixation. In addition, in S-fed plants, supplying Si also led to an enhancement of the total N and N_2 fixation (Figure 2.13) without any effect on the number and biomass of nodules (Figure 2.12). In this case, the improvement in N_2 fixation is essentially due to the strong increase in the nitrogenase concentration in nodules (supplementary figure 2.15). This result agrees with a previous study showing that a Si application on *Medicago truncatula* increased the nitrogenase concentration in nodules and improved their N_2 fixation capacity [Putra *et al.*, 2021].

The current study has shown clearly that supplying Si alleviates the negative effects of S-deprivation in *Trifolium incarnatum*, especially by promoting root nodulation and N_2 fixation. Nevertheless, it is very difficult to explain the mechanisms related to these Si beneficial effects without being speculative. Indeed, regardless of the explanations advanced by earlier studies on other abiotic stresses where beneficial effects of Si on nodulation and N_2 fixation in legumes have been reported, the underlying mechanisms remain unclear and only some assumptions can be formulated [El Moukhtari *et al.*, 2022c]. For example, [Putra *et al.*, 2021] reported that Si supplementation might affect key symbiotic signals such as flavonoid compounds and would promote the attraction of rhizobia and increase the degree of nodulation. Another assumption supported by the same authors concerned the silicification of nodules, which would enhance their N_2 fixation efficiency. This hypothesis is compatible with the preferential accumulation of Si in the roots of *Trifolium incarnatum* (Figure 2.11C) observed in this study. Finally, it is well known that S-deprivation leads to ROS production, which might be significantly reduced by Si supply as shown recently by [Laîné *et al.*, 2022]. As suggested by some authors, the decrease in oxidative stress in -S+Si plants can lead to better nitrogenase activity, with this enzyme known to be inhibited in the presence of ROS [Putra *et al.*, 2021, Mostofa *et al.*, 2021]. Even if our pioneering study has demonstrated for the first time that Si supply alleviates the negative effect of S-deficiency in *Trifolium incarnatum*, further investigation is required to verify all or part of these hypotheses and to decipher the fine mechanisms that remain unclear or misunderstood.

In conclusion, the results of this study suggest that Si fertilization could be considered as part of emerging agroecological and agricultural practices to optimize fertilizer inputs. For example, to reduce the quantity of N inputs applied during *Brassica napus* crop growth, several recent studies have explored mixed cropping of this plant with legume species [Jamont *et al.*, 2013], and in particular with *Trifolium incarnatum* [Génard *et al.*, 2017b, Génard *et al.*, 2017a]. Indeed, the high sulfur requirements of

Brassica napus for growth can decrease the availability of S in the soil and lead to decreases in the N_2 fixation capacity of the companion legume. Thus, as suggested by this study, Si fertilization could alleviate this by increasing the atmospheric N_2 fixation capacity of clover and eventually lead to an enhancement of the agronomic performance of this mixed cropping by improving the transfer of exuded N compounds from *Trifolium incarnatum* to *Brassica napus* [Génard *et al.*, 2016].

Supplemental data

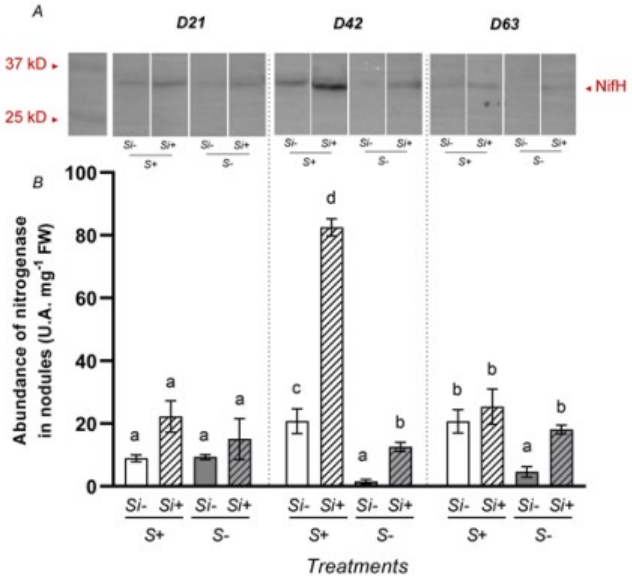


FIGURE2.15 – Change in nitrogenase abundance in nodules of Trifolium incarnatum plants cultivated in hydroponic conditions during 21 (D21), 42 (D42) and 63 days (D63) with (+S; 500 μM) or without (S) sulphur and with (+Si; 1.7 mM) or without (-Si) Si supply. Representative western blot performed with specific antibody of nitrogenase (NifH) (A). At each harvest date and for each treatment, the quantification of nitrogenase abundance was expressed to the fresh weight of the nodules (B). Data are means ś SE (n=3). Different Latin letters indicate that the mean of comparison of nitrogenase relative amount between plants harvested at the same time (D21, D42, D63) are significantly different ($p < 0.05$)

2.3 Modification du ionome et du protéome du nodule induite par un apport en silicium chez *Trifolium incarnatum* L. non alimenté en azote

frontiers | Frontiers in Plant Science

TYPE Original Research
PUBLISHED 06 November 2024
DOI 10.3389/fpls.2024.1462149

Ionomic and proteomic changes highlight the effect of silicon supply on the nodules functioning of *Trifolium incarnatum* L.

Raphaël Coquerel[1], Mustapha Arkoun[2], Jacques Trouverie[1], Benoit Bernay[3], Philippe Laîné[1†] and Philippe Etienne[1*†]

[1]UFR des Sciences, Université de Caen Normandie, INRAE, UMR 950 EVA, Caen, France, [2]Laboratoire de Nutrition Végétale, Centre Mondial d'Innovation-Groupe Roullier, Saint-Malo, France, [3]Université de Caen Normandie, Plateforme Proteogen, US EMerode 4206, Caen, France

OPEN ACCESS

EDITED BY
Karl H. Mühling,
University of Kiel, Germany

REVIEWED BY
Miroslav Nikolic,
University of Belgrade, Serbia
Mohammed Mouradi,
Université Sultan Moulay Slimane, Morocco

*CORRESPONDENCE
Philippe Etienne
philippe.etienne@unicaen.fr

†These authors have contributed equally to this work

RECEIVED 09 July 2024
ACCEPTED 14 October 2024
PUBLISHED 06 November 2024

2.3.1 Préambule

Contexte : L'azote (N) est l'un des macroéléments essentiels à la croissance et au développement des végétaux. La plupart des végétaux assurent leur croissance grâce à l'N prélevé dans le sol, ce qui les rend particulièrement sensibles à la carence en N. Au contraire, les Fabacées, qui ont la capacité de fixer le diazote atmosphérique (N_2) grâce à la présence de nodules racinaires issus de la symbiose avec des bactéries du sol, sont beaucoup moins affectées par la carence en N. Ainsi, de nombreuses études rapportent que la densité des nodules racinaires et la capacité de fixation du N_2 des Fabacées augmentent lorsque la disponibilité en N dans la solution du sol diminue [Xia *et al.*, 2017b]. En outre, d'autres études montrent qu'un apport de silicium (Si) chez des Fabacées cultivées sur un milieu non limitant en N mais devant faire face à d'autres stress abiotiques (carence en S (voir résultats présentés précédemment, Chapitre 3), sécheresse, salinité par exemple) conduit également à une augmentation du nombre et de la taille des nodules, mais aussi de leur capacité de fixation du N_2. Cependant, à ce jour, aucune étude n'a évalué l'effet d'un apport de Si sur les paramètres d'acquisition du N_2 (nodulation et fixation du N_2) chez des Fabacées cultivées en absence d'N dans la solution du sol.

Objectifs et démarche expérimentale : Cette étude vise donc à étudier les effets d'un apport de Si sur les paramètres d'acquisition du N_2 chez le trèfle incarnat (*Trifolium incarnatum* L.), ne disposant que de N_2 comme seule source d'N disponible pour assurer sa croissance. Pour ce faire, des plantes de trèfle incarnat dont la présence de nodules a été préalablement constatée ont été cultivées en hydroponie avec une solution nutritive dépourvue d'N en présence (+Si) ou en l'absence de Si (-Si) pendant 25 jours. Les effets du Si sur la croissance des plantes et leur nodulation racinaire ainsi que sur le ionome et le protéome des nodules isolés ont été étudiés.

Faits marquants : Comparativement au traitement -Si, l'apport de Si **augmente la nodulation et les capacités de fixation de N_2** de *Trifolium incarnatum* L. cultivés en l'absence d'N dans la solution nutritive. L'analyse ionomique des nodules révèle qu'un apport de Si **augmente la quantité de plusieurs macro-éléments** (potassium, phosphore et soufre) **et microéléments** (cuivre, zinc et molybdène) **connus pour améliorer l'efficacité de la nodulation et la fixation de N_2.** En outre, l'analyse protéomique comparative des nodules (+Si versus -Si) a mis en évidence qu'au niveau du symbiosome, **le Si module l'accumulation de 989 et 212 protéines respectivement dans les cellules racinaires et dans le bactéroïde.**

2.3.2 Introduction

Silicon (Si), the second most abundant element in the Earth's crust [McLeod et Shaulis, 2018], has recently gained attention due to its beneficial effects on plant growth and stress alleviation. Over the last ten years, interest has grown in gaining a deeper understanding of the role of Si in plants from both fundamental and applied points of view, as evidenced by the increasing number of research papers and review articles on the subject [Pavlovic *et al.*, 2021]. Although Si is not considered an essential element for plants, all studies have highlighted a beneficial effect of Si that only manifests itself when plants are subjected to biotic [Verma *et al.*, 2021] and abiotic stress [Conceição *et al.*, 2019, Sena *et al.*, 2022]. In particular, several studies have demonstrated that Si supply alleviates stress in plants subjected to nutritional deficiencies, such as N, P, K and S [Kandhol *et al.*, 2024, Laîné *et al.*, 2022, Haddad *et al.*, 2018, Pavlovic *et al.*, 2021]. These positive effects related to Si supply include mechanical (e.g. cell wall strengthening) and physiological changes (e.g. delayed leaf senescence and/or regulation of root transporters) [Markovich *et al.*, 2017, Etienne *et al.*, 2021, Laîné *et al.*, 2022], as well as transcriptomic changes in leaves and roots [Etienne *et al.*, 2021, Haddad *et al.*, 2019] and/or proteomic modifications (e.g. increases in enzymes involved in the detoxification of reactive oxygen species) [Chung *et al.*, 2020, Akhter *et al.*, 2022, Kandhol *et al.*, 2024]

Nitrogen is an essential macronutrient for plant growth and development, and is usually considered a key factor for ensuring the yield and seed quality of many crops [Rütting *et al.*, 2018]. While the N nutrition of most plant species relies entirely on their ability to take up inorganic N from the soil solution, Fabaceae also have the ability to fix atmospheric N_2 thanks to root nodules resulting from a symbiotic association with soil *rhizobia* [Lindström et Mousavi, 2020]. Several studies have shown that the number of root nodules and their fixation capacity are differentially modulated as a function of the inorganic nitrogen availability in the soil. Indeed, Xia et al. 2017 [Xia *et al.*, 2017b] reported that, in soybean, root nodulation was suppressed by high N (>50mg. L^{-1}) whereas it was accelerated by low N concentrations (<50mg. L^{-1}). Finally, in a recent study, Ke et al. (2024) [Ke *et al.*, 2024] reported that a total N-deprivation had no effect on root nodulation or nitrogenase activity in soybean. In addition, N_2 fixation is also impaired by various abiotic stress conditions such as other macronutrient deficiencies like potassium [Liu *et al.*, 2022a], phosphorus [Sulieman et Tran, 2015] and sulfur [Varin *et al.*, 2010, Coquerel *et al.*, 2023], or drought stress [Freitas *et al.*, 2022] and saline stress [Nitawaki *et al.*, 2021], which lead to a decrease in the number of nodules and nitrogenase content.

Recent studies indicate positive effects of Si supply on the nodulation efficiency of plants subjected to stress [El Moukhtari *et al.*, 2022c] or non-stress conditions [Putra *et al.*, 2021, Putra *et al.*, 2022]. For example, several studies report that Si supply improves the number of nodules and the level of N_2 fixation in M*edicago sativa* L.

and *Trigonella foenum-graecum* L. subjected to salt stress [El Moukhtari *et al.*, 2021, Lamsaadi *et al.*, 2023] and in *Trifolium incarnatum* L. grown under sulfur deficiency [Coquerel *et al.*, 2023]. However, to date, no study has investigated the effect of Si supply on nodulation efficiency and N_2 fixation capacity in plants depending on N_2 atmospheric as sole N source.

This study aimed to investigate the effects of Si on physiological traits such as shoot and root biomasses, total N and Si content, N_2 fixation capacity, nodulation parameters (nodule biomass, number, density and their nitrogenase content) in *Trifolium incarnatum* L. inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* for a period of 25 days. In addition, an ionomic approach and a fine comparative proteomic analysis (+Si *versus* -Si) that distinguished the two nodule symbionts were carried out to decipher the beneficial effects of Si on nodulation efficiency and N_2-fixing capacity in particular.

2.3.3 Materials and methods

2.3.4 Plant growth conditions and experimental design

The experimental design is summarized in Figure 2.16. Seeds of *Trifolium incarnatum* L. were germinated on perlite over deionized water [Génard *et al.*, 2017a] for four days in the dark in a greenhouse. When the first leaves emerged, seedlings were transferred to natural light conditions and supplied for one and a half weeks with nutrient solution containing : KNO_3 (1 mM), KH_2PO_4 (0.25 mM), KCl (1 mM), $CaCl_2$ (3 mM), $MgSO_4$ (0.5 mM), EDTA-2NaFe (0.2 mM), H_3BO_3 (14 μM), $MnSO_4$ (5 μM), $ZnSO_4$ (3 μM), $CuSO_4$ (0.7 μM), $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (0.7 μM), $CoCl_2$ (0.1 μM). Then, the seedlings were transplanted into hydroponics tanks (20 L, nine plants per tank) containing the nutrient solution described above and inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* (strain T354, MSDJ1056) [Génard *et al.*, 2017b, Mazurier, 1989] previously grown in YEM liquid medium [Gulati, 1979] for 72 h. After two weeks (D0), when plants are sufficiently developed and nodulated, inorganic N (KNO_3) source was removed in the nutrient solution to so that plants only use atmospheric N and separated into two sets : the first set (+Si) corresponded to plants fed with 1.7 mM of Na_2SIO_3 for 25 days (D25). The second sets corresponded to plants not supplied with silicon (-Si) for 25 days. To compensate for the sodium provided by the Si in the first set, this second set was fed with the nutrient solution described above, supplemented with 3.4 mM NaCl. Throughout the culture duration, light was supplied by high pressure sodium lamps (Philips, MASTER GreenPower T400W) with photosynthetically active radiation of 450 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} at canopy height. Nutrient solutions, continuously aerated with a compressed air bubbling system, were replaced every three days. The pH of the nutrient solution was monitored each day and adjusted if necessary to 5.8 $\pm$ 0.2. At each solution renewal, 10 mL of medium containing *Rhizobium leguminosarum bv*

trifolii (T354) was added to each tank.

At D0 and D25, plants were harvested, the nodules were counted, manually separated from roots, weighed and frozen at -80°C. In addition, shoots and roots were separated and weighed. Subsequently, an aliquot of each plant compartment was placed in liquid nitrogen and stored at -80 °C and the rest was dried at 60°C for 72h. After dry weight (DW) determination, samples were ground to perform the elemental analyses.

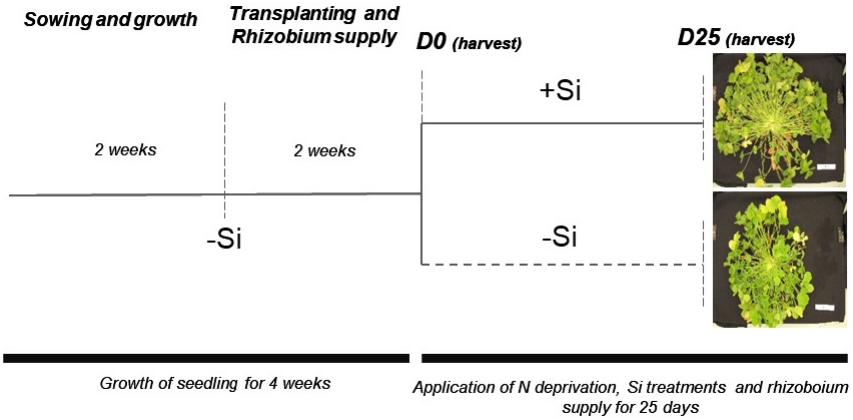


FIGURE2.16 – Experimental design used to study the effect of silicon supply on *Trifolium incarnatum* L. grown without nitrogen. After four weeks of cultivation with nitrogen (1mM), plants were N-deprived and separated into two batches (D0) : the full line and the dotted line corresponded to plants supplied with (+Si; 1.7 mM) or without (-Si) silicon for 25 days (D25), respectively.

Determination of macro- and microelements concentrations and N amount derived from the atmosphere

To determine the total N concentration, 1.5 mg of each dried powder was precisely weighed and placed into tin capsules before analysis with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Horizon, NU Instruments, Wrexham, UK) linked to a C/N/S analyser (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). The total N amount (Ntot) in each organ or in the whole plant was calculated as :

$$Ntot = \frac{\%N\ x\ DW(or\ FW)}{100}$$

In addition, the N amount derived from the atmosphere (*Natm*) during the period was calculated as :

$$Natm = Ntot\ at\ D25\ -\ Ntot\ at\ D0$$

The N concentration in nodules (n=5) has been estimated by dividing the protein concentration in the nodules (see below) by the conversion factor 6.25

[Marks *et al.*, 1985]. For total Si concentration determination, approximately 1 g of the ground dry root or shoot sample was analysed with an X-ray-fluorescence spectrometer (XEPOS, Ametek, Berwyn, PA, USA) using calibration curves obtained from international standards. The other macroelement (magnesium : Mg, phosphorus : P, sulfur : S, potassium : K and calcium Ca) and microelement (copper : Cu; molybdenum : Mo, iron : Fe, zinc : Zn; boron : B and cobalt : Co) concentrations were quantified in nodules from 40 mg of fresh powder previously subjected to mineralization before analysis using high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR-ICP-MS, Element 2^{TM}, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) as previously described by Maillard et *al.* (2016) [Maillard *et al.*, 2016b]. Briefly, fresh nodules previously powdered using a mortar containing liquid nitrogen were subjected to microwave acid sample digestion (Multiwave ECO, Anton Paar, les Ulis, France) with 1 mL of concentrated nitric acid (HNO_3), 250 μL of H_2O_2, 900 μL of ultrapure water and 10 μL of internal standard of gallium (10 μg L1) and rhodium (2 μg L^1). Digested samples were diluted with ultrapure water to obtain a 2.0% (v/v) solution of HNO_3 before filtration through a 0.45 μm Teflon filter. Quantification of each element was performed from calibration curves after being corrected from the recovery rate by subtracting the blank and using internal standards (Ga and Rh). The quality of mineralization and quantification was evaluated using certified reference plant material (Citrus leaves, CRM NCS ZC73018, Skylab, Metz, France). For each element, the amount in nodules was calculated by multiplying the concentration by the fresh nodule biomass.

Proteins analysis :

Extraction and quantification of proteins from nodules Total proteins were extracted from nodules using the protocol previously described by Varin et al. (2010) [Varin *et al.*, 2010]. Briefly, freshly isolated nodules were ground in liquid nitrogen in a mortar. Approximately 30 mg of powder was mixed in 2 mL of cold acetone containing 10% trichloroacetic acid (w/v) and centrifuged at 16,000 g (4 min at 4 °C). The supernatant was then removed and the pellet was resuspended with 1.75 mL of ammonium acetate (0.1 M)/methanol (80%) buffer to precipitate the proteins. After centrifugation at 16,000 g (3 min at 4 °C), the supernatant was removed and the pellet was washed with 1 mL of acetone (80%) and centrifuged again. The resulting pellet was resuspended with 800 μL of phenol (pH 8) and 800 μL of sodium dodecyl sulfate (SDS) buffer [30% saccharose (w/v), 2% SDS (w/v), 0.1 M TRIS-HCl (w/v), 0.5% β-mercaptoethanol (v/v), pH 8] then centrifuged at 16,000 g (10 min at 4 °C). The upper phenolic phase was recovered and 800 μL of ammonium acetate (0.1 M)/methanol (80%) buffer was added. After storing overnight at -20 °C, the mixture was centrifuged at 16,000 g (10 min at 4 °C). Then, the pellet was washed with 1 mL of methanol (100%) and after centrifugation at 16,000 g (10 min at 4 °C) it was washed a second time with 1 mL of acetone (80%). The pellet was resuspended with a buffer containing

dithiothreitol (DTT, 11.11 mM), thiourea (2.22 M), urea (6.66 M) and Tris buffer 2 M (33.33 mM) and used for the determination of the protein concentration using the Bradford method [Bradford, 1976].

Quantification of nitrogenase abundance in nodules The abundance of nitrogenase in nodules was determined after Western blotting of 20 μg of total proteins extracted from isolated nodules previously separated by SDS-PAGE (12% polyacrylamide gels at a constant current : 250 V, 75 mA, 1 h). Western blots were carried out as recently described by Coquerel et al. (2023) [Coquerel *et al.*, 2023]. Briefly, after Western blotting, PVDF membrane was incubated overnight with chicken polyclonal anti-nitrogenase (NifH) from IgG antibodies (Agrisera, SE 911, Vanadas, Sweden; dilution 1 :2000). Subsequently, the PVDF membrane was washed four times with TBST (Tris-base 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8, 0.1% Tween 20) before incubation with secondary antibody (rabbit anti chicken immunoglobin Y coupled to alkaline phosphatase; dilution 1 :6000) for 1 h. The nitrogenaseantibody complex was revealed using a Bio-Rad alkaline phosphatase kit as a single signal at a molecular weight of between 25 and 37 kDa. Western blots were scanned and analysed using a Millipore Bioimage computerized image analysis system to determine the intensity of signal (U.A.) that was proportional to the nitrogenase abundance in each nodule sample. The nodule nitrogenase concentration (U.A. g^1 FW) was calculated by dividing the intensity value by the fresh nodule biomass (20 μg). Then the total abundance of nitrogenase in all the nodules of one plant was estimated by multiplying the nitrogenase concentration by total nodule biomass. The nitrogenase abundance at D25 was expressed relative to the nitrogenase abundance determined at D0 (100%).

Proteomic mass spectrometry sample preparation and protein identification Five μg of each nodule protein extract were prepared using the modified gel-aided sample preparation protocol described by Fischer and Kessler (2015) [Fischer et Kessler, 2015]. Samples were digested with trypsin/Lys-C overnight at 37°C. For nano-LC fragmentation, peptide samples were first desalted and concentrated onto a μC18 Omix (Agilent, Santa Clara, USA) before analysis. The chromatography step was performed on a NanoElute (Bruker Daltonics, Massachusetts, USA) ultra-high-pressure nano flow chromatography system. Approximatively 50 ng of each peptide sample were concentrated onto a C18 pepmap 100 (5 mm x 300 μm *i.d.*) precolumn (Thermo Scientific, Dreieich, Germany) and separated at 50°C onto a reversed phase Reprosil column (25 cm x 75 m i.d.) packed with 1.6 μm C18 coated porous silica beads (Ionopticks). Mobile phases consisted of 0.1% formic acid, 99.9% water (v/v) (A) and 0.1% formic acid in 99.9% ACN (v/v) (B). The nanoflow rate was set at 300 nl/min, and the gradient profile was as follows : from 2 to 15% B within 15 min, followed by a second increase to 25% B within 15 min and a third one to 37% B within 5 min and final to 95% within 7 min and re-equilibration. MS experiments were carried out on a TIMS-TOF pro mass spectrometer (Bruker Daltonics, Massachusetts,

USA) with a modified nano electrospray ion source (CaptiveSpray, Bruker Daltonics, Massachusetts, USA). A 1400 spray voltage with a capillary temperature of 180°C was typically employed for ionizing. MS spectra were acquired in the positive mode in the mass range from 100 to 1700 m/z and a 0.75 to 1.30 1/k0 window. In the experiments described here, the mass spectrometer was operated in PASEF DIA mode with exclusion of single charged peptides. The DIA acquisition scheme consisted of 24 variable windows ranging from 300 to 1000 m/z. Database searching and LFQ quantification (using XIC) were performed using DIA-NN (version 1.6.2) [Demichev *et al.*, 2020]. Updated UniProt *Rhizobium leguminosarum* and *Trifolium repens* databases were used for library-free search generation. For RT prediction and extraction mass accuracy, we used the default parameter 0.0, which means DIA-NN performed automatic mass and RT correction. The top six fragments (ranked by their library intensities) were used for peptide identification and quantification. The variable modifications allowed were as follows : Nterminal-acetylation and oxidation (M). In addition, C-propionoamide was set as a fixed modification. Trypsin/P was selected. Data were filtered according to a False Discovery Rate (FDR) of 1%. Cross-run normalization was performed using RT-dependent.

Identification and GO enrichment analysis of differentially accumulated proteins

To quantify the abundance of differentially accumulated proteins (DAPs) under Si supply, data from DIA-NN were then analysed using the DEP package from R. Briefly, proteins that were identified in two out of three replicates of at least one condition were filtered, missing data were input from Perseus software using a normal distribution, and differential enrichment analysis was based on linear models and empirical Bayes statistics. The dataset was subjected to analysis of variance (Anova) using Perseus. To determine DAPs, a 1.5-fold variation in the relative abundance (Fold-Change; FC) and a 0.05 FDR from multiple-sample tests or 0.01 p-value from two-sample tests were used. All these proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium [Perez-Riverol *et al.*, 2022] *via* the PRIDE partner repository with the data-set identifier IPX0008420001. Gene Ontology (GO) enrichment analysis for *Trifolium* DAPs was initially performed using ShinyGO (version V.08; [Ge *et al.*, 2020]) based on the Ensemble Plants gene ID (Ensembl Release 104, archived on Jan. 5, 2024) and then ReviGO (version 1.8.1; [Supek *et al.*, 2011]) based on the Gene Ontology database (go.obo; January 17, 2024) and the UniProt-to-GO mapping database from the EBI GOA project (goa_uniprot_gcrp.gaf.gz; February 9, 2024) to summarize enriched GO by removing redundant terms (medium allowed similarity). Since no GO enrichment analysis software could be found for *Rhizobium leguminosarum*, ClueGO (version 2.5.10; Jun 21, 2023; [Bindea *et al.*, 2009]), which is based on *Rhizobium leguminosarum* GO annotation (release of July 7, 2019), was used to create functionally grouped GO term networks using Kappa statistics (Kappa Score=0.4).

Statistical Analysis

All data are indicated as the mean ± S.E (n=10 for plant samples, n=5 for nodule samples and n=3 for proteomic analysis). Statistical analyses were performed using R software (version 4.2.0 : R Core Team, 2022). Significant differences between harvest dates and treatments were determined using Student's t-test.

2.3.5 Results

Effect of Si supply on growth, total N and Si amounts of Trifolium incarnatum cultivated under N-deprivation

Regardless of the Si treatment (-Si or +Si), after 25 days both plants showed significantly higher root and shoot biomasses than plants harvested at D0. In addition, the total biomass of +Si plants was significantly higher than this of -Si plants. This increase can be explained by a rise in shoot biomass (15.70 ± 1.78 g and 11.93 ± 0.87 g for +Si and -Si plants, respectively) (Figure 2.17A). As expected, the addition of Si to the nutrient solution led to a significant 5- and 8-fold increase in the Si amounts in shoots and roots, respectively. This resulted in a Si accumulation in +Si whole plants of about 4.5-fold relative to control plants (-Si; Figure 2.17B). A Si supply between D0 and D25 led to a significant increase in the N amount (from 206 ± 19 mg to 293 ± 12 mg) in +Si plants, while no difference was observed in -Si plants (Figure 2.17C). This increase in the amount of N in +Si plants is due to an enhanced capacity to fix atmospheric dinitrogen (N_2), which was highlighted by the difference in the N amounts in whole plants between D0 and D25 (Figure 2.17D).

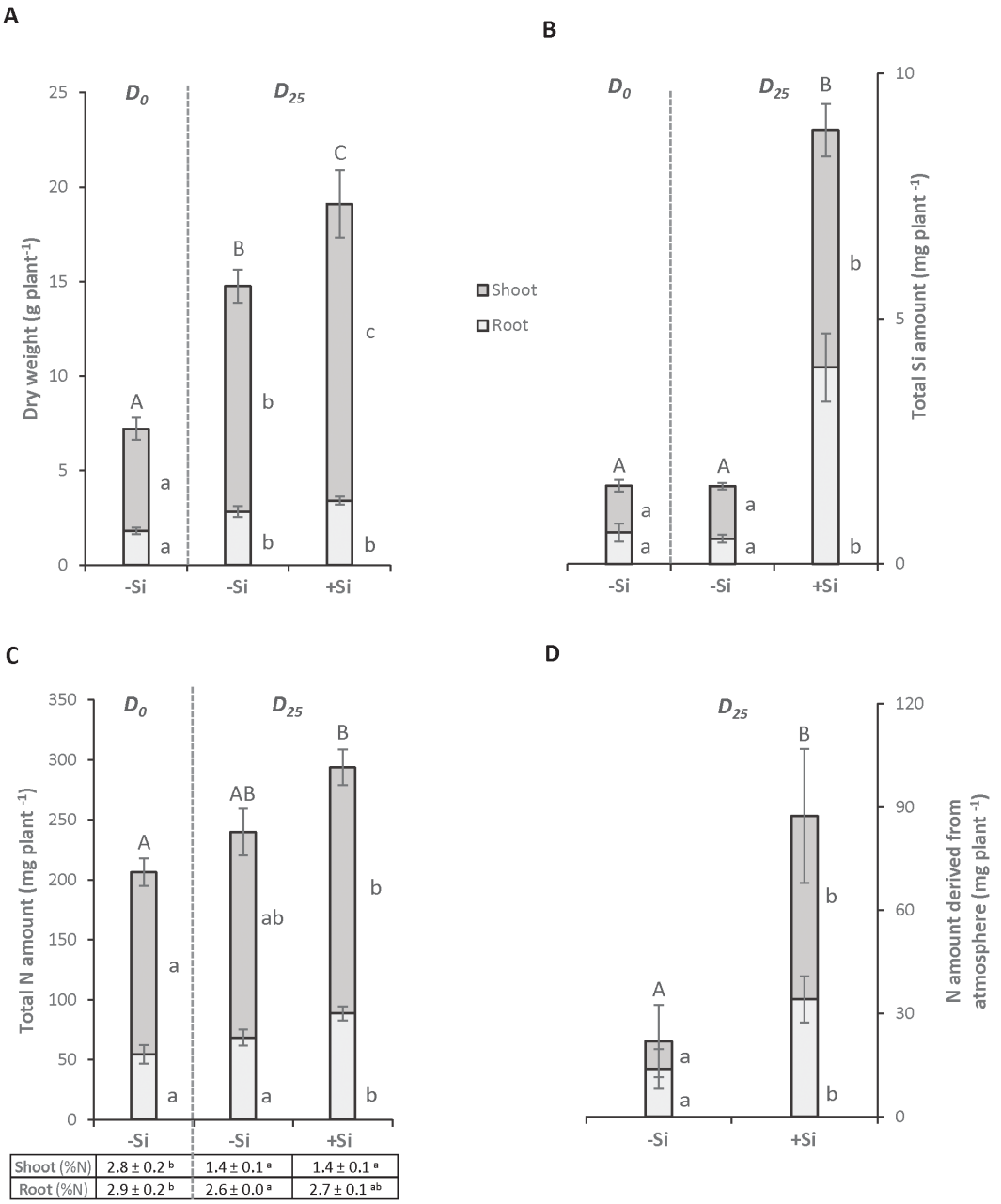


FIGURE2.17 – Total dry weight **(A)**, total Si **(B)** and total N amounts **(C)** in *Trifolium incarnatum* L. plants grown with (+Si; 1.7 mM) or without (-Si; 0 mM) silicon for 25 days (D0 to D25). The total N amount derived from the atmosphere **(D)** is calculated by subtracting the total amount of N in the plants at D25 and D0. Different letters indicate that the mean (±S.E.) obtained for each parameter for the whole plant (uppercase letters) or for each compartment (lowercase letters) is significantly different ($p < 0.05$).

Effect of Si supply on nodules parameters

Compared with D0, -Si plants did not affect nodule parameters (total number per plant, density and biomass) or their relative nitrogenase abundance (Table 2.1). Compared with -Si plants, by D25 the supply of Si (+Si) had increased the total number

of nodules per plant (by about 2.3-fold, from 1469± 252 to 3402 ± 339), nodule root density (by about 1.5-fold, from 64 ± 8 to 84 ± 5 nodule. g^{-1} of FW root) and the nodules relative nitrogenase abundance (by about 2.2-fold, from 136 ± 1 to 303 ± 20 %) (Table 2.1). Composition analysis of the macroelements (S, P, K, N, Ca and Mg) and microelements (Cu, Mo, Fe, Zn, Mn, B and Co) in nodules revealed that supplying Si was associated with a significant increase in total amount of S, P, K Cu, Mo, Zn and B without changing their concentration (Figure 2.18 and Supplemental Table 2.2). An increase in both the total N amount (from 0.62 ± 0.02 to 1.23 ± 0.12 μg. $nodule^{-1}$) and its concentration (from 189.8 ± 8.5 to 324.4 ± 36.5 μg. g^{-1} of nodule FW) was observed in nodules of +Si treated plants compared to -Si plants. For the other macroelements (Ca and Mg) and microelements (Fe, Mn and Co), the total amount in nodules remained similar, regardless the Si treatment (Figure 2.18 and Supplemental Table 2.2).

TABLEAU2.1 – Changes in the number, biomass, density and relative abundance of nitrogenase in nodules of *Trifolium incarnatum* L. supplied (+Si) or not supplied (-Si) with Si (D0 to D25). Values are means ± SE *(n=5)*. Different letters indicate significant differences between harvest dates (D0 and D25) and treatments ($p < 0.05$).

		Number of nodules (nodules.plant^{-1})	Biomass of a single nodule (mg FW. nodule^{-1})	Nodule density (nodule.g^{-1} of FW root)	Relative abundance of nitrogenase in nodule (%)
D_0	-Si	*1461.97 (± 273)* ***a***	*1.59 (± 0.11)* ***a***	*66.15 (± 14.61)* ***a***	*100 (± 34.22)* ***a***
D_{25}	-Si	*1469.07 (± 252)* ***a***	*1.75 (± 0.14)* ***a***	*64.05 (± 8.25)* ***a***	*136.08 (± 1.53)* ***a***
	+Si	*3402.76 (± 339)* ***b***	*2.61 (± 0.24)* ***b***	*84.57 (± 4.87)* ***b***	*303.37 (± 20.62)* ***b***

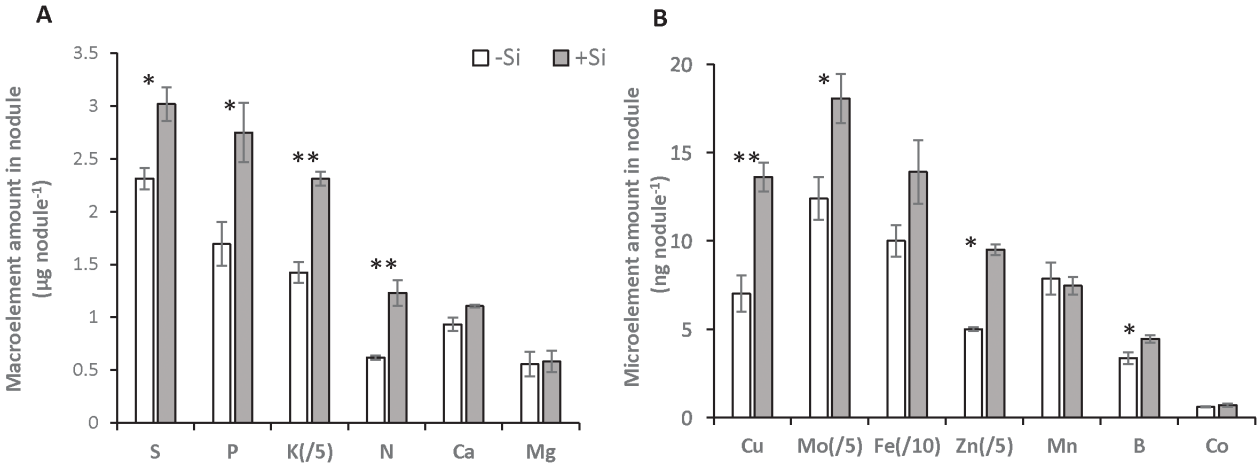


FIGURE2.18 – Macroelement **(A)** and microelement **(B)** amounts in nodules from *Trifolium incarnatum* L. plants grown with (+Si ; 1.7 mM) or without (-Si ; 0 mM) silicon for 25 days. The amount of Fe is divided by 10 and the amounts of K, Mo and Zn are divided by 5. Asterisks indicate that means ± S.E. (n=4) obtained for one element are significantly different between both Si treatments (* : $p < 0.05$ and ** : $p < 0.01$).

Effect of Si supply on the whole-nodule proteome

In order to better understand the impact of Si supply on the nodule proteome at D25, proteins were identified in nodules of -Si and +Si plants. Among the 8499 proteins identified, 7299 (i.e. 85,8%) accumulated to similar levels irrespective of the Si treatment, and 1200 were significantly modulated in +Si plants compared to control (-Si) plants (Figure 2.19). Thus, 14.2% of the identified proteins corresponded to proteins that were differentially accumulated (DAPs) between +Si and -Si. Among these DAPs, 323 and 877 were up- and down-accumulated by the Si supply, respectively (Figure 2.19). In order to refine this global proteomic analysis, the nodule proteins belonging to the host root cells of *Trifolium incarnatum* L. were distinguished from those belonging to the bacteria (*Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii)*. Thus, of the 8499 proteins identified in the nodules, 6993 (*i.e.* 82.3%) were tagged as proteins of host root cells (Figure 2.20) and 1506 (*i.e.* 17.7%) were labelled as proteins of the bacteria (Figure 2.22).

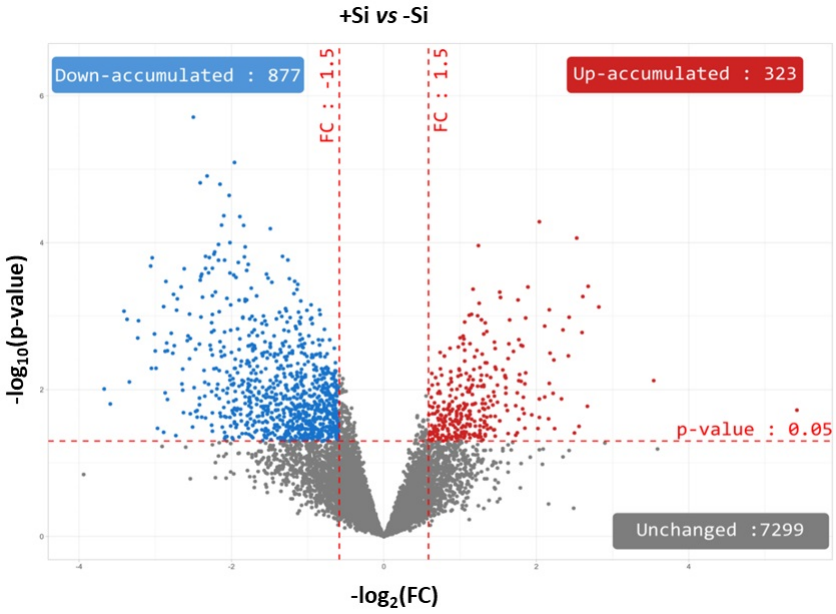


FIGURE2.19 – Volcano plots representing all proteins identified in nodules of *Trifolium incarnatum* L. supplied (+Si) or not (-Si) with Si for 25 days. The *X*-axis indicates the $\log_2$FoldChange (FC) and the *Y*-axis specifies the $-\log_{10}$(p-value) of all nodule proteins identified. All proteins with a FC > 1.5 or < -1.5 and a *p*-value < 0.05 are considered as differentially accumulated proteins (DAPs) in response to Si supply. Proteins with unchanged accumulation are shown as grey dots and up- and down-accumulated proteins are indicated by red and blue dots, respectively.

Effect of Si supply on proteome of host root cells

Of the 6993 nodular proteins belonging to host root cells, 6005 had a similar abundance regardless of the Si treatment and 988 were differentially accumulated in response to Si supply (+Si *vs* -Si). Of these DAPs, 708 (*i.e.* 78% of DAPs) were down-accumulated and 280 (*i.e.* 22% of DAPs) were up-accumulated in response to Si supply (Figure 2.20). The GO enrichment analysis of these 988 detected DAPs revealed that 711 GO terms were significantly enriched, including 373 related to biological process (BP), 216 to molecular function (MF) and 122 to cellular component (CC) categories . The top 10 of each of the GO categories (BP, MF and CC) are shown in Figure 2.21. For BP, the most enriched GO terms were primarily related to N compound metabolism (GO :19701566, GO :0006518, GO :0043043, GO :0043603, GO :0043604), but also to small molecule metabolic process (GO :0044281), cellular macromolecule biosynthetic process (GO :0034645), oxoacid metabolic process (GO :0043436) and organic acid metabolic process (GO :0006082). With regard to MF, the most enriched GO terms were mainly related to nucleotide binding (GO :0032553, GO :0000166, GO :19011265, GO :0017076, GO :0032555, GO :0035639) and translation (GO :0006412, GO :0045182 and GO :000135) but also small molecule binding (GO :0036094) and anion binding (GO :0043168). Finally,

for CC, the main enriched GO terms were related to membrane- and non-membrane-bounded organelle (GO :0043227 and GO :0043228), intracellular-membrane- and non-membrane-bounded organelle (GO :0043231 and GO :0043231), cytoplasm (GO :005737), ribosome (GO :0005840), nucleus (GO :0005634), protein-containing complex (GO :0032991 and GO :0140535) and eukaryotic translation initiation factor 3 complex (GO :0005852).

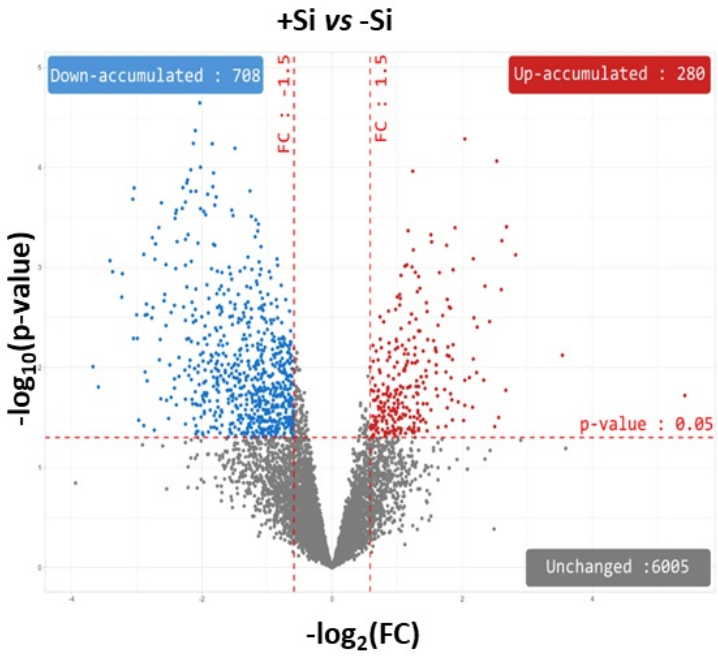


FIGURE2.20 – Volcano plots representing all proteins belonging to host root cells identified in nodules. The *X*-axis indicates the $\log_2$FoldChange (FC) and the *Y*-axis specifies the $-\log_{10}$(p-value) of identified proteins. All proteins with a FC > 1.5 or < -1.5 and a p-value < 0.05 are considered as differentially accumulated proteins (DAPs) in response to Si supply (+Si *versus* control -Si). Proteins with unchanged accumulation are shown as grey dots and up- and down-accumulated DAPs are indicated by red and blue dots, respectively.



FIGURE2.21 – Top ten enriched GO terms from the GO enrichment analysis of nodule DAPs belonging to host root cells. Yellow, green and red areas indicate biological process (BP), molecular function (MF) and cellular component (CC) categories, respectively. The y-axis indicates the number of up- (red) or down-accumulated (blue) DAPs in each GO term. The numbers beside each histogram correspond to an FDR calculated based on a nominal *p*-value. For each GO category (BP, MF or CC), enriched GO terms are ranked according to increasing FDR values.

Effect of Si supply on proteome of host bacteria

Among the 1506 nodular proteins belonging to the bacteria (*Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*), 1294 had a similar accumulation irrespective of the Si treatment and 212 were differentially accumulated in response to Si. Among these DAPs, 169 and 43 were down- and up-accumulated in response to Si, respectively (Figure 2.22). Because the usual enrichment analysis tools (such as Shiny GO) do not allow GO enrichment analysis for *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* proteins, a GO term was assigned to each protein before they were clustered into functional groups for each category (BP, MF and CC) using ClueGO software (Figure 2.23). Regarding BP, most of the DAPs (63.47%) were assigned to functional groups related to translation (20.51%), oxidoreductase process (18.92% including oxidoreductase activity and cell redox homeostasis), organonitrogen compound biosynthetic process (17.63%) and protein histidine kinase activity (6.41%). For the MF category, most of the DAPs (82.67%) were assigned to ion binding (46.92% including anion binding (26.92%), zinc ion binding (17.69%) and magnesium ion binding (2.31%)), oxidoreductase activity (10.37%), tRNA binding (8.46%), protein histidine kinase activity (8.46%) and ion transmembrane transporter activity (8.46%). Finally, for the CC category, 71.11%, 20.0% and 8.89% of DAPs were assigned to cytoplasm, ribosome and cell envelop, respectively (Figure 2.23).

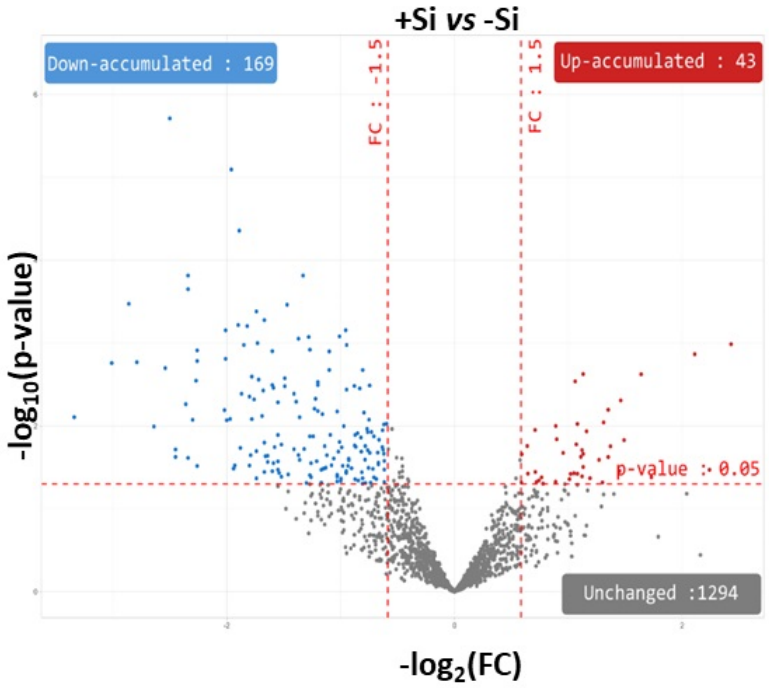


FIGURE2.22 – Volcano plots representing all proteins identified in nodules and belonging to bacteria. The *X*-axis indicates the log_2FoldChange (FC) and the *Y*-axis specifies the -log_{10}(p-value) of identified proteins. All proteins with a FC > 1.5 or < -1.5 and a p-value < 0.05 are considered as differentially accumulated proteins (DAPs) in response to Si supply (+Si *versus* control -Si). Proteins with unchanged accumulation are shown as grey dots and up- and down-accumulated proteins are indicated by red and blue dots, respectively.

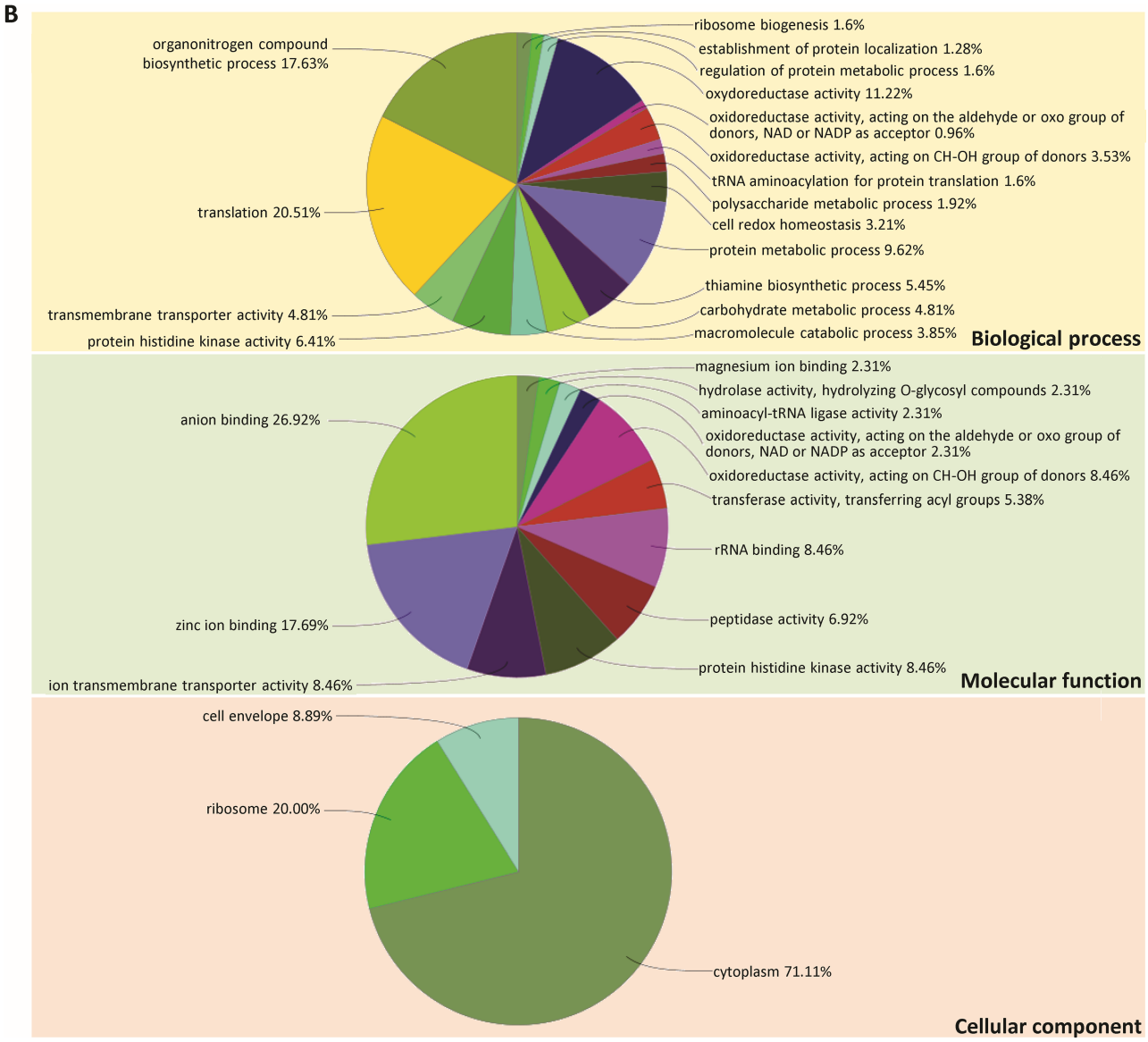


FIGURE2.23 – Bacterial DAPs were grouped into GO term networks according to their kappa scores.

2.3.6 Discussion

The aim of this study was to decipher the effects of silicon supply on the nodulation and N_2 fixation capacity of *Trifolium incarnatum* L. grown in the presence of N_2 as

the sole N source. In -Si plants, the shoot and root biomass at D25 was increase compared to D0 plants, while the total amount of N was not significantly different. This result suggests that the amount of N derived from N_2 fixation during the period (21.5 mg plant^{-1}) is sufficient to sustain the growth of plants (Figure 2.17). This finding is consistent with maintenance of the number, biomass, and density of nodules as well as their nitrogenase abundance in Si plants after 25 days (D25) compared with D0 plants (Table 2.1). This absence of change in nodulation parameters agrees with a recent study reporting that soybean cultivated with a nutrient solution without N for 25 days had numbers of nodules and a nodule biomass similar to plants fed with 2 mM nitrate [Ke *et al.*, 2024]. In contrast, +Si plants possessed nodules that were bigger, more numerous and contained higher levels of nitrogenase than -Si plants, leading to an increase in their total N supply due to a sharp rise in their atmospheric N_2 fixation capacity (from 21.5 to 87.5mg. plant^{-1}). All this contributed to improving the growth of +Si plants compared with -Si plants (Figure 2.17 and Table 2.1). Taken together, these results highlight the beneficial effect of Si supply on plants, improving nodulation, N_2 fixation capacity and growth. These results are consistent with studies in numerous legume species where supplying Si enhanced the number and size of root nodules as well as the nodules' N_2 fixation capacity, and improved growth under biotic [Putra *et al.*, 2022] and other abiotic stresses [El Moukhtari *et al.*, 2024, Coquerel *et al.*, 2023, El Moukhtari *et al.*, 2022c]. In the current study, more refined analyses were carried out to better understand the beneficial effects of Si supply. Ionomic analysis highlighted that supplying Si leads to an increase in several macroelements (such as P and K) and microelements (such as Cu, Zn and B) amounts in nodules (Figure 2.18). Independently, all of these elements are known to have positive effects on nodulation and N_2 fixation in nodules. As an example, some studies have reported that accumulation of metals such as Cu or Zn but also macroelements like K and P increases the level of N_2 fixation and the amount of N in plant tissue [Shukla et Yadav, 1982, Premaratne et Oertli, 1994, González-Guerrero *et al.*, 2014, Yao *et al.*, 2022]. Moreover, B has been shown to be an important microelement in facilitating establishment of the symbiosis between root cells and bacteria [Bolanos *et al.*, 1996]. From the present study it may be suggested that macroelements and microelements, whose quantities increased in nodules, may act individually or synergistically to improve nodulation efficiency (Table 2.1) and/or the N_2-fixing capacity (Figure 2.17D) of +Si plants, consequently increasing the N amount in nodules (Figure 2.18A) as well as whole +Si plants (Figure 2.17C).

The proteomic analysis carried out during this study enabled identification of a total of 8499 proteins in the nodules, of which 6993 (82.3%) belonged to the host root cells of *Trifolium incarnatum* L. and 1506 (*i.e.* 17.7%) belonged to the bacteria (Figures 2.20A and 2.22A). This representativeness of both proteomes in nodules is consistent with results reported for nodules of *Medicago truncatula* [Thal *et al.*, 2018]. Comparative analysis of the proteomes from nodules of +Si and -Si plants (+Si *versus* -Si; control) revealed that Si supply modulates the proteomes of both host root cells and bacteria because 788 (280 up and 708 down) and 212 (43 up and 169 down)

DAPs belonged to the host root cells and bacteria, respectively (Figures 2.20A and 2.22A). The GO enrichment analysis with the 788 DAPs from host root cell revealed a large number of GO terms that were significantly enriched (373, 216 and 122 for BP, MF and CC categories, respectively). Despite this wide dispersion, it is noteworthy that the most enriched GO terms in the BP and MF categories were related to the synthesis of organic nitrogen compounds, amides and peptides (Figure 2.21B). These results are in line with the increase in the amount of N in nodules (Figures 2.18A) but also with previous studies reporting that peptides (such as CLE peptides) and amides (asparagine in particular) are able to enhance the growth and activity of nodules [Sulieman et Tran, 2013]. For the CC Go category, one of the most enriched terms was related to "organelle bound" suggesting that some DAPs could be associated with the symbiosome membrane, which is defined as a physical barrier controlled by the plant that regulates ions and organic compounds exchanges between the symbionts [Clarke *et al.*, 2014]. Among transporters identified in this membrane, the ABC transporter family is known to participate in the transfer of ions (such as Mo and Mn) and amino acids from the cytoplasm of host root cells to the symbiosome [Udvardi et Poole, 2013]. However, in this study we identified 15 members of the ABC transporter family that are all down-accumulated by Si (Supplemental Table 2.3). In the literature, ABC transporters are well known to be upregulated in response to numerous biotic and abiotic stresses (such as salinity, drought and nutrient deficiency) [Li *et al.*, 2021, Kou *et al.*, 2024]. In our study, it is possible that the difference in ABC transporter accumulation can be explained by stress attenuation by Si supply , as reported in many studies [Haddad *et al.*, 2018, Ali *et al.*, 2020, Araújo *et al.*, 2022]. More interestingly, an increase in the total S amount in nodules was observed in our study and proteome analysis revealed an accumulation of the SULTR3.5 transporter (A0A2K3KYJ1, Figure 2.24). This SULTR3.5 transporter is a homologue of the SST1 transporter known to be located in the symbiosome membrane that ensures the transport of sulfate from the cytoplasm of the host root cell to the symbiosome [Schneider *et al.*, 2019]. As previously described in *Trifolium repens* [Varin *et al.*, 2010], the increase in the amount of S in the nodule (Figure 2.18) and its possible transport *via* the SULTR3.5 transporter could explain the increase in nitrogenase abundance observed in +Si plant nodules (Table 2.1). In addition, because an earlier study reported that sulfate transporters are also able to transport Mo [Maillard *et al.*, 2016b], it cannot be excluded that the SULTR3.5 transporter could be also involved in transporting Mo to the symbiosome. Notably, many studies have reported that Mo and S are both crucial elements for the synthesis of three metal prosthetic groups ([4Fe-4S], P-cluster and FeMo-co) required for synthesis and activity of the nitrogenase complex in bacteria [Schneider *et al.*, 2019, Lilay *et al.*, 2024]. This assumption is supported by the up-accumulation of an iron-sulfur cluster carrier protein named NBP35 (A0A3E1BX74, Figure 2.24), which is involved in the biogenesis of the FeMo-co cofactor [Pardoux *et al.*, 2019]. In addition, proteome analysis of the bacteria revealed an accumulation of FixC and NfeD proteins (A0A3E1AXW9 and A0A3E1BEN0, Figure 2.24), known to provide the reducing power required

for nitrogenase functioning [Garcia Costas *et al.*, 2017, Del Cerro *et al.*, 2019] and associated with nodulation efficiency [García-Rodríguez et Toro, 2000], respectively. Taken together, these data are consistent with the enhanced nitrogenase abundance and nitrogen-fixing capacity observed in nodules of +Si plants (Table 2.1 and Figure 2.17D), leading to high ammonia production, which could be assimilated via two pathways. Firstly, a portion of the ammonia could be directly assimilated by glutamine synthase (A0A3E1BV33, Figure 2.24), which is up-accumulated in the cytoplasm of the bacteria. Since glutamate synthase (GltS, A0A3E1BE74) is down-accumulated in the bacteria of nodules in +Si plants, it can be assumed that in this condition, glutamine is either used directly for bacterial protein synthesis or exported to the cytoplasm of the host root cells. The second and most classical pathway described in the literature [Udvardi et Poole, 2013] consists of exporting ammonia to the symbiosome space, where its protonation to ammonium might be facilitated by the high concentration of H^+ observed to be accumulated under +Si conditions by the ATPAse H^+ pump (A0A2K3LQ89, Figure 2.24) located in the symbiosome membrane. Finally, ammonium exported to the cytoplasm of host root cells can be assimilated into glutamine by the cytoplasmic glutamine synthase (A0A2K3MBR2, Figure 2.24), which is also up-accumulated in response to Si. All these results are consistent with the increase in glutamine content observed in nodules of *Medicago truncatula* treated with Si [Putra *et al.*, 2021, Putra *et al.*, 2022], and could explain the significant increase in the amount of N in the nodules of +Si plants, as shown in our study (Figure 2.18).

This study demonstrates that Si supply increases the nodulation and N_2-fixation capacity of *Trifolium incarnatum* L. By combining multilevel approaches such as physiological, ionomic and proteomic approaches focused on the nodule, this work provides new insight on the effects of Si and paves the way for a better understanding of the impact of Si on improving nodule function, and more specifically, on the N_2-fixing capacity of nodules. For the first time, the proteomic approach distinguished between the effects of Si on both symbionts (*i.e.* host root cells and bacteria) and provided a new dataset on the DAPs present in the two nodule partners, which is now available to the scientific community working on Si as well as those seeking to improve the agronomic performance of the Fabaceae.

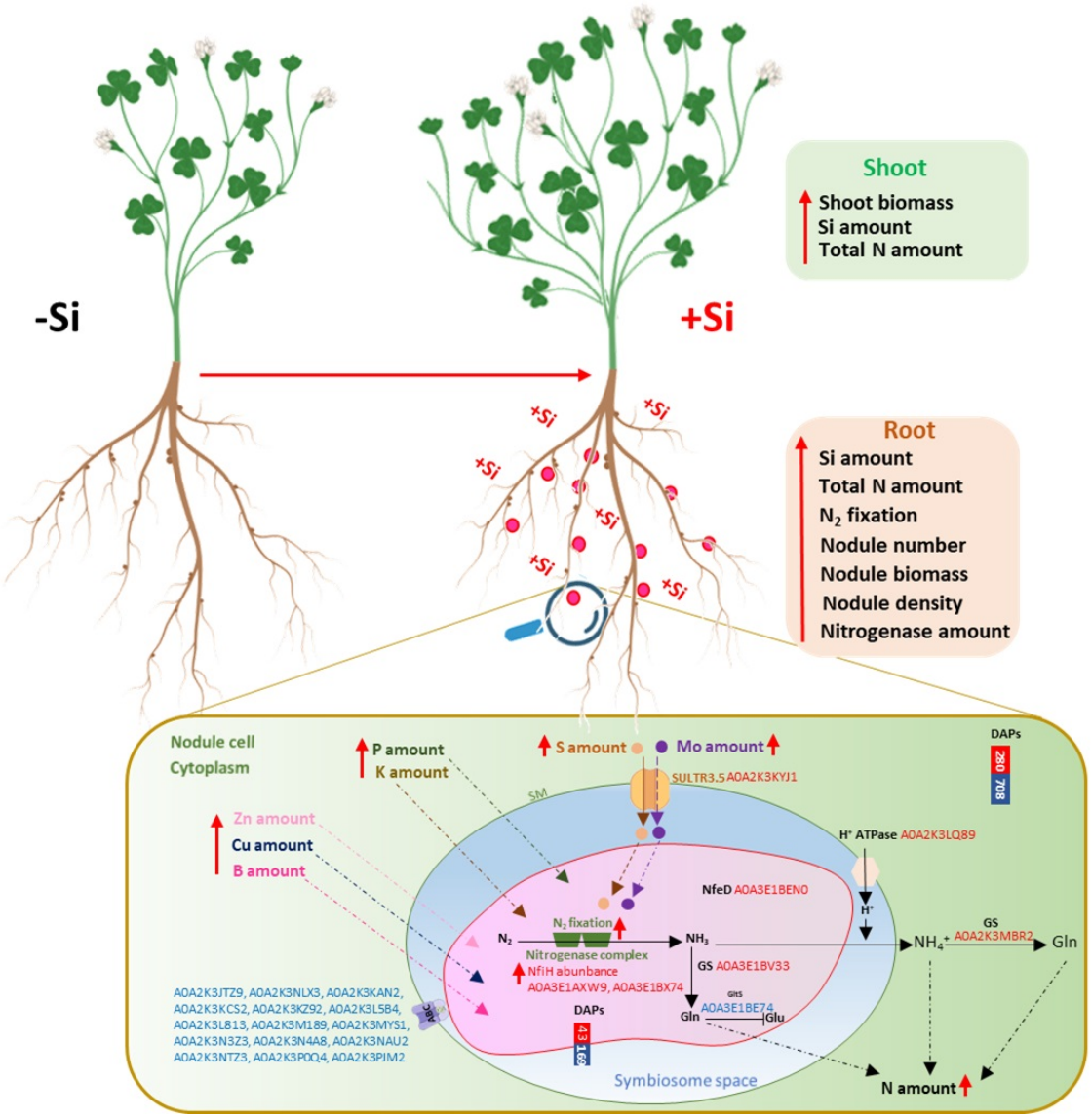


FIGURE2.24 – Summary diagram of the main effects of the Si supply on plant growth and nodule parameters in *Trifolium incarnatum* L. Red arrows indicate an increase in the parameters measured in this study. Red and blue Uniprot IDs (supplemental data SD1) correspond to proteins that are up- and down-accumulated in response to Si supply, respectively. The enlargement corresponds to nodules including host root cells of *Trifolium incarnatum* L. and the symbiosome including bacteria (*Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*). ABC : ABC transporter cassette, DAPs : differentially accumulated proteins (up- and down-accumulated in red and blue, respectively), GS : glutamine synthase, GltS : glutamate synthase, Gln : glutamate, Glu : glutamine, NifH : iron protein subunit of the bacterial Fe-Mo-co type nitrogenase, NfeD : protein involved in nodulation efficiency [García-Rodríguez et Toro, 2000], SM : symbiosome membrane, SULTR3.5 : sulfate transporter homologue to SST1 [Schneider *et al.*, 2019]

Supplemental data

TABLEAU2.2 – Macro (S, P, K, N, Ca and Mg) and micro- (Cu, Mo, Fe, Zn, Mn, B and Co) element concentrations in nodules of *Trifolium incarnatum* L. supplied (+Si) or not (-Si) with Si during 25 days. Asterisk indicates that means ± S.E. (n=4) are significantly different between both Si treatment ($p < 0.05$).

		Concentration (µg g^{-1} FW)	
		-Si	-Si
Macroelements	S	1439.2 ± 61.1	1290.4 ± 73.4
	P	1218.8 ± 82.4	1174.1 ± 74.3
	K	4617.6 ±178.3	4947 ±159.8
	N	189.8 ± 8.5	324.4 ± 36.5
	Ca	579.9 ± 36.4	474.1 ±41.8
	Mg	357.5 ± 42.8	247.8 ±24.6
Microelements	Cu	4.4 ± 0.5	5.8 ± 0.6
	Mo	39.1 ± 3.1	38.5 ± 2.4
	Fe	61.5 ± 0.6	59.0 ± 3.2
	Zn	15.47 ± 3.2	22.13 ± 3.3
	Mn	7.9 ± 0.9	7.4 ± 0.7
	B	2.1 ± 0.2	1.9 ± 0.1
	Co	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1

TABLEAU2.3 – List of 1 of 15 ABC transporters down-regulated by Si in host root cell.

UNIPROT	Organisme	logFC	pvalue	FDR	Expression	Protein Name from Uniprot
A0A2K3KZ92	Trifolium	-0.67	0.01854464	0.738	Down-regulated	ABC transporter F family member 3-like protein
A0A2K3N3Z3	Trifolium	-0.67	0.02208095	0.764	Down-regulated	ABC transporter F family member 3-like protein
A0A2K3MYS1	Trifolium	-0.83	0.02487539	0.78	Down-regulated	ABC transporter C family member 4-like protein
A0A2K3M189	Trifolium	-0.95	0.04615439	0.849	Down-regulated	ABC-type xenobiotic transporter (EC 7.6.2.2)
A0A2K3L5B4	Trifolium	-1.04	0.01129526	0.675	Down-regulated	ABC transporter C family member 8-like protein
A0A2K3NAU2	Trifolium	-1.19	0.0292317	0.801	Down-regulated	ABC transporter B family member 19-like protein
A0A2K3NTZ3	Trifolium	-1.20	0.00979123	0.662	Down-regulated	ABC transporter G family member 31-like protein
A0A2K3P0Q4	Trifolium	-1.20	0.0322849	0.812	Down-regulated	ABC transporter A family member 1-like protein
A0A2K3N4A8	Trifolium	-1.21	0.01867853	0.739	Down-regulated	ABC1 family protein
A0A2K3JTZ9	Trifolium	-1.59	0.00168072	0.43	Down-regulated	ABC transporter B family member
A0A2K3L813	Trifolium	-1.77	0.00183526	0.444	Down-regulated	ABC-type xenobiotic transporter (EC 7.6.2.2)
A0A2K3KAN2	Trifolium	-1.86	0.00746742	0.634	Down-regulated	ABC transporter C family member 3-like protein
A0A2K3PJM2	Trifolium	-2.17	0.00010561	0.121	Down-regulated	ABC-type xenobiotic transporter (EC 7.6.2.2)
A0A2K3NLX3	Trifolium	-2.23	0.00014332	0.139	Down-regulated	ABC transporter B family member
A0A2K3KCS2	Trifolium	-2.39	0.00026773	0.181	Down-regulated	ABC transporter B family member

2.4 Un apport en silicium augmente la rizodéposition et les transferts d'azote depuis *Trifolium incarnatum* L. vers *Brassica napus* L.

Silicon supply improves the N rhizodeposition and N transfer from *Trifolium incarnatum* L. to *Brassica napus* L. in intercrops

Raphaël Coquerel, Mustapha Arkoun, Philippe Laîné et Philippe Etienne

En révision dans Héliyon

2.4.1 Préambule

Contexte : Déjà largement étudiées depuis des décennies, les cultures associées peuvent être une solution permettant de réduire les doses de fertilisants azotés nécessaires aux plantes de grandes cultures (colza par exemple) grâce aux transferts de composés azotés rhizodéposés par les Fabacées. Dans ce contexte, des études réalisées au laboratoire ont montré que *Trifolium incarnatum* L. était l'une des Fabacées les plus efficaces en termes de transfert d'azote (N) vers le colza. Compte tenu des effets d'un apport de silicium (Si) précédemment constatés au laboratoire (Thèse Génard 2012-2016) chez les deux plantes présentes au sein de l'association *Brassica napus* L. - *Trifolium incarnatum* L., il peut être suggéré qu'un apport de Si puisse potentialiser le fonctionnement de cette association, notamment en accentuant les transferts d'N du trèfle vers le colza.

Objectifs et démarche expérimentale : Les effets d'un apport de Si sur la rhizodéposition et les transferts d'N de *Trifolium incarnatum* L. vers *Brassica napus* L. cultivés en association ont été étudiés. Pour ce faire, le système racinaire du trèfle a été divisé en deux parties égales grâce à un dispositif appelé "split-root", afin de cultiver en hydroponie une moitié des racines alimentées avec une solution nutritive contenant du nitrate (NO_3^-) marquée au ^{15}N, ne comportant pas de Si, alors que l'autre moitié est cultivée dans un pot contenant un mélange sol-sable et une plante de colza alimentée avec une solution nutritive contenant du NO_3^- non marquée et additionnée (+Si) ou non (-Si) de Si.

Faits marquants : Un apport de Si (dans le compartiment où la moitié du système racinaire de trèfle est alimentée en ^{15}N) induit **une augmentation significative de la biomasse du colza se trouvant dans l'autre compartiment** (pot). En outre, l'apport de Si **augmente la quantité d'N rhizodéposé par le trèfle**, la **quantité d'N transféré du trèfle vers le colza** et **modifie sa répartition au sein du colza** (augmentation des quantités de N transféré dans les siliques).

2.4.2 Introduction

Nitrogen (N) fertilization is widely used to ensure the growth, yield and quality of the harvested products of many field crops [Tian *et al.*, 2023, Yahbi *et al.*, 2022]. However, the intensive use of N fertilizers over more than six decades has led to economic and environmental costs [M. Sainju *et al.*, 2020]. For example, the industrial synthesis of N fertilizers, which consumes a lot of fossil fuels, releases large quantities of greenhouse gases into the atmosphere that are harmful to human health [Menegat *et al.*, 2022]. In addition, several studies have reported that the high doses of N to fertilize field crops lead to N losses that cause environmental impacts such as groundwater contamination [Gao *et al.*, 2012], soil acidification [Tian et Niu, 2015] and/or greenhouse gas emissions [De Vries, 2021]. In view of these negative economic and ecological effects, it is becoming urgent to develop more sustainable alternative cropping practices to reduce N inputs without compromising the agronomic performance of field crops. To achieve this objective, the intercropping of legume species suitable for fixing atmospheric nitrogen (N_2) with non-fixing crops is considered to be one of the most sustainable ways of introducing N into agroecosystems [Fustec *et al.*, 2010, Raza *et al.*, 2020a, Kebede, 2021]. Even though for several decades intercropping systems have mainly focused on corn, soybeans and wheat [Landschoot *et al.*, 2024], more recently they have also been considered for rapeseed, which is another crop that requires high doses of N fertilizer [Cadoux *et al.*, 2015]. In these intercropping systems, legumes fix N_2 thanks to their symbiotic relationship with soil rhizobacteria and are able to rhizodeposit part of this N into the soil, which can then be taken up by the non-fixing companion plant [Gou *et al.*, 2023, Raza *et al.*, 2020a]. As reported by Ta and Faris (1987) [Ta et Faris, 1987], the extent of N rhizodeposition resulting from mineralization of litter, root necromass and/or root exudation of N-compounds is different between legume species, especially due to variation in their N_2-fixation and exudation capacities. For example, several studies comparing different legume species (clover, vetch and lupin) intercropped with rapeseed have reported that clover and lupin have much higher N_2 fixation and N exudation capacities than vetch [Génard *et al.*, 2017a]. Interestingly, these same authors showed that irrespective of the legume species, the N_2-fixing capacity of the intercrops was always higher than the monocrops. This result is explained by the high N uptake capacity of rapeseed, which leads to N impoverishment in the soil solution, thus promoting nodulation and N_2 fixation capacity in legumes [Génard *et al.*, 2017a, Xia *et al.*, 2017b]. Using ^{15}N labelling, these studies have also shown that the proportion of N transferred from legumes to rapeseed is far from negligible, reaching over 3% of the total N in rapeseed [Génard *et al.*, 2016]. Furthermore, several field experiments have revealed that intercropping legumes with rapeseed led to better growth and more efficient nitrogen or sulfur use in rapeseed and reduced weed growth and insect pest pressure compared to rapeseed grown alone [Cadoux *et al.*, 2015, Génard *et al.*, 2017b, Breitenmoser *et al.*, 2022].

Although intercropping appears to be an effective cropping practice for increasing N use efficiency and reducing inputs in field crops, other strategies are also worth considering. Among them, silicon (Si) fertilization is increasingly recognized as a relevant practice for improving N use efficiency and agronomic parameters in many field crops such as maize, rice and rapeseed [Etesami et Adl, 2020, Pavlovic *et al.*, 2016]. Indeed, numerous studies have indicated that Si supply improves N nutrition by enhancing N uptake, assimilation and/or remobilization in many plant species [Detmann *et al.*, 2012, Haddad *et al.*, 2018, Mabagala *et al.*, 2020, Wu *et al.*, 2017]. For example, in *Brassica napus* L. grown under N deprivation, Si supply leads to an increase in expression of genes encoding root nitrate transporters (*BnaNRT1.1 and BnaNRT1.2*), which allows better N uptake when nitrate is resupplied [Haddad *et al.*, 2018]. In field conditions, Laîné et al. (2019) [Laîné *et al.*, 2019] reported that supplying Si enhanced the agronomic performance of *Brassica napus* L. by improving usage of N fertilizer and suggested that Si fertilization could allow a reduction in N inputs without altering rapeseed yield. In the same way, numerous studies have demonstrated that Si supply improves growth and N_2 fixation capacity in many legume species [Etesami et Adl, 2020, Putra *et al.*, 2020]. For example, in a recent study, Coquerel et al (2023) [Coquerel *et al.*, 2023] showed that Si supply increases the number and size of nodules as well as their nitrogenase content. All of these factors lead to an elevation in N_2 fixation capacity and growth of *Trifolium incarnatum* L. cultivated under S-deprivation. Interestingly, in the literature, the positive effects of Si fertilization on N use efficiency are only observed in plants grown in monoculture and never in intercropping.

In light of this finding, the aim of our study was to assess whether Si supply is able to potentiate the functioning of *Brassica napus* L. and *Trifolium incarnatum* L. intercropping. More precisely, the effects of Si supply on the amount of N rhizodeposited from *Trifolium incarnatum* L. and its transfer and allocation to *Brassica napus* L. were examined.

2.4.3 Materials and methods

Plant growth conditions and experimental design

Seeds of *Trifolium incarnatum* L. and *Brassica napus* L. (var. Mosaik) were germinated on perlite over deionized water during four days in the dark in a greenhouse. When the first leaf emerged, seedlings were transferred to natural light conditions and were supplied for one and a half weeks with nutrient solution containing : KNO_3 (1 mM), KH_2PO_4 (0.25 mM), KCl (1 mM), $CaCl_2$ (3 mM), $MgSO_4$ (0.5 mM), EDTA-2NaFe (0.2 mM), H_3BO_3 (14 μM), $MnSO_4$ (5 μM), $ZnSO_4$ (3 μM), $CuSO_4$ (0.7 μM), $(NH_4)_6Mo7O_{24}$ (0.7 μM), and $CoCl_2$ (0.1 μM). The seedlings were then transplanted into hydroponic tanks (20 L, 10 plants per tank) containing the nutrient

solution described above and inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* (strain T354, MSDJ1056, [Mazurier, 1989, Génard *et al.*, 2017b]) previously grown in YEM liquid medium for 72h. After two weeks, rapeseed plants were transplanted into 4L pots (one plant per pot) containing 5.5kg of a mix of silty-clay soil and sand (v :v 1/3). Roots of clover were separated into two equal parts using polylactic acid split-root supports, with half of the roots being placed in a donor compartment (DC) containing 4L of the nutrient solution previously described, labelled with $K^{15}NO_3$ (isotopic excess = 0.5 %). The nutrient solution was continuously aerated with a compressed air bubbling system and its pH was monitored each day and adjusted if necessary to 5.8 ± 0.2. The nutrient solution was renewed every three days and inoculated with 10 mL of medium containing *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*. The remaining half of the root system was placed in the receiver compartment (RC) containing the rapeseed plant, enabling interaction between the roots of the donor plant (clover) and receiver plant (rapeseed) (Figure 2.25). Each pot was watered daily with 2x30 mL of the unlabelled nutrient solution described above, to which 1.7 mM silicon (Si as sodium metasilicate : Na_2SiO_3) was added for +Si plants or 3.4 mM NaCl (to compensate the sodium supplied by the Si treatment) for -Si control plants. Throughout the culture duration, natural light was supplied by high pressure sodium lamps (Philips, MASTER GreenPower T400W) with photosynthetically active radiation of 450μmol photons $m^{-2}s^{-1}$ at canopy height. After 10 weeks (stage BBCH75 ; [Lancashire *et al.*, 1991], plants were harvested and shoots and roots were separated, weighed, and an aliquot of each compartment was dried at 60°C for 72h. After dry weight determination, samples were ground to perform the elemental analyses.

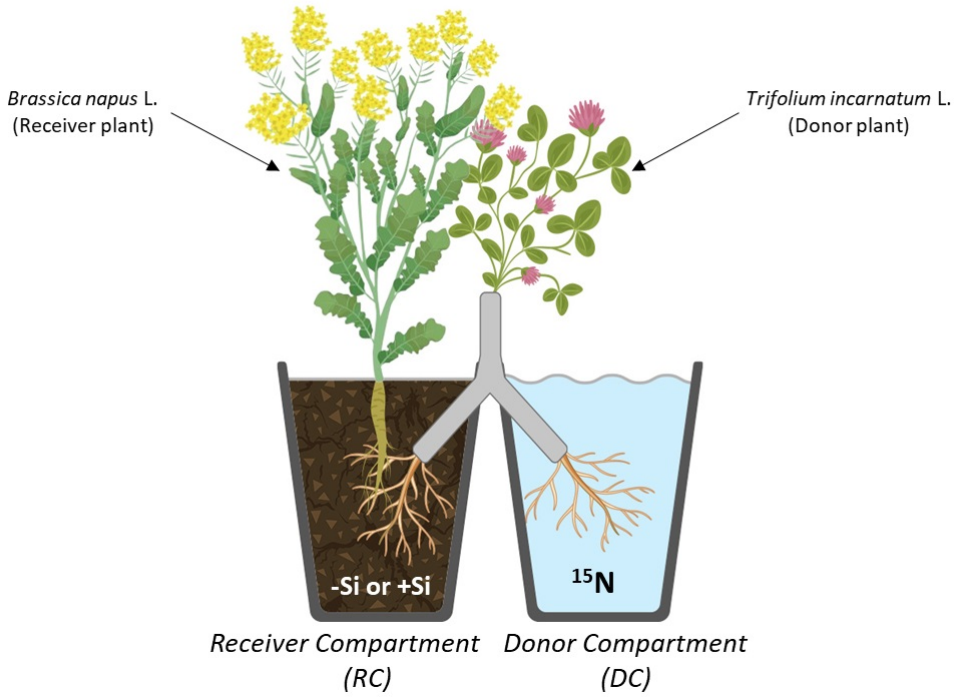


FIGURE2.25 – Experimental design. The receiver compartment (RC) contains soil treated (+Si; 1.7mM) or not (-Si) with Si. The donor compartment contains nutritive solution enriched with $K^{15}NO_3$ (1mM, ^{15}N excess of 0.5%). *Trifolium incarnatum* L. is the donor plant with half of its root system growing in DC and the other half growing in RC. *Brassica napus* L. is the receiver plant growing in RC.

Determination of N and ^{15}N amount

To determine the total N and ^{15}N concentrations, 1.5 mg of each dried powder was precisely weighed and put into tin capsules. Samples were analysed with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Horizon, NU Instruments, Wrexham, United Kingdom) linked to a C/N/S analyser (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). The total N amount (Ntot) in each plant compartment was calculated as :

$$N_{\text{tot}} = \frac{\%N \; x \; DW}{100}$$

The amount of ^{15}N (^{15}N) in each compartment was determined by the following :

$$^{15}\text{N} = \frac{\%^{15}\text{N} \; excess_{\text{ of compartment}} \; x \; N_{\text{ tot}}}{\%^{15}\text{N} \; excess_{\text{ labelled of nutrient solution}}}$$

With : $^{15}N\ excess_{\text{ labelled of nutrient solution}}$ = 0.5%

To estimate of total N transfer from the donor plant (*Trifolium incarnatum* L.) to the receiver plant (*Brassica napus* L.), it was assumed that ^{15}N and ^{14}N were transferred in equal proportions. According to Ledgard et al. (1985) [Ledgard *et al.*, 1985], the

ratio between ^{15}N in the receiver and the total ^{15}N (in both the receiver and the donor plants) was used to calculate the percentage of total N transferred from the donor to the receiver (rapeseed (*%N transfer*) or soil (*%residual N rhizodeposited*).

$$\%_{\text{N transfer}}(or\%_{\text{residual N rhizodeposited}}) = \frac{^{15}\text{N } amount_{\text{rapeseed (or soil)}}}{^{15}\text{N } amount_{\text{rapeseed (or soil)}} + ^{15}\text{N } amount_{\text{donor}}} x100$$

Then, the total amount of N transferred (mg N) from the donor to the receiver plant (*N transfer*) or the total amount of residual N rhizodeposited (*ResNrhizo.*; mg N) from the donor to the soil was calculated as :

$$N_{\text{transfer}}\ (or\ ResNrhizo) = \frac{\%_{\text{N transfer}}\ (\ or\ \%_{\text{residual N rhizodeposited}})\ x\ N_{\text{tot donor}}}{100}$$

Finally, the percentage of N derived from transfer (*%Ndft*) in rapeseed was calculated as :

$$\%Ndft = \frac{N_{\text{transfer}}\ x\ 100}{N_{\text{tot receiver}}}$$

Statistical Analysis

The experiment was performed with three independent biological replicates. All data are represented as the mean±S.E (n=3). Statistical analyses were performed using R software (version 4.2.0 : R Core Team, 2022). Significant differences between treatments were determined using Student's t-test ($p < 0.05$).

2.4.4 Results

Effect of Si supply on biomass and total N amount in rapeseed and clover

After 10 weeks, Si supply led to a significant increase in the total biomass of rapeseed plants, reaching around 17g. DW plant^{-1} *versus* 12g. DW plant^{-1} in -Si plants (Figure 2.26). This increase in *B. napus* L. plant biomass is mainly explained by the higher biomass of pods and flowers, which increased by 1.6 and 2-fold, respectively. In addition, the Si supply significantly increased the total N amount in the whole plant, leaves, pods and flowers, as well as the ^{15}N isotopic excess in pods (from 1 to 5.9% in -Si and +Si plants, respectively) and whole plants (from 1.4 to 4.1% for -Si and +Si plants, respectively) (Table 2.5). In clover, the addition of Si to the RC roots had no significant impact on total biomass, shoot biomass or the biomass of RC or DC root parts (Table 2.4). In addition, in clover, the total N amount and the ^{15}N isotopic excess in whole plants and in their different compartments was similar, irrespective of the Si treatment (Table 2.5).

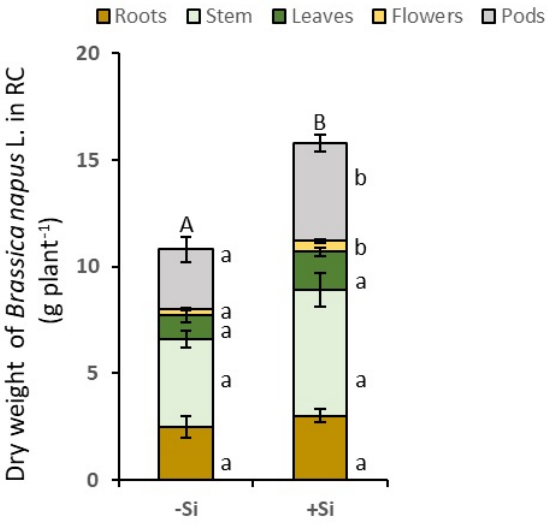


FIGURE2.26 – Dry weight of *Brassica napus* L. plants supplied with (+Si; 1.7 mM) or without silicon (-Si) and cultivated in soil (RC) for 10 weeks. Values correspond to the mean ± SE for n=3. Different lowercase and uppercase latin letters indicate significant differences between organs and whole plants, respectively ($p<0.05$).

TABLEAU2.4 – Dry weight of *Trifolium incarnatum* L. (donor plant) supplied with (+Si; 1.7 mM) or without silicon (-Si) for 10 weeks. The Si was supplied (+Si) or not (-Si) in the receiver compartment (RC). DC : donor compartment. Values are mean ± SE for n=3. Data obtained from +Si plants were compared to -Si plants (control) using Student's t test.

	Dry weight (g. plant^{-1})			
	RC roots	DC roots	Shoots	Whole plants
-Si	2.6± 0.6	4.2± 0.4	43.4± 4.2	50.2± 5.8
+Si	3.1± 0.7	4.6± 0.5	38.7± 0.5	46.4± 0.7

TABLEAU2.5 – Total N amounts and ^{15}N excess (in brackets; in atom%) of *Trifolium incarnatum* L. (donor plant) and *Brassica napus* L. (receiver plant) supplied with (+Si; 1.7 mM) or without silicon (-Si) for 10 weeks. The Si is supplied (+Si) or not (-Si) in the receiver compartment (RC) and nutrient solution containing ^{15}N labelling is supplied in donor compartment (DC). Values correspond to mean ± SE for n=3. Data obtained from +Si plants were compared to -Si plants (control) using Student's t test and significant differences ($p<0.05$) are indicated in bold.

Total N amount (mg plant^{-1}) and *^{15}N excess (Atom%)*

	***Brassica napus* L.**						***Trifolium incarnatum* L.**			
	Roots	Stems	Leaves	Flowers	Pods	Whole plants	RC roots	DC roots	Shoots	Whole plants
-Si	18± 3.0 *(3.2± 1.1)*	27± 1 *(1.5± 0.9)*	20± 6 *(2.2± 1.3)*	3± 0.3 *(1.8± 0.4)*	53± 7 *(1± 0.2)*	122± 10 *(1.4± 0.2)*	64.5± 12 *(19.9±6.3)*	115.7± 13 *(53.9±2.0)*	1227± 74 *(32.3±4.7)*	1408± 96 *(33.4±4.5)*
+Si	20± 3.4 *(2± 0.8)*	42± 6 *(3.2± 1.6)*	**40± 4** *(2.3± 0.6)*	**6± 0.3** *(2.7± 1.9)*	**78± 1** ***(5.9± 0.6)***	**185± 12** ***(4.1± 0.7)***	96.2± 17 *(13.9±1.3)*	133.7± 4.8 *(56.9±3.7)*	1215± 200 *(31.4±2.8)*	1445± 207 *(32.6±2.7)*

Effect of Si supply on N rhizodeposition from clover and N transfer to rapeseed

Supplying Si led to a significant increase in the amount of N rhizodeposited from *Trifolium incarnatum* L. to the RC, with values increasing from 70.9 ± 7.6 in to 99.8 ± 7.3 mg in the -Si RC and the +Si RC, respectively (Table 2.6). In addition, the Si supply increased the N transfer (%), i.e. the proportion of clover N transferred to rapeseed (from 0.42 to 1.6 % in -Si and +Si plants, respectively). This resulted in a significant increase in the amount N transferred from clover to rapeseed, which rose from 5.7 to 23.3 mg in -Si and +Si plants, respectively (Table 2.6). Finally, the addition of Si resulted in an approximately 3-fold increase overall in the Ndft, i.e. the proportion of *Brassica napus* L. N derived from transfer, which was 12.2% in +Si plants but only 4.2% in -Si plants (Table 2.6).

TABLEAU2.6 – **N rhizodeposited by *Trifolium incarnatum* L. (donor plant) in the receiver compartment (RC) and N transferred to *Brassica napus* L. (receiver plant).** N rhizodeposited corresponds to the total amount of N rhizodeposited from *Trifolium incarnatum* L. (donor plant) to the receiver compartment (RC). N transferred corresponds to the amount of rhizodeposited N taken up by *Brassica napus* L. (receiver plant). N transfer (%) corresponds to the proportion of total N transferred from *Trifolium incarnatum* L. to *Brassica napus*. Ndft (%) indicates the proportion of total N in *Brassica napus* L. derived from transferred N. Si was supplied (+Si) or not (-Si) to the receiver compartment (RC), and the nutrient solution containing ^{15}N labelling was supplied to the donor compartment (DC). Values correspond to the mean ± SE for n=3. Data obtained from +Si plants were compared to -Si plants (control) using Student's t test and significant differences ($p<0.05$) are indicated in bold.

	N Rhizodeposited in the RC (mg)	N transferred to *B. napus* (mg)	N transfer (%)	Ndft (%)
-Si	70.9 ± 7.6	5.7 ± 0.3	0.42 ± 0.03	4.2 ± 0.8
+Si	**99.8 ± 7.3**	**23.3 ± 3.8**	**1.60 ± 0.1**	**12.2 ± 1.3**

Si effect on the distribution of N derived from *Trifolium incarnatum* L. in the RC

The distribution of rhizodeposited N from clover in the RC is summarized in Figure 2.27. In this RC compartment, the amount of total N rhizodeposited from *Trifolium incarnatum* L. (i.e. 70.9 ± 7.6 in to 99.8 ± 7.3 mg in -Si RC and +Si RC, respectively; (Table 2.6)) is distributed in both the soil and in rapeseed. In soil (RC), even though the addition of Si did not lead to any change in the amount of residual rhizodeposited N, it significantly decreased the proportion of residual rhizodeposited N, as reflected in the soil values of 92.9 % and 76.0 % in -Si RC and + Si RC, respectively (Figure 2.27). This result indicates that Si supply enhanced the rhizodeposited N uptake by *Brassica napus* L. and caused an increase in the amount of N transferred, as shown in Table 2.6. As presented in Figure 2.27, Si has no effect on the distribution of the N transferring within the roots, stems and flowers because the amounts of transferred N (and the proportion of rhizodeposited N) were similar in these different compartments of *Brassica napus* L., regardless of the Si supply. In contrast, supplying Si increased the amount of N transferred to leaves (0.6 in -Si plants compared to 2.2 mg in +Si plants) and especially to pods (1.5 in -Si plants compared to 17.2 mg in +Si plants) in *Brassica napus* L. (Figure 2.27). These observations in +Si plants are due to the significant increase relative to -Si rapeseed plants in the allocation of rhizodeposited N in both of these organs. Indeed, the proportion of N transferred reached 2.3% (*vs.* 0.9% in -Si plants) in leaves and 16.8% (*vs.* only 2.2% in -Si plants) in pods of +Si rapeseed plants (Figure 2.27).

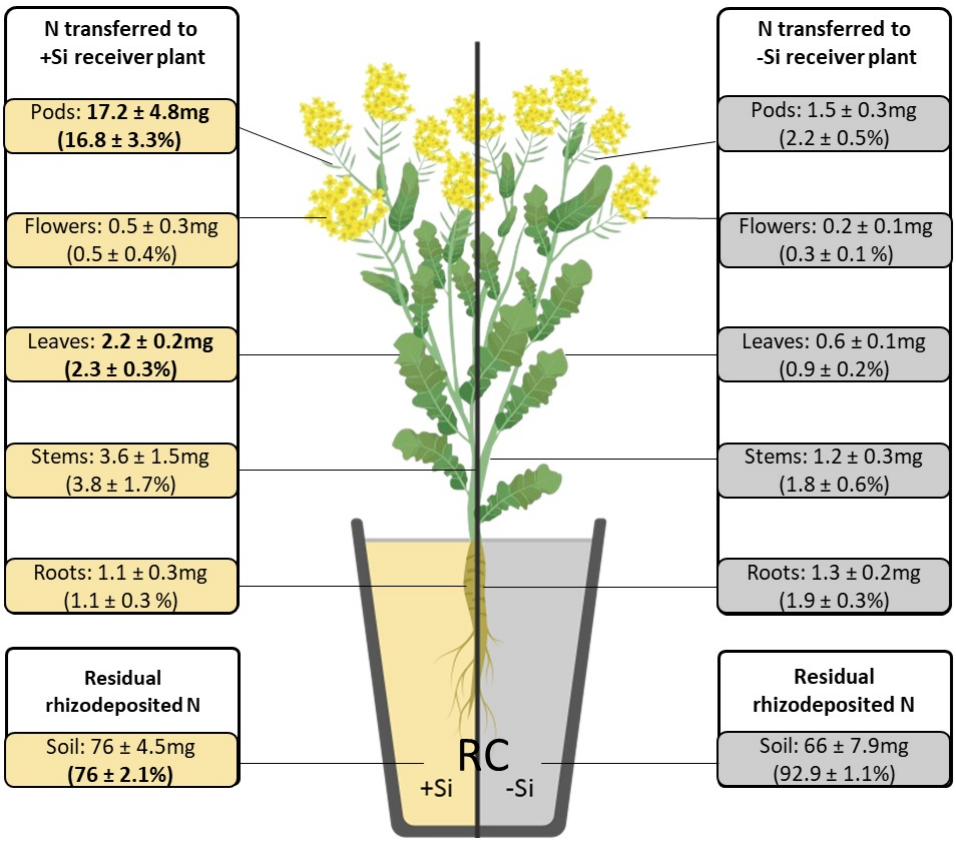


FIGURE2.27 – Distribution of total rhizodeposited N from *Trifolium incarnatum* L. (donor plant) to the receiver compartment (RC). The N amount transferred to the receiver plant and the residual N amount rhizodeposited from the donor plant to soil (RC) supplied with silicon (+Si; 1.7 mM; gold boxes) or without silicon (-Si; 0 mM; grey boxes) for 10 weeks. Values correspond to the mean ± SE for n=3. Data obtained from +Si plants were compared to -Si plants (control) using Student's t test, and significant differences ($p<0.05$) are indicated in bold.

2.4.5 Discussion

As part of the current agro-ecological transition, intercropping is considered a cultural practice relevant to reducing reliance on N fertilizers to promote the growth and yield in many field crops [Rubiales *et al.*, 2021]. For the first time, this study focuses on the intercropping performance of *Brassica napus* L., a field crop, and *Trifolium incarnatum* L., an N_2-fixing legume that is very effective at increasing the pool of N available in the soil [Génard *et al.*, 2016]. More specifically, by using a split root system combined with ^{15}N labelling, this study assessed the effect of Si supply on N rhizodeposition, its transfer from *Trifolium incarnatum* L. to *Brassica napus* L., and its distribution among the different plant compartments. This study showed that, irrespective of the Si treatment, clover rhizodeposits N and that part of this N is transferred to rapeseed (Figure 2.27 and Table 2.6). This result agrees with previous studies reporting N transfer between legumes and rapeseed

when these two plants are intercropped [Fustec *et al.*, 2010, Génard *et al.*, 2016, Jamont *et al.*, 2013]. Interestingly, our study demonstrates the novel finding that Si supply increases the amount of N rhizodeposited by clover (Figure 2.27 and Table 2.6) relative to -Si plants. Although it is difficult to decipher the role of Si in the N rhizodeposition by clover, it cannot be ruled out that this is a consequence of the positive effect of Si on nodulation, the abundance of nitrogenase in nodules, and the N_2-fixing capacity observed in legumes and in *Trifolium incarnatum* L. in particular [Putra *et al.*, 2022, Coquerel *et al.*, 2023]. This assumption is corroborated by previous studies indicating that in intercrops with rapeseed, the legume species with the best N_2-fixing capacity are also those possessing the highest capacity for root N exudation [Génard *et al.*, 2016, Génard *et al.*, 2017a]. In addition, the present study indicated that Si supply increased the N transfer from clover to rapeseed and it was preferentially allocated to the pods (Figure 2.27 and Table 2.6). The better N transfer was due to an increase in the uptake of rhizodeposited N (Figure 2.27), which can be explained by the positive effect of Si on the expression of genes encoding N transporters in *Brassica napus* L., as previously reported [Haddad *et al.*, 2018]. This result is in line with an earlier study demonstrating that in field-grown *Brassica napus* L., Si supply led to an increase in the use efficiency of the N solution in the soil [Laîné *et al.*, 2019]. Overall, the positive effects of Si resulted in an increase in the total biomass of *Brassica napus* L. and better pod biomass, as well as a greater N content supplied by clover to the pods (Figure 2.26 and 2.27). These effects agree with previous studies reporting that Si increases the number of seeds and the proportion of N allocated to them in several plant species such as rice and maize [Liu *et al.*, 2018, Liu *et al.*, 2022b].

For the first time, this study highlights the beneficial effects of Si supply on *Brassica napus* L. - *Trifolium incarnatum* L. intercrops including increases in N rhizodeposition by clover and the promotion of N transfer to rapeseed. Thus, use of Si-fertilizer could be particularly beneficial to improve the agronomic performance of the intercrop and to reduce the N input required by the *Brassica napus* L. crop.

Chapitre 3

Discussion générale

En réponse aux défis économiques et environnementaux actuels, l'agriculture doit se réinventer et développer de nouvelles stratégies agronomiques pour réduire l'utilisation de fertilisants, notamment azotés, tout en maintenant des niveaux de production et de qualité des produits récoltés élevés [Savci, 2012]. Dans ce contexte, un des enjeux consiste à réduire l'impact environnemental des cultures en envisageant différentes pistes de recherche, parmi lesquelles peuvent être citées l'amélioration variétale, les modifications des pratiques culturales ainsi que le recours à des biostimulants. Ces travaux de thèse s'inscrivent dans la continuité de deux précédentes thèses réalisées à l'UMR INRAE-Unicaen 950 EVA et qui avaient pour objectifs, d'une part, d'évaluer **le potentiel agronomique et environnemental du colza cultivé en association avec des Fabacées** [Genard, 2016] et d'autre part, d'étudier **les effets d'un apport de biostimulant de formulation simple (silicium, Si) sur les performances agronomiques du colza cultivé en monoculture** [Haddad, 2018]. Les travaux de Génard (2012-2016) ont notamment mis en évidence que, parmi un panel de 7 Fabacées (vesce commune, gesse fourragère, fenugrec, lupin blanc, trèfle incarnat et lentille fourragère) cultivées en association avec le colza, le trèfle incarnat (*Trifolium incarnatum* L.) était l'une des espèces qui présentait à la fois les meilleures capacités de fixation de diazote atmosphérique (N_2) et de transfert de composés azotés vers le colza. Ces résultats suggèrent que l'association colza-trèfle incarnat pourrait être une solution pertinente pour limiter les apports d'intrants azotés requis pour la culture du colza. Par ailleurs, les travaux de C. Haddad (2015-2018) ont mis en avant des effets positifs d'un apport de Si chez *Brassica napus* L. cultivé en monoculture, en montrant notamment que le Si augmentait l'expression de gènes codant pour des transporteurs racinaires de nitrate (NO_3^-) (NRT 2.1) et provoquait un retard de la sénescence foliaire séquentielle. Ces résultats suggèrent qu'un apport de Si permettrait, d'une part, un meilleur prélèvement du NO_3^- de la solution du sol par le colza et, d'autre part, une augmentation de la durée de vie des feuilles, ce qui conduirait à une meilleure remobilisation de l'azote (N) foliaire en améliorant le synchronisme entre le vidage en N des feuilles (sénescence) et le remplissage des grains, comme cela a été suggéré par l'approche modélisatrice développée par [Malagoli, 2005].

Compte tenu des résultats obtenus lors de ces deux études, **l'originalité de ce travail de thèse a consisté à combiner les deux approches, jusqu'alors traitées de manière indépendante, en testant l'effet d'un apport de Si sur les performances agronomiques du colza (*Brassica napus* L.) associé au trèfle incarnat (*Trifolium incarnatum* L.).**

3.1 Effets bénéfiques du silicium chez le colza cultivé en monoculture et soumis à une carence en soufre

Les effets du Si chez des plantes de colza cultivées en monoculture et soumises à une carence en soufre (S) ont été étudiés (Chapitre 3.section 2.1, page 37-58). Nos résultats ont révélé que, bien que l'apport en Si n'entraîne pas de modification de la teneur en S, un effet significatif sur l'indice en anthocyanes foliaires (Figure 2.3B) et l'expression des gènes codant les transporteurs racinaires de sulfate (SO_4^{2-}) (Figure 2.7) a été mis en évidence. En effet, les plantes carencées -S+Si présentent un indice en anthocyane foliaire d'environ 0,023 contre 0,005 pour les plantes -S-Si. Des travaux récents rapportent qu'en cas de carence en S, la chute des teneurs en composés soufrés à propriétés antioxydantes comme le glutathion est associée à une augmentation du stress oxydatif [Ito *et al.*, 2022]. Dans notre étude, chez les plantes -S+Si, l'accumulation d'anthocyanes, molécules aux propriétés antioxydantes également avérées, pourrait permettre de pallier à la diminution de ces teneurs en molécules soufrées antioxydantes. Cette hypothèse est en partie validée par la baisse des teneurs en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en malondialdéhyde (MDA) (marqueurs du stress oxydatif) mesurées chez les plantes -S+Si comparativement aux plantes -S-Si.

Par ailleurs, de nombreuses études rapportent que chez le colza, les gènes codant les transporteurs racinaires de SO_4^{2-} (*BnaSultr1.1* et *BnaSultr1.2*) sont fortement induits en réponse à une carence en S. Dans cette étude, une induction de l'expression des gènes codant les transporteurs racinaires de SO_4^{2-}, qui est plus modérée chez les plantes -S+Si que chez les plantes -S-Si, est observée. Ce résultat peut s'expliquer par des besoins en S plus modestes des plantes -S+Si, résultant notamment de leur moindre dépendance en composés soufrés antioxydants pour lutter contre le stress oxydatif induit par la carence en S. **Ces résultats montrent un effet bénéfique du Si chez le colza au cours de la carence en S.**

De plus, cette étude montre que **cet effet bénéfique peut être prolongé au-delà de la période de carence** et notamment lorsque le S est à nouveau disponible pour la plante. En effet, après 72 heures de réapprovisionnement en S, l'expression des gènes codant les transporteurs racinaires de SO_4^{2-} est maintenue à un niveau élevé chez les plantes ayant reçu du Si pendant la période de carence en S, alors qu'elle est quasiment nulle chez les plantes qui n'en ont pas reçu. Ce maintien d'expression à un niveau élevé

pourrait conférer un avantage à ces plantes en leur permettant de prélever du S sur une plus longue période et/ou de répondre plus efficacement à un nouvel épisode de carence en S.

Ces résultats mettent en évidence des effets positifs d'un apport en Si chez le colza cultivé en condition de carence en S et sont particulièrement intéressants dans le cadre de son association culturale avec une plante également exigeante en S telle que le trèfle, et de surcroît dans un contexte de forte occurrence de carences suite à la forte réduction des émissions de S d'origine anthropique constatée depuis plusieurs décennies.

3.2 Effets bénéfiques d'un apport de silicium sur la nodulation et les capacités de fixation du diazote atmosphérique chez *Trifolium incarnatum* L. soumis à une privation de soufre ou d'azote dans la solution nutritive

Le recours au trèfle dans l'association avec le colza se justifie par ses capacités à fixer le N_2 atmosphérique et à rhizodéposer des composés azotés absorbables par le colza. Cette fixation de N_2 nécessite l'établissement d'une symbiose entre les racines du trèfle et des bactéries du sol du genre *Rhizobium* pour former une structure spécialisée visible à l'il nu appelée nodule (Figure 6.1). Au sein de ces nodules, sont présentes des cellules racinaires hôte renfermant chacune plusieurs structures intracellulaires isolées du cytoplasme de la cellule végétale appelées symbiosomes. Chaque symbiosome contient un espace péribactérien (appelé espace du symbiosome) délimité par une membrane d'origine végétale et un ou plusieurs bactéroïdes (*rhizobia* différenciés) capables de fixer le N_2 grâce à la nitrogénase, un complexe enzymatique bactérien catalysant la réaction :

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \Rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$$

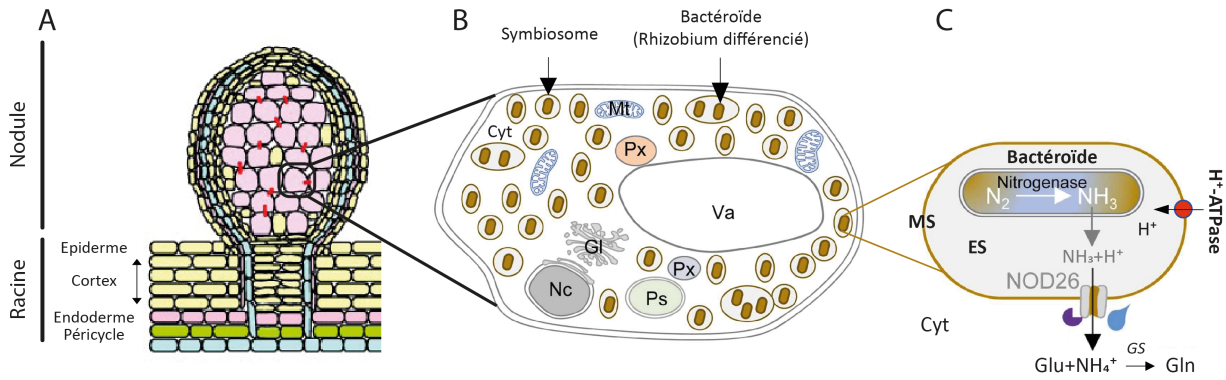


FIGURE3.1 – **Détail de la symbiose entre un tissu racinaire de Fabacée et des bactéries rhizosphériques du genre *Rhyzobium*. A :** Nodule contenant des cellules racinaires hôte de *Rhyzobia* et renfermant de nombreux symbiosomes. **B :** Détail d'une cellule racinaire hôte avec de nombreux symbiosomes contenant un (ou plusieurs) bactéroïde(s) (*Rhyzobia* différenciés). **C :** détails d'un symbisome. **Cyt** : cytoplasme ; **GI** : dictyosome de l'appareil de Golgi ; **GS** : glutamine synthase ; **Mt** : mitochondrie ; **NH_3** : ammoniac ; **NH_4^+** : ammonium ; **Nc** : noyau ; **NOD26** : transporteur d'ammonium de type aquaporine ; **Ps** : plaste ; **Px** : peroxysome ; **MS** : membrane du symbiosome ; **ES** : espace du symbiosome ; **Va** : vacuole.
Adapté de [Shen et Feng, 2024, Ma *et al.*, 2024, Popp et Ott, 2011]

Cependant, la mise en place et l'efficacité de cette symbiose peuvent être impactées par de nombreux facteurs, et en particulier les stress nutritionnels tels que la carence en S [Varin *et al.*, 2010] ou encore la disponibilité en N dans la solution du sol [Zoffoli *et al.*, 2021], autant de conditions auxquelles le trèfle cultivé en association avec le colza, plante exigeante en N et S, pourra être confronté. Bien que les multiples impacts positifs d'un apport de Si chez les Fabacées soumises à des stress abiotiques soient bien documentés, **à ce jour, les effets d'un tel apport sur la nodulation et les capacités de fixation du N_2 du trèfle cultivé en l'absence de S ou de N (dans la solution nutritive) restent méconnus.**

C'est pourquoi les deux essais réalisés durant ces travaux de thèse (Chapitre 3. section 2.2, pages 60-80 et section 2.3, pages 81-105) avaient pour objectif d'évaluer les effets d'un apport de Si chez le trèfle incarnat cultivé en l'absence de S ou de N (dans la solution nutritive). Que ce soit en absence de S ou de N dans la solution nutritive, un apport de Si conduit à une augmentation de la biomasse sèche des plantes (dès 25 jours et au-delà de 42 jours respectivement en cas de privation en N et S) (Figure 2.10 et 2.17A). Ces résultats sont particulièrement intéressants puisque dans le cadre d'une association avec le colza, la compétition pour les ressources en nutriments pourrait être en défaveur du trèfle, qui pourrait se retrouver confronté à de faibles disponibilités en N et/ou S dans la solution du sol [Génard *et al.*, 2017a].

Dans ce contexte, il peut être suggéré qu'un apport de Si puisse permettre au trèfle de croître en dépit de ces conditions nutritionnelles défavorables. En outre, **l'impact d'un apport de Si sur la mise en place de la nodulation et le fonctionnement des nodules a été étudié dans les conditions de contraintes nutritionnelles** décrites précédemment (-S et -N). Dans ces deux conditions, en réponse à l'apport de Si, il a été observé une augmentation du nombre et de la densité des nodules, de l'abondance relative en nitrogénase dans ces nodules ainsi que de leur capacité de fixation du N_2 (Figure 2.12, 2.13, 2.17D et Tableau 2.1). Ces effets bénéfiques liés à l'apport de Si sont en accord avec ceux rapportés, par exemple, chez *Medicago truncatula* L. cultivées respectivement en présence de différentes souches de *Rhizobium* [Putra *et al.*, 2021] ou chez *Medicago sativa* L. soumis à un stress salin [El Moukhtari *et al.*, 2021].

Compte tenu de ces effets bénéfiques, une étude visant à mieux appréhender

l'impact d'un apport de Si sur le fonctionnement des nodules a été réalisée en combinant des approches ionomique et protéomique (section 2.3, page 81 - 105). L'analyse ionomique réalisée à partir de nodules isolés de plantes traitées ou non au Si révèle qu'un apport de Si conduit à une augmentation significative de la quantité de macro (K, N, P et S) et micro (B, Cu, Mo et Zn) éléments dans le nodule, dont certains sont connus pour être bénéfiques voire essentiels à l'établissement de la symbiose (comme le B ; [Bolanos *et al.*, 1996]) et au bon fonctionnement des nodules (S, P, K, Mo, et Zn ; [Shukla et Yadav, 1982, Premaratne et Oertli, 1994, González-Guerrero *et al.*, 2014, Yao *et al.*, 2022]). Par exemple, le S et le Mo sont deux éléments essentiels à la synthèse des trois groupements prosthétiques métalliques entrant dans la composition du complexe nitrogénase [Becana *et al.*, 2018, Alam *et al.*, 2015]. L'augmentation de 30 % des quantités de ces deux éléments en réponse à un apport de Si pourrait ainsi conduire à une meilleure synthèse de nitrogénase fonctionnelle et, pour partie, expliquer la plus forte abondance de ce complexe enzymatique mais également la meilleure capacité de fixation du N_2 observées chez les plantes +Si.

Par ailleurs, l'analyse protéomique comparative (+Si *vs* -Si) des nodules révèle que l'apport de Si module globalement l'accumulation de 1200 protéines, parmi lesquelles 323 sont suraccumulées et 877 sont sous-accumulées. Contrairement aux études décrites dans la littérature qui réalisent généralement les enrichissements ń Gene Ontology (G.O.) ż à partir du pool global de protéines identifiées dans le nodule [Yao *et al.*, 2022], l'originalité de notre étude réside dans le fait d'avoir recherché l'appartenance de chacune des protéines identifiées à l'un des deux symbiontes (cellules racinaires hôte ou bactéroïdes). Ainsi, cette analyse a montré que parmi les 1200 protéines dont l'accumulation est modulée par le Si, 988 (708 moins et 280 plus accumulées) et 212 (169 moins et 43 plus accumulées) appartiennent respectivement aux cellules racinaires hôte et aux bactéroïdes. À partir du pool de protéines appartenant aux cellules racinaires, l'enrichissement G.O. montre qu'en dépit d'une large dispersion, les termes G.O. les plus enrichis sont liés à la synthèse de composés azotés organiques et notamment d'amides et de peptides. Ces résultats corroborent l'augmentation de la quantité d'N dans les nodules observés lors de l'analyse ionomique mais aussi les résultats d'études antérieures rapportant que certains peptides (tels que les peptides CLE) et amides (asparagine en particulier) sont capables d'augmenter la croissance et l'activité de fixation de N_2 des nodules [Sulieman et Tran, 2013].

En outre, à partir du pool de protéines appartenant au bactéroïde, faute de logiciel d'analyse d'enrichissement dédié à *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*, des groupes fonctionnels ont été générés en utilisant l'outil Cluego [Bindea *et al.*, 2009] basé sur l'annotation G.O. des protéines de *Rhizobium leguminosarum*. À l'issue de cette analyse, 68 % des protéines ayant une accumulation modifiée par le Si et appartenant au bactéroïde ont pu être affectées principalement dans les groupes fonctionnels "traduction (20,5 %)" et "processus oxydoréduction (18,9 %)". Ces résultats

sont en accord avec des études précédentes, et notamment celles conduites chez le colza, montrant qu'un apport de Si module l'expression de nombreux gènes codant des protéines entrant dans la constitution des ribosomes et des enzymes intervenant dans la détoxification des formes réactives de l'oxygène [Haddad *et al.*, 2019, Etienne *et al.*, 2021]. Enfin, 17,6 % des protéines du bactéroïde ayant été affectées au groupe fonctionnel "biosynthèse de composés organiques azotés", il peut être suggéré que l'apport de Si augmente la synthèse de composés organiques azotés dans le bactéroïde, qui, elle-même, serait favorisée par l'augmentation des capacités de fixation du N_2 précédemment décrite. Cette analyse globale a été complétée par une analyse plus fine du rôle de certaines protéines dont le niveau d'accumulation est modulé par le Si afin de mieux appréhender le mode d'action de celui-ci au sein du nodule.

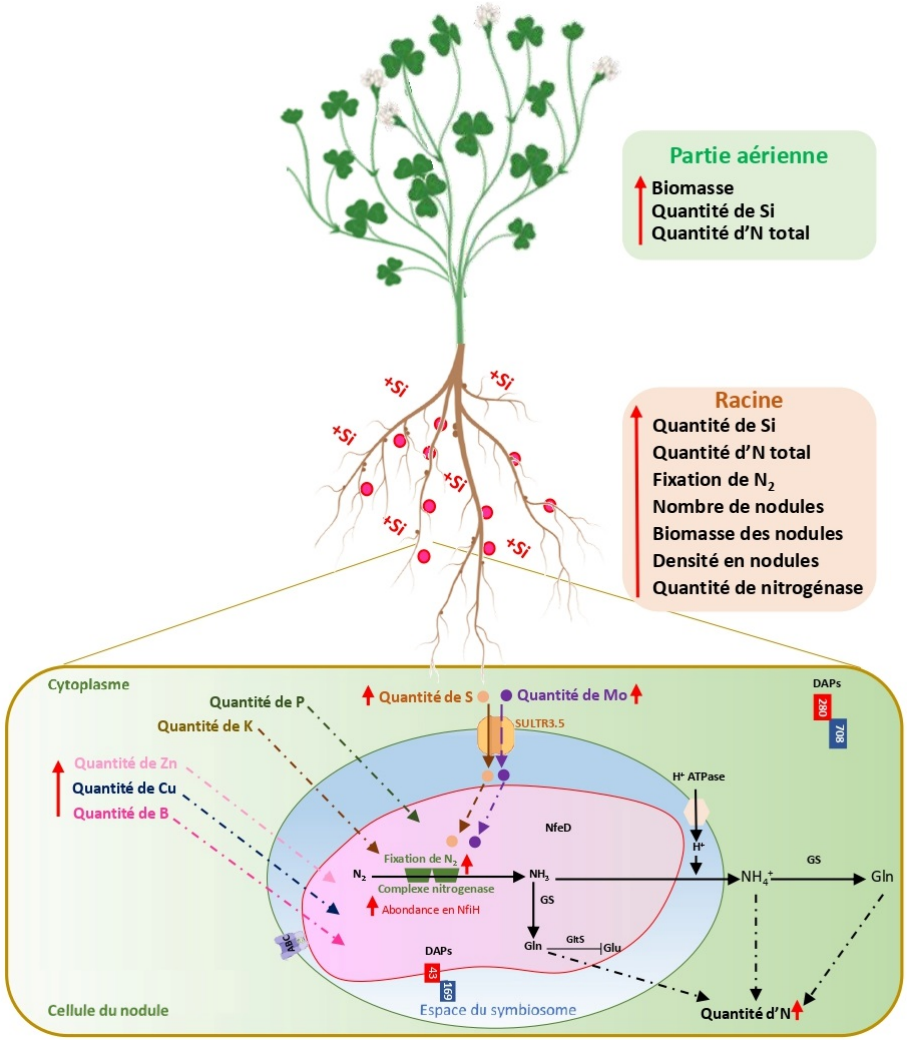


FIGURE3.2 – Schéma récapitulatif des principaux effets de l'apport de Si sur la croissance de *Trifolium incarnatum* L et sa nodulation.

La figure 3.2 présente de manière synthétique une compilation des résultats issus de cette analyse et de ceux obtenus par l'approche ionomique. À titre

d'exemple, le transporteur de SO_4^{2-} SULTR3.5, homologue du transporteur SST1 localisé dans la membrane du symbiosome, est fortement accumulé en réponse au Si et pourrait permettre le transport de S (dont la quantité est augmentée en présence de Si) du cytoplasme de la cellule racinaire hôte vers le bactéroïde. Etant donné que les transporteurs de SO_4^{2-} peuvent également transporter du molybdate [Maillard *et al.*, 2016b], la même hypothèse peut être avancée concernant le Mo : ce transporteur SULTR3.5 pourrait assurer le transport du molybdate depuis le cytoplasme de la cellule racinaire hôte jusqu'au symbiosome. Ainsi, l'augmentation du transport de ces deux éléments (S et Mo) pourrait permettre une meilleure synthèse des groupements prosthétiques [4Fe-4S] et FeMoco de la nitrogénase et conduire à une meilleure capacité de fixation du N_2 [Schneider *et al.*, 2019, Lilay *et al.*, 2024]. Cette hypothèse est confortée par l'accumulation dans le bactéroïde de la protéine NBP35 qui est nécessaire à la synthèse du cofacteur FeMoco [Pardoux *et al.*, 2019].

En outre, l'augmentation des capacités de fixation du N_2 en réponse au Si peut également s'expliquer par l'accumulation dans le bactéroïde de la protéine FixC, connue pour augmenter l'activité de la nitrogénase en lui apportant du pouvoir réducteur [Garcia Costas *et al.*, 2017, Del Cerro *et al.*, 2019] et de la protéine NfeD, connue pour améliorer l'efficience de la nodulation [García-Rodríguez et Toro, 2000]. Cette meilleure fixation de N_2 pourrait conduire à une synthèse accrue d'ammoniac (NH_3) dans le cytosol du bactéroïde, qui sera assimilé selon deux voies possibles. Ce NH_3 peut soit être assimilé localement en glutamine par la glutamine synthétase (GS) bactérienne. Compte tenu de la diminution de l'accumulation de la glutamate synthase (GltS) en réponse au Si dans le cytosol du bactéroïde, il peut être suggéré que la glutamine soit utilisée pour la synthèse de protéines bactériennes et/ou exportée vers le cytosol de la cellule racinaire hôte. L'ammoniac produit peut également diffuser à travers la membrane du bactéroïde pour être protoné en ammonium (NH_4^+) dans l'espace du symbiosome grâce à une pompe à protons H^+ATPase dont la quantité augmente en réponse au Si. L'ammonium est ensuite transporté vers le cytoplasme de la cellule racinaire hôte pour être réduit en glutamine par la GS, dont la quantité augmente également en réponse au Si. L'ensemble de ces travaux confirme les effets bénéfiques d'un apport de Si sur la nodulation et les capacités de fixation du N_2 chez le trèfle cultivé en absence d'N dans la solution nutritive.

Par ailleurs, les approches conduites sur des nodules isolés ont permis de montrer pour la première fois que le Si agit en modulant le ionome du nodule mais également en modulant le protéome des deux symbiontes, et plus particulièrement en augmentant la quantité de protéines impliquées dans l'augmentation de l'efficience de la nodulation et de la fixation de N_2.

3.3 Effets bénéfiques d'un apport de silicium chez le trèfle cultivé en association avec le colza

Les effets bénéfiques d'un apport de Si observés chez le colza et le trèfle cultivés en monoculture laissent supposer que le Si pourrait permettre une optimisation du fonctionnement de l'association de ces deux plantes. Parmi les leviers d'optimisation possibles, **l'effet d'un apport de Si sur les capacités de fixation de N_2 et de rhizodéposition de composés azotés par le trèfle ainsi que leur transfert vers le colza a été étudié.** Pour ce faire, le système racinaire du trèfle a été scindé en deux parties égales, l'une placée dans un pot (donneur) contenant de la solution nutritive marquée au ^{15}N (hydroponie) et recevant ou non du Si (1,7 mM), tandis que l'autre partie est placée dans un pot (receveur) contenant un mélange sol/sable (50/50 v/v) et une plante de colza (Figure 2.25). La capacité de fixation du N_2 a été évaluée en mesurant la quantité de ^{14}N dans le trèfle, alors que les quantités de composés azotés rhizodéposés par le trèfle dans le compartiment receveur ainsi que leur transfert vers le colza ont été déterminées grâce à un marquage ^{15}N.

Un apport en Si conduit à une augmentation d'environ 40 % des quantités de composés azotés rhizodéposés par le trèfle dans le compartiment receveur comparativement à la situation où le trèfle n'a pas reçu de Si (Tableau 2.6). Ce résultat s'explique par une forte élévation des capacités de fixation de N_2 atmosphérique, qui est associée à une augmentation du nombre de nodules chez le trèfle ayant reçu un apport de Si. Ces effets bénéfiques du Si sur les paramètres de nodulation et de fixation du N_2 sont en accord avec ceux obtenus chez le trèfle soumis à une carence en S [Coquerel *et al.*, 2023] mais également chez d'autres légumineuses soumises à un stress salin [El Moukhtari *et al.*, 2022c]. En outre, notre étude montre une augmentation des quantités de ^{15}N dans le colza, ce qui atteste d'un meilleur transfert des composés azotés rhizodéposés par le trèfle traité au Si comparativement au trèfle n'en ayant pas reçu. Enfin, il semble intéressant de noter que l'N transféré depuis le trèfle est principalement redirigé vers les siliques. Ce résultat suggère que le colza absorbe les composés azotés rhizodéposés principalement lors du remplissage des siliques, un stade de développement au cours duquel il a été montré que l'absorption du NO_3^- était nulle en dépit de sa disponibilité dans le milieu [Rossato, 2001].

L'ensemble de ces résultats, qui démontre les effets bénéfiques d'un apport de Si sur le fonctionnement de l'association colza-trèfle et en particulier sur les transferts d'N de la Fabacée vers le colza, laisse penser que le Si pourrait être un levier d'amélioration du bilan environnemental de la culture du colza. Néanmoins, un apport de Si devra être généralisé à l'ensemble de l'association afin d'évaluer son impact sur les composantes du rendement et sur la qualité des produits récoltés du colza cultivé en association avec le trèfle en conditions contrôlées et de plein champ sous différents niveaux de fertilisation azotée.

Chapitre 4

Perspectives

Compte tenu des résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse, plusieurs perspectives peuvent être envisagées afin d'approfondir nos connaissances sur les effets bénéfiques du Si sur **le fonctionnement de l'association colza-trèfle** (**axe 1**) mais également d'élucider **les facteurs permettant d'accroître la disponibilité dans le sol de sa forme absorbable** (acide mono-silicique $Si(OH)_4$) **par les végétaux** (**axe 2**).

Axe 1 : Un apport de Si améliore-t-il les performances agronomiques du colza cultivé en association avec le trèfle ?

Lors de nos essais sur l'association colza-trèfle, bien que des résultats intéressants aient été obtenus notamment au niveau des transferts d'N de la Fabacée vers le colza, une des limites de cette étude réside dans le fait que le Si n'ait été apporté qu'à un seul des deux partenaires de l'association. Une des perspectives directes de ces travaux serait donc de réaliser un apport de Si à l'ensemble de l'association afin de vérifier si :

- Un apport de Si à l'association colza-trèfle permet de diminuer les doses de fertilisants azotés usuellement requis pour la culture du colza : des études réalisées par Laîné *et al.* en conditions de plein champ ont montré qu'un apport de Si en monoculture permet une meilleure valorisation de l'N issu du fertilisant et un maintien du rendement avec une réduction d'environ 30% des doses d'intrants azotés [Laîné *et al.*, 2019]. Par ailleurs, les travaux réalisés au cours cette thèse montrent un meilleur transfert de composés azotés rhizodéposés de la Fabacée vers le colza lorsque le trèfle reçoit un apport de Si. Compte tenu de ces résultats, une expérimentation conduite en conditions contrôlées et visant à apporter différentes doses de fertilisants azotés à l'association colza-trèfle traitée ou non avec du Si afin de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse selon laquelle un apport de Si sur l'association permettrait de réduire les doses d'intrants azotés sans affecter le rendement et la qualité grainière du colza.

- Un apport de Si permet une optimisation du rendement et de la qualité des graines du colza cultivé en association avec le trèfle : des études réalisées en

conditions de plein champ ont montré qu'un apport de Si à une monoculture de colza lors de la reprise de végétation permet d'augmenter le rendement, la teneur en microéléments des graines ainsi que leur qualité en huile (diminution du rapport ω_6 : ω_3) [Laîné *et al.*, 2019]. Compte tenu de ces effets, il semble pertinent de tester l'effet d'un apport de Si en conditions de plein champ afin de mieux appréhender son effet sur les performances agronomiques du colza cultivé en association. Par ailleurs, en fonction des résultats obtenus lors de l'expérimentation en conditions contrôlées présentées ci-dessus, différentes doses de fertilisants azotés pourront être appliquées afin de valider les effets du Si sur une potentielle optimisation des doses d'intrants azotés nécessaires à la culture du colza cultivé en association.

- En outre, d'un point de vue plus fondamental, il serait intéressant d'élucider **le ou les mécanisme(s) conduisant à l'augmentation de la nodulation et de la taille des nodules observée chez le trèfle en réponse à un apport de Si.** Une première hypothèse peut être émise quant à un effet positif direct d'un apport de Si sur la croissance des *Rhizobia* présents dans la rhizosphère, ce qui conduirait à une augmentation de la nodulation et/ou à un nombre de symbiosomes plus importants dans les cellules racinaires infectées. Pour vérifier cette hypothèse, des apports de Si pourraient-être réalisés sur des cultures *in vitro* de *Rhizobia* et le nombre de colonies (UFC : "unité formant colonie") pourra être ensuite déterminé par ensemencement de boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé adapté à la culture de ces bactéries. Une seconde hypothèse, qui n'exclut pas la première, consiste à supposer que l'apport de Si pourrait stimuler l'exsudation racinaire de composés tels que des flavonoïdes et/ou d'autres molécules carbonées et/ou azotées, qui pourraient favoriser la croissance mais aussi le chimiotactisme des *Rhizobia* et ainsi conduire à une meilleure nodulation de la Fabacée. Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, une analyse métabolomique comparative des exsudats racinaires de trèfle incarnat ayant reçu ou non un apport de Si pourra être pratiquée afin d'identifier le(s) métabolite(s) potentiellement capable(s) de stimuler la nodulation.

Axe 2 : Existe-t-il des facteurs permettant d'accroître la disponibilité de la forme absorbable du Si par les végétaux ?

Nos résultats ont révélé des effets bénéfiques du Si, notamment sur la croissance, mais également sur leur capacité d'acquisition de l'N (absorption par le colza et fixation du diazote atmosphérique par le trèfle). L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'utilisation de Si en agriculture pourrait avoir des effets bénéfiques tant sur le rendement que sur l'efficience d'utilisation des fertilisants azotés du trèfle et/ou du colza cultivés en monoculture ou en association. Toutefois, de telles pratiques réalisées à l'échelle de la parcelle, voire de l'exploitation, nécessiteraient le recours à de fortes quantités de Si qui entraînerait des pollutions environnementales liées à son extraction, son transport ainsi que son épandage. Compte tenu du fait que le Si est le deuxième élément le plus abondant au sein de la croûte terrestre, il apparaît opportun de rechercher des stratégies permettant d'augmenter la disponibilité de sa

forme absorbable par les plantes à partir des réserves de Si amorphe présent dans les sols.

- Les plantes fortement accumulatrices sont-elles capables de rendre disponible et d'absorber du Si à partir d'un pool de Si amorphe du sol ? Dans la littérature, cette hypothèse est souvent avancée mais n'a jusqu'alors jamais été démontrée. Par conséquent, un ensemble d'expérimentations pourra être réalisé afin de confirmer ou d'infirmer tout ou partie de cette dernière. Dans un premier temps, une expérimentation consistant à cultiver du colza (faible accumulateur de Si) et du maïs (*Zea mays* L., fort accumulateur de Si) en monoculture sur un substrat stérile et riche en Si amorphe (environ 90 %, sable) permettra de vérifier, en réalisant le dosage du Si *in planta*, que le maïs est plus à même que le colza de rendre disponible et d'absorber du Si à partir de ces réserves en Si amorphe. Le cas échéant, dans un deuxième temps, une autre expérimentation pourra être réalisée en cultivant le maïs en association avec le colza afin de vérifier si la présence de ce fort accumulateur engendre une augmentation de la teneur en Si du colza en favorisant sa disponibilité au niveau de la rhizosphère.

- Les plantes fortement accumulatrices de Si exsudent-elles des composés capables d'augmenter la disponibilité de Si absorbable au niveau de la rhizosphère ? L'hypothèse selon laquelle certaines plantes seraient capables d'exsuder des composés racinaires capables de modifier le pH de la rhizosphère et ainsi d'augmenter la part de Si absorbable a été formulée par [Epstein, 2001] mais n'a, à ce jour, jamais été validée. Ainsi, une expérience pourrait consister à collecter périodiquement des exsudats racinaires à partir de jeunes plantes de maïs et de colza (en monoculture) cultivées en conditions stériles. Des analyses métabolomiques et protéomiques comparatives de ces exsudats seront ensuite réalisées afin d'identifier d'éventuels composés/enzymes (par exemple, la silicase) capables d'augmenter la disponibilité du Si assimilable par les plantes. Si de tels composés sont identifiés, des apports exogènes de ces derniers pourront être réalisés chez des plantes de colza cultivées sur sable afin de vérifier si cet apport s'accompagne d'une augmentation du prélèvement racinaire de Si à partir du stock de Si amorphe du sable.

- Des populations bactériennes spécifiques sont-elles à l'origine du fort prélèvement de Si par les plantes accumulatrices ? Il n'est pas à exclure que la meilleure absorption de Si par les plantes accumulatrices (maïs) puisse également résulter de la présence d'une flore microbienne spécifique. En effet, il a été récemment montré, dans la rhizosphère du riz, l'existence de bactéries silicolytiques présentant une activité enzymatique (silicase) qui permet de rendre disponible le Si amorphe [Kang *et al.*, 2017, Pastore *et al.*, 2020]. Ainsi, des expérimentations pourront être conduites afin de caractériser la flore microbienne présente dans les sols sur lesquels sont cultivés des plantes de colza et de maïs en monoculture, ne recevant aucun apport de Si. Ces expérimentations, faisant appel à des approches de microbiologie du sol, pourront être réalisées en partenariat avec une équipe de recherche ayant

ces compétences, comme par exemple, l'unité AGHYLE d'UniLaSalle de Rouen. Si des communautés bactériennes silicolytiques sont identifiées dans la rhizosphère du maïs, l'effet d'un apport exogène d'exsudats caractérisés ci-dessus pourra être réalisé sur un sol nu afin de confirmer leur potentiel impact sur la composition de la microflore et en particulier sur la croissance de bactéries silicolytiques.

Bibliographie

[Aarabi *et al.*, 2020] Aarabi, F., Naake, T., Fernie, A. R. et Hoefgen, R. (2020). Coordinating Sulfur Pools under Sulfate Deprivation. *Trends in Plant Science*, 25(12) : 1227–1239.

[Aas *et al.*, 2019] Aas, W., Mortier, A., Bowersox, V., Cherian, R., Faluvegi, G., Fagerli, H., Hand, J., Klimont, Z., Galy-Lacaux, C., Lehmann, C. M. B., Myhre, C. L., Myhre, G., Olivié, D., Sato, K., Quaas, J., Rao, P. S. P., Schulz, M., Shindell, D., Skeie, R. B., Stein, A., Takemura, T., Tsyro, S., Vet, R. et Xu, X. (2019). Global and regional trends of atmospheric sulfur. *Scientific Reports*, 9(1) :953.

[Abdallah *et al.*, 2011] Abdallah, M., Etienne, P., Ourry, A. et Meuriot, F. (2011). Do initial S reserves and mineral S availability alter leaf S-N mobilization and leaf senescence in oilseed rape ? *Plant Science*, 180(3) :511–520.

[Ahanger *et al.*, 2020] Ahanger, M. A., Bhat, J. A., Siddiqui, M. H., Rinklebe, J. et Ahmad, P. (2020). Integration of silicon and secondary metabolites in plants : a significant association in stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 71(21) :6758–6774.

[Akhter *et al.*, 2022] Akhter, M., Noreen, S., Ummara, U., Aqeel, M., Saleem, N., Ahmed, M., Mahmood, S., Athar, H.-u.-R., Alyemeni, M., Kaushik, P. et Ahmad, P. (2022). Silicon-Induced Mitigation of NaCl Stress in Barley (Hordeum vulgare L.), Associated with Enhanced Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidant Activities. *Plants*, 11(18) : 2379.

[Alam *et al.*, 2015] Alam, F., Kim, T. Y., Kim, S. Y., Alam, S. S., Pramanik, P., Kim, P. J. et Lee, Y. B. (2015). Effect of molybdenum on nodulation, plant yield and nitrogen uptake in hairy vetch (*Vicia villosa* Roth). *Soil Science and Plant Nutrition*, 61(4) :664–675.

[Alamri *et al.*, 2020] Alamri, S., Hu, Y., Mukherjee, S., Aftab, T., Fahad, S., Raza, A., Ahmad, M. et Siddiqui, M. H. (2020). Silicon-induced postponement of leaf senescence is accompanied by modulation of antioxidative defense and ion homeostasis in mustard (Brassica juncea) seedlings exposed to salinity and drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 157 :47–59.

[Ali *et al.*, 2020] Ali, N., Réthoré, E., Yvin, J.-C. et Hosseini, S. A. (2020). The Regulatory Role of Silicon in Mitigating Plant Nutritional Stresses. *Plants*, 9(12) :1779.

[Araújo *et al.*, 2022] Araújo, W. B. S., Teixeira, G. C. M., De Mello Prado, R. et Rocha, A. M. S. (2022). Silicon mitigates nutritional stress of nitrogen, phosphorus, and calcium deficiency in two forages plants. *Scientific Reports*, 12(1) :6611.

[Arkoun *et al.*, 2012] Arkoun, M., Sarda, X., Jannin, L., Laîné, P., Etienne, P., Garcia-Mina, J.-M., Yvin, J.-C. et Ourry, A. (2012). Hydroponics versus field lysimeter studies of urea, ammonium and nitrate uptake by oilseed rape (brassica napus l.). *J. Exp. Bot.*, 63(14) :5245–5258.

[Avice et Etienne, 2014a] Avice, J.-C. et Etienne, P. (2014a). Leaf senescence and nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape (Brassica napus L.). *Journal of Experimental Botany*, 65(14) :3813–3824.

[Avice et Etienne, 2014b] Avice, J.-C. et Etienne, P. (2014b). Leaf senescence and nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape (Brassica napus L.). *Journal of Experimental Botany*, 65(14) :3813–3824.

[Bakhat *et al.*, 2018] Bakhat, H. F., Bibi, N., Zia, Z., Abbas, S., Hammad, H. M., Fahad, S., Ashraf, M. R., Shah, G. M., Rabbani, F. et Saeed, S. (2018). Silicon mitigates biotic stresses in crop plants : A review. *Crop Protection*, 104 :21–34.

[Bandara *et al.*, 2018] Bandara, N., Akbari, A., Esparza, Y. et Wu, J. (2018). Canola Protein : A Promising Protein Source for Delivery, Adhesive, and Material Applications. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 95(8) :1075–1090.

[Becana *et al.*, 2018] Becana, M., Wienkoop, S. et Matamoros, M. A. (2018). Sulfur Transport and Metabolism in Legume Root Nodules. *Frontiers in Plant Science*, 9.

[Beier *et al.*, 2022] Beier, S., Marella, N. C., Yvin, J.-C., Hosseini, S. A. et Von Wirén, N. (2022). Silicon mitigates potassium deficiency by enhanced remobilization and modulated potassium transporter regulation. *Environmental and Experimental Botany*, 198 :104849.

[Benoît, 2013] Benoît, M. (2013). *17. Pollutions agricoles*, page 244245. CNRS Éditions.

[Bielecka *et al.*, 2015] Bielecka, M., Watanabe, M., Morcuende, R., Scheible, W.-R., Hawkesford, M. J., Hesse, H. et Hoefgen, R. (2015). Transcriptome and metabolome analysis of plant sulfate starvation and resupply provides novel information on transcriptional regulation of metabolism associated with sulfur, nitrogen and phosphorus nutritional responses in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 5.

[Billard *et al.*, 2014] Billard, V., Etienne, P., Jannin, L., Garnica, M., Cruz, F., Garcia-Mina, J.-M., Yvin, J.-C. et Ourry, A. (2014). Two biostimulants derived from algae or humic acid induce similar responses in the mineral content and gene expression of winter oilseed rape (brassica napus l.). *J. Plant Growth Regul.*, 33(2) :305–316.

[Bin *et al.*, 2017] Bin, P., Huang, R. et Zhou, X. (2017). Oxidation Resistance of the Sulfur Amino Acids : Methionine and Cysteine. *BioMed Research International*, 2017 :1–6.

[Bindea *et al.*, 2009] Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.-H., Pagès, F., Trajanoski, Z. et Galon, J. (2009). ClueGO : a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*, 25(8) :1091–1093.

[Blake-Kalff *et al.*, 2001] Blake-Kalff, M. M. A., Zhao, F., Hawkesford, M. J. et McGRATH, S. P. (2001). Using plant analysis to predict yield losses caused by sulphur deficiency. *Annals of Applied Biology*, 138(1) :123–127.

[Bolanos *et al.*, 1996] Bolanos, L., Brewin, N. J. et Bonilla, I. (1996). Effects of Boron on Rhizobium-Legume Cell-Surface Interactions and Nodule Development. *Plant Physiology*, 110(4) :1249–1256.

[Bouaid *et al.*, 2009] Bouaid, A., Martinez, M. et Aracil, J. (2009). Production of biodiesel from bioethanol and Brassica carinata oil : Oxidation stability study. *Bioresource Technology*, 100(7) :2234–2239.

[Bouchet *et al.*, 2016] Bouchet, A.-S., Laperche, A., Bissuel-Belaygue, C., Snowdon, R., Nesi, N. et Stahl, A. (2016). Nitrogen use efficiency in rapeseed. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 36(2) :38.

[Bradford, 1976] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2) :248–254.

[Breitenmoser *et al.*, 2022] Breitenmoser, S., Steinger, T., Baux, A. et Hiltpold, I. (2022). Intercropping Winter Oilseed Rape (Brassica napus L.) Has the Potential to Lessen the Impact of the Insect Pest Complex. *Agronomy*, 12(3) :723.

[Buchelt *et al.*, 2020] Buchelt, A. C., Teixeira, G. C. M., Oliveira, K. S., Rocha, A. M. S., De Mello Prado, R. et Caione, G. (2020). Silicon Contribution Via Nutrient Solution in Forage Plants to Mitigate Nitrogen, Potassium, Calcium, Magnesium, and Sulfur Deficiency. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20(3) :1532–1548.

[Bukhari *et al.*, 2021] Bukhari, M. A., Sharif, M. S., Ahmad, Z., Barutçular, C., Afzal, M., Hossain, A. et Sabagh, A. E. (2021). Silicon Mitigates the Adverse Effect of Drought in Canola (Brassica napus l.) Through Promoting the Physiological and Antioxidants Activity. *Silicon*, 13(11) :3817–3826.

[Cadoux *et al.*, 2015] Cadoux, S., Sauzet, G., Valantin-Morison, M., Pontet, C., Champolivier, L., Robert, C., Lieven, J., Flénet, F., Mangenot, O., Fauvin, P. et Landé, N. (2015). Intercropping frost-sensitive legume crops with winter oilseed rape reduces weed competition, insect damage, and improves nitrogen use efficiency. *OCL*, 22(3) : D302.

[Chandra et Pandey, 2014] Chandra, N. et Pandey, N. (2014). Influence of Sulfur Induced Stress on Oxidative Status and Antioxidative Machinery in Leaves of *Allium cepa* L. *International Scholarly Research Notices*, 2014 :1–9.

[Chardon *et al.*, 2012] Chardon, F., Noël, V. et Masclaux-Daubresse, C. (2012). Exploring NUE in crops and in Arabidopsis ideotypes to improve yield and seed quality. *Journal of Experimental Botany*, 63(9) :3401–3412.

[Chew, 2020] Chew, S. C. (2020). Cold-pressed rapeseed (Brassica napus) oil : Chemistry and functionality. *Food Research International*, 131 :108997.

[Chouard, 1960] Chouard, P. (1960). Vernalization and its Relations to Dormancy. *Annual Review of Plant Physiology*, 11(1) :191–238.

[Chung *et al.*, 2020] Chung, Y. S., Kim, K.-S., Hamayun, M. et Kim, Y. (2020). Silicon Confers Soybean Resistance to Salinity Stress Through Regulation of Reactive Oxygen and Reactive Nitrogen Species. *Frontiers in Plant Science*, 10.

[Chèvre *et al.*, 1998] Chèvre, A.-M., Eber, F., Baranger, A., Vallée, P., Pierre, J. et Renard, M. (1998). Impact de la transformation génétique du colza. *Cahiers Agricultures*, 7(6) :525530 (1).

[Chérif *et al.*, 1994] Chérif, M., Asselin, A., Bélanger, R. et others (1994). Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by Pythium spp. *Phytopathology*, 84(3) :236–242. Publisher : St. Paul.

[Clarke *et al.*, 2014] Clarke, V. C., Loughlin, P. C., Day, D. A. et Smith, P. M. C. (2014). Transport processes of the legume symbiosome membrane. *Frontiers in Plant Science*, 5.

[Colnenne, 1998] Colnenne, C. (1998). Determination of a Critical Nitrogen Dilution Curve for Winter Oilseed Rape. *Annals of Botany*, 81(2) :311–317.

[Conceição *et al.*, 2019] Conceição, S. S., Oliveira Neto, C. F. d., Marques, E. C., Barbosa, A. V. C., Galvão, J. R., Oliveira, T. B. d., Okumura, R. S., Martins, J. T. d. S., Costa, T. C. et Gomes-Filho, E. (2019). Silicon modulates the activity of antioxidant enzymes and nitrogen compounds in sunflower plants under salt stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 65(9) :1237–1247.

[Coquerel *et al.*, 2023] Coquerel, R., Mustapha Arkoun, Quentin Dupas, Fanny Leroy, Philippe Laîné et Philippe Étienne (2023). Silicon Supply Improves Nodulation and Dinitrogen Fixation and Promotes Growth in Trifolium incarnatum Subjected to a Long-Term Sulfur Deprivation. *Plants*, 12(12) :2248–2248. MAG ID : 4379987716 S2ID : 6f66e29551166e8522204d7b74f84a5f3c7d5010.

[Coronado *et al.*, 2009] Coronado, C. R., de Carvalho, J. A. et Silveira, J. L. (2009). Biodiesel co2 emissions : A comparison with the main fuels in the brazilian market. *Fuel Processing Technology*, 90(2) :204–211.

[Corre-Hellou *et al.*, 2006] Corre-Hellou, G., Fustec, J. et Crozat, Y. (2006). Interspecific competition for soil N and its interaction with N2 fixation, leaf expansion and crop growth in pea–barley intercrops. *Plant Soil*, 282(1-2) :195–208.

[Coskun *et al.*, 2019] Coskun, D., Deshmukh, R., Sonah, H., Menzies, J. G., Reynolds, O., Ma, J. F., Kronzucker, H. J. et Bélanger, R. R. (2019). The controversies of silicon's role in plant biology. *New Phytologist*, 221(1) :67–85.

[Courbet *et al.*, 2021a] Courbet, G., D'Oria, A., Lornac, A., Diquélou, S., Pluchon, S., Arkoun, M., Koprivova, A., Kopriva, S., Etienne, P. et Ourry, A. (2021a). Specificity and Plasticity of the Functional Ionome of Brassica napus and Triticum aestivum Subjected to Macronutrient Deprivation. *Frontiers in Plant Science*, 12 :641648.

[Courbet *et al.*, 2021b] Courbet, G., D'Oria, A., Maillard, A., Jing, L., Pluchon, S., Arkoun, M., Pateyron, S., Paysant Le Roux, C., Diquélou, S., Ourry, A., Trouverie, J. et Etienne, P. (2021b). Comparative Omics Analysis of Brassica napus Roots Subjected to Six Individual Macronutrient Deprivations Reveals Deficiency-Specific Genes and Metabolomic Profiles. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21) :11679.

[Cristofano *et al.*, 2021] Cristofano, F., El-Nakhel, C. et Rouphael, Y. (2021). Biostimulant Substances for Sustainable Agriculture : Origin, Operating Mechanisms and Effects on Cucurbits, Leafy Greens, and Nightshade Vegetables Species. *Biomolecules*, 11(8) :1103.

[De Bang *et al.*, 2021] De Bang, T. C., Husted, S., Laursen, K. H., Persson, D. P. et Schjoerring, J. K. (2021). The molecularphysiological functions of mineral macronutrients and their consequences for deficiency symptoms in plants. *New Phytologist*, 229(5) :2446–2469.

[De Vries, 2021] De Vries, W. (2021). Impacts of nitrogen emissions on ecosystems and human health : A mini review. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 21 :100249.

[Dechaumet, 2018] Dechaumet, S. (2018). *Dissection métabolique de la sénescence foliaire et de la remobilisation des nutriments chez le colza (Brassica napus)*. Theses, Agrocampus Ouest.

[Dejoux *et al.*, 2000] Dejoux, J.-F., Recous, S., Meynard, J.-M., Trinsoutrot, I. et Leterme, P. (2000). The fate of nitrogen from winter-frozen rapeseed leaves : Mineralization, fluxes to the environment and uptake by rapeseed crop in spring. *Plant and Soil*, 218/2(1/2) :257–272.

[Del Cerro *et al.*, 2019] Del Cerro, P., Megías, M., López-Baena, F. J., Gil-Serrano, A., Pérez-Montaño, F. et Ollero, F. J. (2019). Osmotic stress activates nif and fix genes and induces the Rhizobium tropici CIAT 899 Nod factor production via NodD2 by upregulation of the nodA2 operon and the nodA3 gene. *PLOS ONE*, 14(3) :e0213298.

[Dellagi *et al.*, 2020] Dellagi, A., Quillere, I. et Hirel, B. (2020). Beneficial soil-borne bacteria and fungi : a promising way to improve plant nitrogen acquisition. *Journal of Experimental Botany*, 71(15) :4469–4479.

[Demichev *et al.*, 2020] Demichev, V., Messner, C. B., Vernardis, S. I., Lilley, K. S. et Ralser, M. (2020). DIA-NN : neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. *Nature Methods*, 17(1) :41–44.

[Detmann *et al.*, 2012] Detmann, K. C., Araújo, W. L., Martins, S. C. V., Sanglard, L. M. V. P., Reis, J. V., Detmann, E., Rodrigues, F. ., NunesNesi, A., Fernie, A. R. et DaMatta, F. M. (2012). Silicon nutrition increases grain yield, which, in turn, exerts a feedforward stimulation of photosynthetic rates via enhanced mesophyll conductance and alters primary metabolism in rice. *New Phytologist*, 196(3) :752–762.

[D'Hooghe *et al.*, 2014] D'Hooghe, P., Dubousset, L., Gallardo, K., Kopriva, S., Avice, J.-C. et Trouverie, J. (2014). Evidence for Proteomic and Metabolic Adaptations

Associated with Alterations of Seed Yield and Quality in Sulfur-limited Brassica napus L. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(5) :1165–1183.

[D'Hooghe *et al.*, 2013] D'Hooghe, P., Escamez, S., Trouverie, J. et Avice, J.-C. (2013). Sulphur limitation provokes physiological and leaf proteome changes in oilseed rape that lead to perturbation of sulphur, carbon and oxidative metabolisms. *BMC Plant Biology*, 13(1) :23.

[Diago *et al.*, 2016] Diago, M., Rey-Carames, C., Le Moigne, M., Fadaili, E., Tardaguila, J. et Cerovic, Z. (2016). Calibration of non-invasive fluorescence-based sensors for the manual and on-the-go assessment of grapevine vegetative status in the field : Non-invasive sensing of grapevine vegetative status. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22(3) :438–449.

[Dos Santos Sarah *et al.*, 2021] Dos Santos Sarah, M. M., De Mello Prado, R., De Souza Júnior, J. P., Teixeira, G. C. M., Dos Santos Duarte, J. C. et De Medeiros, R. L. S. (2021). Silicon supplied via foliar application and root to attenuate potassium deficiency in common bean plants. *Scientific Reports*, 11(1) :19690.

[du Jardin, 2015] du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants : Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196 :3–14.

[Dubreuil-Maurizi *et al.*, 2011] Dubreuil-Maurizi, C., Vitecek, J., Marty, L., Branciard, L., Frettinger, P., Wendehenne, D., Meyer, A. J., Mauch, F. et Poinssot, B. (2011). Glutathione Deficiency of the Arabidopsis Mutant *pad2-1* Affects Oxidative Stress-Related Events, Defense Gene Expression, and the Hypersensitive Response. *Plant Physiology*, 157(4) :2000–2012.

[Duchene *et al.*, 2017] Duchene, O., Vian, J.-F. et Celette, F. (2017). Intercropping with legume for agroecological cropping systems : Complementarity and facilitation processes and the importance of soil microorganisms. a review. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 240 :148–161.

[El Moukhtari *et al.*, 2022a] El Moukhtari, A., Cabassa-Hourton, C., Crilat, E., Carol, P., Lamsaadi, N., Hidri, R., Farissi, M. et Savouré, A. (2022a). Salt Stress is Alleviated by Either Proline or Silicon But Not by Their Combination in Alfalfa (Medicago sativa L.) Inoculated with a Salt-Tolerant Ensifer meliloti Strain. *Journal of Plant Growth Regulation*.

[El Moukhtari *et al.*, 2021] El Moukhtari, A., Carol, P., Mouradi, M., Savoure, A. et Farissi, M. (2021). Silicon improves physiological, biochemical, and morphological adaptations of alfalfa (Medicago sativa L.) during salinity stress. *Symbiosis*, 85(3) : 305–324.

[El Moukhtari *et al.*, 2022b] El Moukhtari, A., Ksiaa, M., Zorrig, W., Cabassa, C., Abdelly, C., Farissi, M. et Savoure, A. (2022b). How Silicon Alleviates the Effect of Abiotic Stresses During Seed Germination : A Review. *Journal of Plant Growth Regulation*.

[El Moukhtari *et al.*, 2024] El Moukhtari, A., Lamsaadi, N., Cabassa, C., Farissi, M. et Savouré, A. (2024). Molecular Approaches to Improve Legume Salt Stress Tolerance. *Plant Molecular Biology Reporter*.

[El Moukhtari *et al.*, 2022c] El Moukhtari, A., Lamsaadi, N., Oubenali, A., Mouradi, M., Savoure, A. et Farissi, M. (2022c). Exogenous Silicon Application Promotes Tolerance of Legumes and Their N2 Fixing Symbiosis to Salt Stress. *Silicon*, 14(12) :6517–6534.

[Engels, C et Marschner, H., 1995] Engels, C et Marschner, H. (1995). Plant uptake and utilization of nitrogen. *In Nitrogen Fertilization in the Environment*, pages 41–81.

[Epstein, 1994] Epstein, E. (1994). The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1) :11–17.

[Epstein, 1999] Epstein, E. (1999). SILICON. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1) :641–664.

[Epstein, 2001] Epstein, E. (2001). Chapter 1 silicon in plants : Facts vs. concepts. *In* Datnoff, L., Snyder, G. et Korndörfer, G., éditeurs : *Silicon in Agriculture*, volume 8 de *Studies in Plant Science*, pages 1–15. Elsevier.

[Epstein, 2009] Epstein, E. (2009). Plant nutrition, plant stress, and plant silicon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular & Integrative Physiology*, 153(2) :S185–S186.

[Etesami et Adl, 2020] Etesami, H. et Adl, S. M. (2020). Can interaction between silicon and nonrhizobial bacteria help in improving nodulation and nitrogen fixation in salinitystressed legumes ? A review. *Rhizosphere*, 15 :100229.

[Etienne *et al.*, 2018] Etienne, P., Sorin, E., Maillard, A., Gallardo, K., Arkoun, M., Guerrand, J., Cruz, F., Yvin, J.-C. et Ourry, A. (2018). Assessment of Sulfur Deficiency under Field Conditions by Single Measurements of Sulfur, Chloride and Phosphorus in Mature Leaves. *Plants*, 7(2) :37.

[Etienne *et al.*, 2021] Etienne, P., Trouverie, J., Haddad, C., Arkoun, M., Yvin, J.-C., Caïus, J., Brunaud, V. et Laîné, P. (2021). Root Silicon Treatment Modulates the Shoot Transcriptome in Brassica napus L. and in Particular Upregulates Genes Related to Ribosomes and Photosynthesis. *Silicon*, 13(11) :4047–4055.

[Feinberg *et al.*, 2021] Feinberg, A., Stenke, A., Peter, T., Hinckley, E.-L. S., Driscoll, C. T. et Winkel, L. H. E. (2021). Reductions in the deposition of sulfur and selenium to agricultural soils pose risk of future nutrient deficiencies. *Communications Earth & Environment*, 2(1) :101.

[Feng *et al.*, 2021] Feng, Y., Hu, Y., Fang, P., Zuo, X., Wang, J., Li, J., Qian, W. et Mei, J. (2021). Silicon Alleviates the Disease Severity of Sclerotinia Stem Rot in Rapeseed. *Frontiers in Plant Science*, 12 :721436.

[Fischer et Kessler, 2015] Fischer, R. et Kessler, B. M. (2015). Gelaided sample preparation (GASP)A simplified method for gelassisted proteomic sample generation from protein extracts and intact cells. *PROTEOMICS*, 15(7) :1224–1229.

[Freitas *et al.*, 2022] Freitas, V. F. D., Cerezini, P., Hungria, M. et Nogueira, M. A. (2022). Strategies to deal with drought-stress in biological nitrogen fixation in soybean. *Applied Soil Ecology*, 172 :104352.

[Fustec *et al.*, 2010] Fustec, J., Lesuffleur, F., Mahieu, S. et Cliquet, J.-B. (2010). Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30(1) :57–66.

[Gao *et al.*, 2016] Gao, Y., Li, X., Tian, Q.-Y., Wang, B.-L. et Zhang, W.-H. (2016). Sulfur deficiency had different effects on *Medicago truncatula* ecotypes A17 and R108 in terms of growth, root morphology and nutrient contents. *Journal of Plant Nutrition*, 39(3) :301–314.

[Gao *et al.*, 2012] Gao, Y., Yu, G., Luo, C. et Zhou, P. (2012). Groundwater Nitrogen Pollution and Assessment of Its Health Risks : A Case Study of a Typical Village in Rural-Urban Continuum, China. *PLoS ONE*, 7(4) :e33982.

[Garcia Costas *et al.*, 2017] Garcia Costas, A. M., Poudel, S., Miller, A.-F., Schut, G. J., Ledbetter, R. N., Fixen, K. R., Seefeldt, L. C., Adams, M. W. W., Harwood, C. S., Boyd, E. S. et Peters, J. W. (2017). Defining Electron Bifurcation in the Electron-Transferring Flavoprotein Family. *Journal of Bacteriology*, 199(21).

[García-Rodríguez et Toro, 2000] García-Rodríguez, F. M. et Toro, N. (2000). Sinorhizobium meliloti nfe (Nodulation Formation Efficiency) Genes Exhibit Temporal and Spatial Expression Patterns Similar to Those of Genes Involved in Symbiotic Nitrogen Fixation. *Molecular Plant-Microbe Interactionső*, 13(6) :583–591.

[Ge *et al.*, 2020] Ge, S. X., Jung, D. et Yao, R. (2020). ShinyGO : a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*, 36(8) :2628–2629.

[Genard, 2016] Genard, T. (2016). *Potentiel agronomique et environnemental des associations Fabacées-colza*. Thèse de doctorat. Thèse de doctorat dirigée par Lainé, Philippe Physiologie, biologie des organismes, popilations, interactions Caen 2016.

[Gigolashvili et Kopriva, 2014] Gigolashvili, T. et Kopriva, S. (2014). Transporters in plant sulfur metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 5.

[Girondé *et al.*, 2015a] Girondé, A., Etienne, P., Trouverie, J., Bouchereau, A., Le Cahérec, F., Leport, L., Orsel, M., Niogret, M.-F., Nesi, N., Carole, D., Soulay, F., Masclaux-Daubresse, C. et Avice, J.-C. (2015a). The contrasting N management of two oilseed rape genotypes reveals the mechanisms of proteolysis associated with leaf N remobilization and the respective contributions of leaves and stems to N storage and remobilization during seed filling. *BMC Plant Biology*, 15(1) :59.

[Girondé *et al.*, 2015b] Girondé, A., Poret, M., Etienne, P., Trouverie, J., Bouchereau, A., Le Cahérec, F., Leport, L., Orsel, M., Niogret, M.-F., Deleu, C. et Avice, J.-C. (2015b). A profiling approach of the natural variability of foliar N remobilization at the rosette stage gives clues to understand the limiting processes involved in the low N use efficiency of winter oilseed rape. *Journal of Experimental Botany*, 66(9) :2461–2473.

[Glick, 2012] Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria : Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 2012 :1–15.

[González-Guerrero *et al.*, 2014] González-Guerrero, M., Matthiadis, A., Sáez, . et Long, T. A. (2014). Fixating on metals : new insights into the role of metals in nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *Frontiers in Plant Science*, 5.

[Good *et al.*, 2007] Good, A. G., Johnson, S. J., De Pauw, M., Carroll, R. T., Savidov, N., Vidmar, J., Lu, Z., Taylor, G. et Stroeher, V. (2007). Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase. *Canadian Journal of Botany*, 85(3) :252–262.

[Good *et al.*, 2004] Good, A. G., Shrawat, A. K. et Muench, D. G. (2004). Can less yield more ? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production ? *Trends in Plant Science*, 9(12) :597–605.

[Gou *et al.*, 2023] Gou, X., Reich, P. B., Qiu, L., Shao, M., Wei, G., Wang, J. et Wei, X. (2023). Leguminous plants significantly increase soil nitrogen cycling across global climates and ecosystem types. *Global Change Biology*, 29(14) :4028–4043.

[Grant *et al.*, 2012] Grant, C., Mahli, S. et Karamanos, R. (2012). Sulfur management for rapeseed. *Field Crops Research*, 128 :119–128.

[Gulati, 1979] Gulati, S. L. (1979). New nonsynthetic medium forRhizobium culture production from wastes. *Biotechnology and Bioengineering*, 21(9) :1507–1515.

[Génard *et al.*, 2017a] Génard, T., Etienne, P., Diquélou, S., Yvin, J.-C., Revellin, C. et Laîné, P. (2017a). Rapeseed-legume intercrops : plant growth and nitrogen balance in early stages of growth and development. *Heliyon*, 3(3) :e00261.

[Génard *et al.*, 2016] Génard, T., Etienne, P., Laîné, P., Yvin, J.-C. et Diquélou, S. (2016). Nitrogen transfer from Lupinus albus L., Trifolium incarnatum L. and Vicia sativa L. contribute differently to rapeseed (Brassica napus L.) nitrogen nutrition. *Heliyon*, 2(9) :e00150.

[Génard *et al.*, 2017b] Génard, T., Laîné, P., Diquélou, S., Nési, N., Yvin, J.-C. et Etienne, P. (2017b). Impact of sulfur applications on the agronomic performance of rapeseedclover mixtures. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 180(6) :676–682.

[Haddad, 2018] Haddad, C. (2018). *Effet d'un rapport de Sillicium sur la senescence foliaire et les performances agronomiques du colza*. Theses, Normandie Université.

[Haddad *et al.*, 2018] Haddad, C., Arkoun, M., Jamois, F., Schwarzenberg, A., Yvin, J.-C., Etienne, P. et Laîné, P. (2018). Silicon Promotes Growth of Brassica napus L. and Delays Leaf Senescence Induced by Nitrogen Starvation. *Frontiers in Plant Science*, 9 :516.

[Haddad *et al.*, 2019] Haddad, C., Trouverie, J., Arkoun, M., Yvin, J.-C., Caïus, J., Brunaud, V., Laîné, P. et Etienne, P. (2019). Silicon supply affects the root transcriptome of Brassica napus L. *Planta*, 249(5) :1645–1651.

[Hasanuzzaman *et al.*, 2018a] Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Anee, T., Khan, M. et Fujita, M. (2018a). Silicon-mediated regulation of antioxidant defense and glyoxalase systems confers drought stress tolerance in Brassica napus L. *South African Journal of Botany*, 115 :50–57.

[Hasanuzzaman *et al.*, 2018b] Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Rohman, M. M., Anee, T. I., Huang, Y. et Fujita, M. (2018b). Exogenous Silicon Protects Brassica napus Plants from Salinity-Induced Oxidative Stress Through the Modulation of AsA-GSH Pathway, Thiol-Dependent Antioxidant Enzymes and Glyoxalase Systems. *Gesunde Pflanzen*, 70(4) :185–194.

[Hauggaard-Nielsen et Jensen, 2001] Hauggaard-Nielsen, H. et Jensen, E. (2001). Evaluating pea and barley cultivars for complementarity in intercropping at different levels of soil N availability. *Field Crops Research*, 72(3) :185–196.

[Hellequin, 2019] Hellequin, E. (2019). *Effets des biostimulants sur le fonctionnement biologique de sols d'agrosystèmes : réponses des communautés microbiennes et dynamique de minéralisation du carbone organique*. Theses, Université de Rennes.

[Hoesly *et al.*, 2018] Hoesly, R. M., Smith, S. J., Feng, L., Klimont, Z., Janssens-Maenhout, G., Pitkanen, T., Seibert, J. J., Vu, L., Andres, R. J., Bolt, R. M., Bond, T. C., Dawidowski, L., Kholod, N., Kurokawa, J.-i., Li, M., Liu, L., Lu, Z., Moura, M. C. P., O'Rourke, P. R. et Zhang, Q. (2018). Historical (17502014) anthropogenic emissions of reactive gases and aerosols from the Community Emissions Data System (CEDS). *Geoscientific Model Development*, 11(1) :369–408.

[Hu *et al.*, 2020] Hu, A. Y., Xu, S. N., Qin, D. N., Li, W. et Zhao, X. Q. (2020). Role of Silicon in Mediating Phosphorus Imbalance in Plants. *Plants*, 10(1) :51.

[Ito *et al.*, 2022] Ito, T., Kitaiwa, T., Nishizono, K., Umahashi, M., Miyaji, S., Agake, S., Kuwahara, K., Yokoyama, T., Fushinobu, S., MaruyamaNakashita, A., Sugiyama, R., Sato, M., Inaba, J., Hirai, M. Y. et OhkamaOhtsu, N. (2022). Glutathione degradation activity of glutamyl peptidase 1 manifests its dual roles in primary and secondary sulfur metabolism in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 111(6) :1626–1642.

[Jamal *et al.*, 2010] Jamal, A., Moon, Y.-S. et Abdin, M. (2010). Sulphur-a general overview and interaction with nitrogen. *Australian Journal of Crop Science*, 4 :523–529.

[Jamont *et al.*, 2014] Jamont, M., Dubois-Pot, C. et Jaloux, B. (2014). Nectar provisioning close to host patches increases parasitoid recruitment, retention and host parasitism. *Basic Appl. Ecol.*, 15(2) :151–160.

[Jamont *et al.*, 2013] Jamont, M., Piva, G. et Fustec, J. (2013). Sharing N resources in the early growth of rapeseed intercropped with faba bean : does N transfer matter ? *Plant and Soil*, 371(1-2) :641–653.

[Jannin, 2012] Jannin, L. (2012). *Caractérisation des modifications physiologiques et métaboliques induites chez Brassica napus L. Par l'apport d'extraits algaux ou d'acides humiques : Thèse soutenue sur un ensemble de travaux*. Thèse de doctorat. Thèse de doctorat dirigée par Ourry, Alain Physiologie, biologie des organismes, populations, interactions Caen 2012.

[Jensen, 1996] Jensen, E. S. (1996). Grain yield, symbiotic N2 fixation and interspecific competition for inorganic N in pea-barley intercrops. *Plant Soil*, 182(1) :25–38.

[Kabir *et al.*, 2020] Kabir, A. H., Debnath, T., Das, U., Prity, S. A., Haque, A., Rahman, M. M. et Parvez, M. S. (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate Fe-deficiency symptoms in sunflower by increasing iron uptake and its availability along with antioxidant defense. *Plant Physiology and Biochemistry*, 150 :254–262.

[Kandhol *et al.*, 2024] Kandhol, N., Rai, P., Mishra, V., Pandey, S., Kumar, S., Deshmukh, R., Sharma, S., Singh, V. P. et Tripathi, D. K. (2024). Silicon regulates phosphate deficiency through involvement of auxin and nitric oxide in barley roots. *Planta*, 259(6) :144.

[Kang *et al.*, 2017] Kang, S.-M., Waqas, M., Shahzad, R., You, Y.-H., Asaf, S., Khan, M. A., Lee, K.-E., Joo, G.-J., Kim, S.-J. et Lee, I.-J. (2017). Isolation and characterization of a novel silicate-solubilizing bacterial strain burkholderia eburnea cs4-2 that promotes growth of japonica rice (oryza sativa l. cv. dongjin). *Soil Science and Plant Nutrition*, 63(3) :233–241.

[Karagiannis *et al.*, 2021] Karagiannis, E., Michailidis, M., Skodra, C., Molassiotis, A. et Tanou, G. (2021). Silicon influenced ripening metabolism and improved fruit quality traits in apples. *Plant Physiology and Biochemistry*, 166 :270–277.

[Karmoker *et al.*, 1991] Karmoker, J., Clarkson, D., Saker, L., Rooney, J. et Purves, J. (1991). Sulphate deprivation depresses the transport of nitrogen to the xylem and the hydraulic conductivity of barley (Hordeum vulgare L.) roots. *Planta*, 185(2).

[Kaur et Greger, 2019] Kaur, H. et Greger, M. (2019). A Review on Si Uptake and Transport System. *Plants*, 8(4) :81.

[Ke *et al.*, 2024] Ke, X., Xiao, H., Peng, Y., Xia, X. et Wang, X. (2024). Nitrogen deficiency modulates carbon allocation to promote nodule nitrogen fixation capacity in soybean. *Exploration*, 4(2) :20230104.

[Kebede, 2021] Kebede, E. (2021). Contribution, Utilization, and Improvement of Legumes-Driven Biological Nitrogen Fixation in Agricultural Systems. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5 :767998.

[Kim *et al.*, 2002] Kim, S. G., Kim, K. W., Park, E. W. et Choi, D. (2002). Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves : a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. *Phytopathology*, 92(10) :1095–1103.

[Kim *et al.*, 2017] Kim, Y.-H., Khan, A. L., Waqas, M. et Lee, I.-J. (2017). Silicon Regulates Antioxidant Activities of Crop Plants under Abiotic-Induced Oxidative Stress : A Review. *Frontiers in Plant Science*, 8.

[Kopriva *et al.*, 2019] Kopriva, S., Malagoli, M. et Takahashi, H. (2019). Sulfur nutrition : impacts on plant development, metabolism, and stress responses. *Journal of Experimental Botany*, 70(16) :4069–4073.

[Koprivova et Kopriva, 2014] Koprivova, A. et Kopriva, S. (2014). Molecular mechanisms of regulation of sulfate assimilation : first steps on a long road. *Frontiers in Plant Science*, 5.

[Korndörfer *et al.*, 2001] Korndörfer, G. H., Snyder, G. H., Ulloa, M., Powell, G. et Datnoff, L. E. (2001). CALIBRATION OF SOIL AND PLANT SILICON ANALYSIS FOR RICE PRODUCTION *. *Journal of Plant Nutrition*, 24(7) :1071–1084.

[Kost *et al.*, 2008] Kost, D., Chen, L. et Dick, W. A. (2008). Predicting plant sulfur deficiency in soils : results from Ohio. *Biology and Fertility of Soils*, 44(8) :1091–1098.

[Kostic *et al.*, 2017] Kostic, L., Nikolic, N., Bosnic, D., Samardzic, J. et Nikolic, M. (2017). Silicon increases phosphorus (P) uptake by wheat under low P acid soil conditions. *Plant and Soil*, 419(1-2) :447–455.

[Kou *et al.*, 2024] Kou, X., Zhao, Z., Xu, X., Li, C., Wu, J. et Zhang, S. (2024). Identification and expression analysis of ATP-binding cassette (ABC) transporters revealed its role in regulating stress response in pear (Pyrus bretchneideri). *BMC Genomics*, 25(1) :169.

[Laine *et al.*, 1993] Laine, P., Ourry, A., Macduff, J., Boucaud, J. et Salette, J. (1993). Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species : effects of low temperatures or previous nitrate starvation. *Physiologia Plantarum*, 88(1) :85–92.

[Lally *et al.*, 2017] Lally, R. D., Galbally, P., Moreira, A. S., Spink, J., Ryan, D., Germaine, K. J. et Dowling, D. N. (2017). Application of endophytic pseudomonas fluorescens and a bacterial consortium to brassica napus can increase plant height and biomass under greenhouse and field conditions. *Front. Plant Sci.*, 8.

[Lamsaadi *et al.*, 2023] Lamsaadi, N., Hidri, R., Zorrig, W., El Moukhtari, A., Debez, A., Savouré, A., Abdelly, C. et Farissi, M. (2023). Exogenous silicon alleviates salinity stress in fenugreek (Trigonella foenum-graecum L.) by enhancing photosystem activities, biological nitrogen fixation and antioxidant defence system. *South African Journal of Botany*, 159 :344–355.

[Lancashire *et al.*, 1991] Lancashire, P. D., Bleiholder, H., Boom, T. V. D., Langelüddeke, P., Stauss, R., Weber, E. et Witzenberger, A. (1991). A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Annals of Applied Biology*, 119(3) :561–601.

[Landré *et al.*, 2020] Landré, A., Cornu, S., Meunier, J.-D., Guerin, A., Arrouays, D., Caubet, M., Ratié, C. et Saby, N. (2020). Do climate and land use affect the pool of total silicon concentration ? A digital soil mapping approach of French topsoils. *Geoderma*, 364 :114175.

[Landschoot *et al.*, 2024] Landschoot, S., Zustovi, R., Dewitte, K., Randall, N. P., Maenhout, S. et Haesaert, G. (2024). Cereal-legume intercropping : a smart review using topic modelling. *Frontiers in Plant Science*, 14 :1228850.

[Laîné *et al.*, 2022] Laîné, P., Coquerel, R., Arkoun, M., Trouverie, J. et Etienne, P. (2022). Assessing the Effect of Silicon Supply on Root Sulfur Uptake in S-Fed and S-Deprived Brassica napus L. *Plants*, 11(12) :1606.

[Laîné *et al.*, 2019] Laîné, P., Haddad, C., Arkoun, M., Yvin, J.-C. et Etienne, P. (2019). Silicon Promotes Agronomic Performance in Brassica napus Cultivated under Field Conditions with Two Nitrogen Fertilizer Inputs. *Plants*, 8(5) :137.

[Ledgard *et al.*, 1985] Ledgard, S., Freney, J. et Simpson, J. (1985). Assessing nitrogen transfer from legumes to associated grasses. *Soil Biology and Biochemistry*, 17(4) : 575–577.

[Leghari, S.J. *et al.*, 2016] Leghari, S.J., Wahocho, N.A., Laghari, G.M., HafeezLaghari, A., MustafaBhabhan, G., HussainTalpur, K. et Lashari, A.A. (2016). Role of Nitrogen for Plant Growth and Development : A Review. *In Advances in Environmental Biology*, pages 209–219.

[Li *et al.*, 2021] Li, P., Luo, T., Pu, X., Zhou, Y., Yu, J. et Liu, L. (2021). Plant transporters : roles in stress responses and effects on growth and development. *Plant Growth Regulation*, 93(3) :253–266.

[Li *et al.*, 2020] Li, Q., Gao, Y. et Yang, A. (2020). Sulfur Homeostasis in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23) :8926.

[Lilay *et al.*, 2024] Lilay, G. H., Thiébaut, N., Du Mee, D., Assunção, A. G. L., Schjoerring, J. K., Husted, S. et Persson, D. P. (2024). Linking the key physiological functions of essential micronutrients to their deficiency symptoms in plants. *New Phytologist*, 242(3) :881–902.

[Lin *et al.*, 2013] Lin, L., Allemekinders, H., Dansby, A., Campbell, L., Durance-Tod, S., Berger, A. et Jones, P. J. (2013). Evidence of health benefits of canola oil. *Nutrition Reviews*, 71(6) :370–385.

[Lindström et Mousavi, 2020] Lindström, K. et Mousavi, S. A. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*, 13(5) :1314–1335.

[Lipková *et al.*, 2021] Lipková, N., Medo, J., Artimová, R., Maková, J., Petrová, J., Javoreková, S. et Michalko, J. (2021). Growth promotion of rapeseed (brassica napus l.) and blackleg disease (leptosphaeria maculans) suppression mediated by endophytic bacteria. *Agronomy (Basel)*, 11(10) :1966.

[Liu *et al.*, 2018] Liu, A., Contador, C. A., Fan, K. et Lam, H.-M. (2018). Interaction and Regulation of Carbon, Nitrogen, and Phosphorus Metabolisms in Root Nodules of Legumes. *Frontiers in Plant Science*, 9 :1860.

[Liu *et al.*, 2022a] Liu, J., Liu, J., Cui, M., Chen, X., Liu, J., Chen, J., Chen, A. et Xu, G. (2022a). Investigate the Effect of Potassium on Nodule Symbiosis and Uncover an HAK/KUP/KT Member, GmHAK5, Strongly Responsive to Root Nodulation in Soybean. *Journal of Plant Biology*, 65(6) :459–471.

[Liu *et al.*, 2022b] Liu, Z., Sha, Y., Huang, Y., Hao, Z., Guo, W., Ke, L., Chen, F., Yuan, L. et Mi, G. (2022b). Efficient nitrogen allocation and reallocation into the ear in relation to the superior vascular system in low-nitrogen tolerant maize hybrid. *Field Crops Research*, 284 :108580.

[Livak et Schmittgen, 2001] Livak, K. J. et Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2CT Method. *Methods*, 25(4) :402–408.

[Lopez-Ridaura *et al.*, 2021] Lopez-Ridaura, S., Barba-Escoto, L., Reyna-Ramirez, C. A., Sum, C., Palacios-Rojas, N. et Gerard, B. (2021). Maize intercropping in the milpa system. Diversity, extent and importance for nutritional security in the Western Highlands of Guatemala. *Scientific Reports*, 11(1) :3696.

[M. Sainju *et al.*, 2020] M. Sainju, U., Ghimire, R. et P. Pradhan, G. (2020). Nitrogen Fertilization I : Impact on Crop, Soil, and Environment. *In* Cid Rigobelo, E. et Pereira Serra, A., éditeurs : *Nitrogen Fixation*. IntechOpen.

[Ma *et al.*, 2024] Ma, C., Zhang, X., Bao, X. et Zhu, X. (2024). In the symbiosome : Cross-kingdom dating under the moonlight. *New Crops*, 1 :100015.

[Ma *et al.*, 2001] Ma, J., Miyake, Y. et Takahashi, E. (2001). Chapter 2 Silicon as a beneficial element for crop plants. *In Studies in Plant Science*, volume 8, pages 17–39. Elsevier.

[Ma *et al.*, 2006] Ma, J. F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y. et Yano, M. (2006). A silicon transporter in rice. *Nature*, 440(7084) :688–691.

[Ma et Yamaji, 2015] Ma, J. F. et Yamaji, N. (2015). A cooperative system of silicon transport in plants. *Trends Plant Sci.*, 20(7) :435–442.

[Mabagala *et al.*, 2020] Mabagala, F., Geng, Y., Cao, G., Wang, L., Wang, M. et Zhang, M. (2020). EFFECT OF SILICON ON CROP YIELD, AND NITROGEN USE EFFICIENCY APPLIED UNDER STRAW RETURN TREATMENTS. *Applied Ecology and Environmental Research*, 18(4) :5577–5590.

[Maignan *et al.*, 2020] Maignan, V., Bernay, B., Géliot, P. et Avice, J.-C. (2020). Biostimulant Effects of Glutacetineő and Its Derived Formulations Mixed With N Fertilizer on Post-heading N Uptake and Remobilization, Seed Yield, and Grain Quality in Winter Wheat. *Frontiers in Plant Science*, 11 :607615.

[Maignan *et al.*, 2021] Maignan, V., Coquerel, R., Géliot, P. et Avice, J.-C. (2021). VNT4, a Derived Formulation of Glutacetineő Biostimulant, Improved Yield and N-Related Traits of Bread Wheat When Mixed with Urea-Ammonium-Nitrate Solution. *Agronomy*, 11(5) :1013.

[Maillard *et al.*, 2018] Maillard, A., Ali, N., Schwarzenberg, A., Jamois, F., Yvin, J.-C. et Hosseini, S. A. (2018). Silicon transcriptionally regulates sulfur and ABA metabolism

and delays leaf senescence in barley under combined sulfur deficiency and osmotic stress. *Environmental and Experimental Botany*, 155 :394–410.

[Maillard *et al.*, 2016a] Maillard, A., Etienne, P., Diquélou, S., Trouverie, J., Billard, V., Yvin, J.-C. et Ourry, A. (2016a). Nutrient deficiencies modify the ionomic composition of plant tissues : a focus on cross-talk between molybdenum and other nutrients in Brassica napus. *Journal of Experimental Botany*, 67(19) :5631–5641.

[Maillard *et al.*, 2016b] Maillard, A., Sorin, E., Etienne, P., Diquélou, S., Koprivova, A., Kopriva, S., Arkoun, M., Gallardo, K., Turner, M., Cruz, F., Yvin, J.-C. et Ourry, A. (2016b). Non-Specific Root Transport of Nutrient Gives Access to an Early Nutritional Indicator : The Case of Sulfate and Molybdate. *PLOS ONE*, 11(11) :e0166910.

[Malagoli, 2005] Malagoli, P. (2005). 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(5) :853–861.

[Manco *et al.*, 2024] Manco, A., Giaccone, M., Zenone, T., Onofri, A., Tei, F., Farneselli, M., Gabbrielli, M., Allegrezza, M., Perego, A., Magliulo, V. et Vitale, L. (2024). An overview of n2o emissions from cropping systems and current strategies to improve nitrogen use efficiency. *Horticulturae*, 10(7).

[Markovich *et al.*, 2017] Markovich, O., Steiner, E., Kouil, ., Tarkowski, P., Aharoni, A. et Elbaum, R. (2017). Silicon promotes cytokinin biosynthesis and delays senescence in Arabidopsis and Sorghum : Silicon and cytokinin. *Plant, Cell & Environment*, 40(7) : 1189–1196.

[Marks *et al.*, 1985] Marks, D. L., Buchsbaum, R. et Swain, T. (1985). Measurement of total protein in plant samples in the presence of tannins. *Analytical Biochemistry*, 147(1) :136–143.

[Mason et Snowdon, 2016] Mason, A. S. et Snowdon, R. J. (2016). Oilseed rape : learning about ancient and recent polyploid evolution from a recent crop species. *Plant Biology*, 18(6) :883–892.

[Mattila *et al.*, 2018] Mattila, P., Mäkinen, S., Eurola, M., Jalava, T., Pihlava, J.-M., Hellström, J. et Pihlanto, A. (2018). Nutritional Value of Commercial Protein-Rich Plant Products. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(2) :108–115.

[Mazurier, 1989] Mazurier, S. (1989). *Diversité de populations naturelles nodulantes de Rhizobium leguminosarum*. PhD Thesis, Lyon 1.

[McKeague et Cline, 1963] McKeague, J. A. et Cline, M. G. (1963). SILICA IN SOIL SOLUTIONS : I. THE FORM AND CONCENTRATION OF DISSOLVED SILICA IN AQUEOUS EXTRACTS OF SOME SOILS. *Canadian Journal of Soil Science*, 43(1) :70–82.

[McLeod et Shaulis, 2018] McLeod, C. et Shaulis, B. (2018). Rare Earth Elements in Planetary Crusts : Insights from Chemically Evolved Igneous Suites on Earth and the Moon. *Minerals*, 8(10) :455.

[McNeill *et al.*, 2005] McNeill, A., Eriksen, J., Bergström, L., Smith, K., Marstorp, H., Kirchmann, H. et Nilsson, I. (2005). Nitrogen and sulphur management : challenges for organic sources in temperate agricultural systems. *Soil Use and Management*, 21(s1) :82–93.

[Menegat *et al.*, 2022] Menegat, S., Ledo, A. et Tirado, R. (2022). Greenhouse gas emissions from global production and use of nitrogen synthetic fertilisers in agriculture. *Scientific Reports*, 12(1) :14490.

[Meunier, 2003] Meunier, J.-D. (2003). Le rôle des plantes dans le transfert du silicium à la surface des continents. *C. R. Geosci.*, 335(16) :1199–1206.

[Meunier *et al.*, 2017] Meunier, J. D., Barboni, D., Anwar-ul Haq, M., Levard, C., Chaurand, P., Vidal, V., Grauby, O., Huc, R., Laffont-Schwob, I., Rabier, J. et Keller, C.

(2017). Effect of phytoliths for mitigating water stress in durum wheat. *New Phytol.*, 215(1) :229–239.

[Mhadhbi *et al.*,] Mhadhbi, H., Chihaoui, S., Mhamdi, R., Mnasri, B., Jebara, M. et Mhamdi, R. A highly osmotolerant rhizobial strain confers a better tolerance of nitrogen fixation and enhances protective activities to nodules of Phaseolus vulgaris under drought stress.

[Mir *et al.*, 2022] Mir, R. A., Bhat, B. A., Yousuf, H., Islam, S. T., Raza, A., Rizvi, M. A., Charagh, S., Albaqami, M., Sofi, P. A. et Zargar, S. M. (2022). Multidimensional Role of Silicon to Activate Resilient Plant Growth and to Mitigate Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Science*, 13 :819658.

[Mondal *et al.*, 2022] Mondal, S., Pramanik, K., Panda, D., Dutta, D., Karmakar, S. et Bose, B. (2022). Sulfur in Seeds : An Overview. *Plants*, 11(3) :450.

[Moraes *et al.*, 2022] Moraes, S. P. D. O., Rodrigues, J. F. M., Escobar, M. E. O., Araújo, F. S. et Oliveira, T. S. D. (2022). Beneficial effects of silicon in plants under abiotic stress conditions : A new approach. *REVISTA CIÊNCIA AGRONÔMICA*, 53.

[Morison *et al.*, 2014] Morison, M., David, C., Cadoux, S., Lorin, M., Celette, F., Amossé, C. et Basset, A. (2014). Association d'une culture de rente et espèces compagnes permettant la fourniture de services écosystémiques. *Innovations Agronomiques*, 40 :93–112. article présenté lors du colloque "Associations Végétales" Angers 20 novembre 2014.

[Mostofa *et al.*, 2021] Mostofa, M. G., Rahman, M. M., Ansary, M. M. U., Keya, S. S., Abdelrahman, M., Miah, M. G. et Phan Tran, L.-S. (2021). Silicon in mitigation of abiotic stress-induced oxidative damage in plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(6) :918–934.

[Mustafa *et al.*, 2021] Mustafa, T., Sattar, A., Sher, A., Ul-Allah, S., Ijaz, M., Irfan, M., Butt, M. et Cheema, M. (2021). Exogenous application of silicon improves the performance of wheat under terminal heat stress by triggering physio-biochemical mechanisms. *Scientific Reports*, 11(1) :23170.

[Nabloussi, 2015] Nabloussi, A. (2015). Amélioration génétique du colza : enjeux et réalisations pour un développement durable de la filière. `https://www.inra.org.ma/sites/default/files/nabloussiCOLZA2015.pdf`.

[Nesi *et al.*, 2008] Nesi, N., Delourme, R., Brégeon, M., Falentin, C. et Renard, M. (2008). Genetic and molecular approaches to improve nutritional value of brassica napus l. seed. *Comptes Rendus Biologies*, 331(10) :763–771. Les graines de la vie / The seeds of life.

[Nitawaki *et al.*, 2021] Nitawaki, Y., Kitabayashi, H., Mason, M. L. T., Yamamoto, A. et Saeki, Y. (2021). Effect of salt stress on soybean growth and nodulation under inoculation with soybean rhizobia. *Soil Science and Plant Nutrition*, 67(2) :103–113.

[Noquet *et al.*, 2004] Noquet, C., Avice, J.-C., Rossato, L., Beauclair, P., Henry, M.-P. et Ourry, A. (2004). Effects of altered sourcesink relationships on n allocation and vegetative storage protein accumulation in brassica napus l. *Plant Science*, 166(4) : 1007–1018.

[Oenema et Postma, 2003] Oenema, O. et Postma, R. (2003). *Managing Sulphur in Agroecosystems*, pages 45–70. Springer Netherlands, Dordrecht.

[Orellano *et al.*, 2021] Orellano, P., Reynoso, J. et Quaranta, N. (2021). Short-term exposure to sulphur dioxide (SO2) and all-cause and respiratory mortality : A systematic review and meta-analysis. *Environment International*, 150 :106434.

[Pardoux *et al.*, 2019] Pardoux, R., Fiévet, A., Carreira, C., Brochier-Armanet, C., Valette, O., Dermoun, Z., Py, B., Dolla, A., Pauleta, S. R. et Aubert, C. (2019). The bacterial MrpORP is a novel Mrp/NBP35 protein involved in iron-sulfur biogenesis. *Scientific Reports*, 9(1) :712.

[Pastore *et al.*, 2020] Pastore, G., Kernchen, S. et Spohn, M. (2020). Microbial solubilization of silicon and phosphorus from bedrock in relation to abundance of phosphorus-solubilizing bacteria in temperate forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 151 :108050.

[Pavlovic *et al.*, 2021] Pavlovic, J., Kostic, L., Bosnic, P., Kirkby, E. A. et Nikolic, M. (2021). Interactions of Silicon With Essential and Beneficial Elements in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 12 :697592.

[Pavlovic *et al.*, 2016] Pavlovic, J., Samardzic, J., Kostic, L., Laursen, K. H., Natic, M., Timotijevic, G., Schjoerring, J. K. et Nikolic, M. (2016). Silicon enhances leaf remobilization of iron in cucumber under limited iron conditions. *Annals of Botany*, 118(2) :271–280.

[Perez-Riverol *et al.*, 2022] Perez-Riverol, Y., Bai, J., Bandla, C., García-Seisdedos, D., Hewapathirana, S., Kamatchinathan, S., Kundu, D., Prakash, A., Frericks-Zipper, A., Eisenacher, M., Walzer, M., Wang, S., Brazma, A. et Vizcaíno, J. (2022). The PRIDE database resources in 2022 : a hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic Acids Research*, 50(D1) :D543–D552.

[Pinelli *et al.*, 2018] Pinelli, P., Romani, A., Fierini, E. et Agati, G. (2018). Prediction models for assessing anthocyanins in grape berries by fluorescence sensors : Dependence on cultivar, site and growing season. *Food Chemistry*, 244 :213–223.

[Poisson *et al.*, 2019] Poisson, E., Trouverie, J., Brunel-Muguet, S., Akmouche, Y., Pontet, C., Pinochet, X. et Avice, J.-C. (2019). Seed Yield Components and Seed Quality of Oilseed Rape Are Impacted by Sulfur Fertilization and Its Interactions With Nitrogen Fertilization. *Frontiers in Plant Science*, 10 :458.

[Popp et Ott, 2011] Popp, C. et Ott, T. (2011). Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4) :458–467. Biotic interactions.

[Poret *et al.*, 2017] Poret, M., Chandrasekar, B., Van der Hoorn, R., Coquet, L., Jouenne, T. et Avice, J.-C. (2017). Proteomic investigations of proteases involved in cotyledon senescence : A model to explore the genotypic variability of proteolysis machinery associated with nitrogen remobilization efficiency during the leaf senescence of oilseed rape. *Proteomes*, 5(4) :29.

[Premaratne et Oertli, 1994] Premaratne, K. P. et Oertli, J. J. (1994). The influence of potassium supply on nodulation, nitrogenase activity and nitrogen accumulation of soybean (Glycine max L. Merrill) grown in nutrient solution. *Fertilizer Research*, 38(2) :95–99.

[Putra *et al.*, 2020] Putra, R., Powell, J. R., Hartley, S. E. et Johnson, S. N. (2020). Is it time to include legumes in plant silicon research ? *Functional Ecology*, 34(6) :1142–1157.

[Putra *et al.*, 2021] Putra, R., Vandegeer, R. K., Karan, S., Powell, J. R., Hartley, S. E. et Johnson, S. N. (2021). Silicon enrichment alters functional traits in legumes depending on plant genotype and symbiosis with nitrogenfixing bacteria. *Functional Ecology*, 35(12) :2856–2869.

[Putra *et al.*, 2022] Putra, R., Waterman, J. M., Mathesius, U., Wojtalewicz, D., Powell, J. R., Hartley, S. E. et Johnson, S. N. (2022). Benefits of silicon-enhanced root nodulation in a model legume are contingent upon rhizobial efficacy. *Plant and Soil*, 477(1-2) :201–217.

[Rathke *et al.*, 2005] Rathke, G.-W., Christen, O. et Diepenbrock, W. (2005). Effects of nitrogen source and rate on productivity and quality of winter oilseed rape (Brassica napus L.) grown in different crop rotations. *Field Crops Research*, 94(2-3) :103–113.

[Raza *et al.*, 2020a] Raza, A., Asghar, M. A., Ahmad, B., Bin, C., Iftikhar Hussain, M., Li, W., Iqbal, T., Yaseen, M., Shafiq, I., Yi, Z., Ahmad, I., Yang, W. et Weiguo, L. (2020a).

Agro-Techniques for Lodging Stress Management in Maize-Soybean Intercropping SystemA Review. *Plants*, 9(11) :1592.

[Raza *et al.*, 2020b] Raza, A., Zahra, N., Hafeez, M. B., Ahmad, M., Iqbal, S., Shaukat, K. et Ahmad, G. (2020b). Nitrogen Fixation of Legumes : Biology and Physiology. *In* Hasanuzzaman, M., Araújo, S. et Gill, S. S., éditeurs : *The Plant Family Fabaceae*, pages 43–74. Springer Singapore, Singapore.

[Ristova et Kopriva, 2022] Ristova, D. et Kopriva, S. (2022). Sulfur signaling and starvation response in Arabidopsis. *iScience*, 25(5) :104242.

[Rossato, 2001] Rossato, L. (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(361) :1655–1663.

[Rosso *et al.*, 2022] Rosso, P., Wallor, E., Richter, L. et Wehrhan, M. (2022). Comparison of plant proximal sensing approaches for nitrogen supply detection in crops. *Agron. J.*, 114(6) :3317–3328.

[Rouphael et Colla, 2018] Rouphael, Y. et Colla, G. (2018). Synergistic Biostimulatory Action : Designing the Next Generation of Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9 :1655.

[Rubiales *et al.*, 2021] Rubiales, D., Annicchiarico, P., Vaz Patto, M. C. et Julier, B. (2021). Legume Breeding for the Agroecological Transition of Global Agri-Food Systems : A European Perspective. *Frontiers in Plant Science*, 12 :782574.

[Réthoré *et al.*, 2020] Réthoré, E., Ali, N., Yvin, J.-C. et Hosseini, S. A. (2020). Silicon Regulates Source to Sink Metabolic Homeostasis and Promotes Growth of Rice Plants under Sulfur Deficiency. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10) : 3677.

[Rütting *et al.*, 2018] Rütting, T., Aronsson, H. et Delin, S. (2018). Efficient use of nitrogen in agriculture. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 110(1) :1–5.

[Sarda *et al.*, 2014] Sarda, X., Diquelou, S., Abdallah, M., Nesi, N., Cantat, O., Le Gouee, P., Avice, J. C. et Ourry, A. (2014). Assessment of sulphur deficiency in commercial oilseed rape crops from plant analysis. *The Journal of Agricultural Science*, 152(4) : 616633.

[Sarkar *et al.*, 2023] Sarkar, A., Kisiala, A., Adhikary, D., Basu, U., Emery, R. J. N., Rahman, H. et Kav, N. N. V. (2023). Silicon ameliorates clubroot responses in canola (brassica napus) : A “multi-omics”-based investigation into possible mechanisms. *Physiol. Plant.*, 175(2) :e13900.

[Savci, 2012] Savci, S. (2012). Investigation of Effect of Chemical Fertilizers on Environment. *APCBEE Procedia*, 1 :287–292.

[Scherer *et al.*, 2008] Scherer, H. W., Pacyna, S., Spoth, K. R. et Schulz, M. (2008). Low levels of ferredoxin, ATP and leghemoglobin contribute to limited N2 fixation of peas (Pisum sativum L.) and alfalfa (Medicago sativa L.) under S deficiency conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 44(7) :909–916.

[Schneider *et al.*, 2019] Schneider, S., Schintlmeister, A., Becana, M., Wagner, M., Woebken, D. et Wienkoop, S. (2019). Sulfate is transported at significant rates through the symbiosome membrane and is crucial for nitrogenase biosynthesis. *Plant, Cell & Environment*, 42(4) :1180–1189.

[Sena *et al.*, 2022] Sena, S., Kaur, H., Chahal, S., Jha, P., Goutam, U. et Kumar, V. (2022). The Beneficial Role of Silicon Alleviating Heavy Metal and Disease Resistance Stress in Crops. *Silicon*.

[Shen et Feng, 2024] Shen, L. et Feng, J. (2024). Ninat the heart of nitrogen-fixing nodule symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, 14.

[Sheng *et al.*, 2018] Sheng, H., Ma, J., Pu, J. et Wang, L. (2018). Cell wall-bound silicon optimizes ammonium uptake and metabolism in rice cells. *Annals of Botany*, 122(2) :303–313.

[Shukla et Yadav, 1982] Shukla, U. C. et Yadav, O. P. (1982). Effect of phosphorus and zinc on nodulation and nitrogen fixation in chickpea (Cicer arietinum L.). *Plant and Soil*, 65(2) :239–248.

[Sorin *et al.*, 2015] Sorin, E., Etienne, P., Maillard, A., Zamarreño, A.-M., Garcia-Mina, J.-M., Arkoun, M., Jamois, F., Cruz, F., Yvin, J.-C. et Ourry, A. (2015). Effect of sulphur deprivation on osmotic potential components and nitrogen metabolism in oilseed rape leaves : identification of a new early indicator. *Journal of Experimental Botany*, 66(20) :6175–6189.

[Souri *et al.*, 2021] Souri, Z., Khanna, K., Karimi, N. et Ahmad, P. (2021). Silicon and Plants : Current Knowledge and Future Prospects. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40(3) :906–925.

[Srivastav, 2020] Srivastav, A. L. (2020). Chemical fertilizers and pesticides : role in groundwater contamination. *In Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation*, pages 143–159. Elsevier.

[Sulieman et Tran, 2013] Sulieman, S. et Tran, L.-S. P. (2013). Asparagine : an amide of particular distinction in the regulation of symbiotic nitrogen fixation of legumes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(3) :309–327.

[Sulieman et Tran, 2015] Sulieman, S. et Tran, L.-S. P. (2015). Phosphorus homeostasis in legume nodules as an adaptive strategy to phosphorus deficiency. *Plant Science*, 239 :36–43.

[Supek *et al.*, 2011] Supek, F., Bonjak, M., kunca, N. et muc, T. (2011). REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLoS ONE*, 6(7) : e21800.

[SzydOwska-Czerniak, 2013] SzydOwska-Czerniak, A. (2013). Rapeseed and its ProductsSources of Bioactive Compounds : A Review of their Characteristics and Analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(4) :307–330.

[Ta et Faris, 1987] Ta, T. C. et Faris, M. A. (1987). Species variation in the fixation and transfer of nitrogen from legumes to associated grasses. *Plant and Soil*, 98(2) :265–274.

[Takahashi *et al.*, 1990] Takahashi, E., Ma, J. F. et Miyake, Y. (1990). The possibility of silicon as an essential element for higher plants.

[Thal *et al.*, 2018] Thal, B., Braun, H.-P. et Eubel, H. (2018). Proteomic analysis dissects the impact of nodulation and biological nitrogen fixation on Vicia faba root nodule physiology. *Plant Molecular Biology*, 97(3) :233–251.

[Thind *et al.*, 2021] Thind, S., Hussain, I., Ali, S., Rasheed, R. et Ashraf, M. A. (2021). Silicon Application Modulates Growth, Physio-Chemicals, and Antioxidants in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Exposed to Different Cadmium Regimes. *Dose-Response*, 19(2) :155932582110146.

[Tian et Niu, 2015] Tian, D. et Niu, S. (2015). A global analysis of soil acidification caused by nitrogen addition. *Environmental Research Letters*, 10(2) :024019.

[Tian *et al.*, 2023] Tian, Y., Wang, F., Shi, X., Shi, F., Li, N., Li, J., Chenu, K., Luo, H. et Yang, G. (2023). Late nitrogen fertilization improves cotton yield through optimizing dry matter accumulation and partitioning. *Annals of Agricultural Sciences*, 68(1) :75–86.

[Trenbath, 1993] Trenbath, B. R. (1993). Intercropping for the management of pests and diseases. *Field Crops Research*, 34(3-4) :381–405.

[Triboi-Blondel *et al.*, 1988] Triboi-Blondel, A.-M., Messaoud, J. et Rousseau, P. (1988). Mise en place et fonctionnement des feuilles de colza d'hiver : relations azote-carbone et sénescence. *Agronomie*, 8(9) :779–786.

[Trou *et al.*, 2023] Trou, G., Rouillé, B. et Brocard, V. (2023). Le tourteau de colza : un aliment de qualité pour les vaches laitières. *Chambre d'agriculture - Bretagne*.

[Udvardi et Poole, 2013] Udvardi, M. et Poole, P. S. (2013). Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1) :781–805.

[Van Bockhaven *et al.*, 2013] Van Bockhaven, J., De Vleesschauwer, D. et Höfte, M. (2013). Towards establishing broad-spectrum disease resistance in plants : silicon leads the way. *Journal of Experimental Botany*, 64(5) :1281–1293.

[Varin *et al.*, 2010] Varin, S., Cliquet, J.-B., Personeni, E., Avice, J.-C. et Lemauviel-Lavenant, S. (2010). How does sulphur availability modify N acquisition of white clover (Trifolium repens L.) ? *Journal of Experimental Botany*, 61(1) :225–234.

[Verma *et al.*, 2021] Verma, K. K., Song, X.-P., Tian, D.-D., Guo, D.-J., Chen, Z.-L., Zhong, C.-S., Nikpay, A., Singh, M., Rajput, V. D., Singh, R. K., Minkina, T. et Li, Y.-R. (2021). Influence of Silicon on Biocontrol Strategies to Manage Biotic Stress for Crop Protection, Performance, and Improvement. *Plants*, 10(10) :2163.

[Wan *et al.*, 2018] Wan, L.-S., Zhang, G., Zhang, J.-F., Yan, G.-H., Zhu, M., Ni, Z.-B., Zhu, G.-Y., Wang, A.-M., Dai, J.-Y., Sun, H.-Q. et Sun, M.-F. (2018). Models of near infrared spectroscopy of fatty acid contents in rapeseed. *J. Food Process Eng.*, 41(8) :e12876.

[Wanasundara *et al.*, 2016] Wanasundara, J. P., McIntosh, T. C., Perera, S. P., Withana-Gamage, T. S. et Mitra, P. (2016). Canola/rapeseed protein-functionality and nutrition. *OCL*, 23(4) :D407.

[Wang *et al.*, 2021] Wang, D., Hou, L., Zhang, L. et Liu, P. (2021). The mechanisms of silicon on maintaining water balance under water deficit stress. *Physiologia Plantarum*, 173(3) :1253–1262.

[Watanabe *et al.*, 2021] Watanabe, M., Chiba, Y. et Hirai, M. Y. (2021). Metabolism and Regulatory Functions of O-Acetylserine, S-Adenosylmethionine, Homocysteine, and Serine in Plant Development and Environmental Responses. *Frontiers in Plant Science*, 12 :643403.

[Willey, 1979] Willey, R. W. (1979). Intercropping - its importance and research needs. 1. competition and yield advantages. 32 :110.

[Wu *et al.*, 2017] Wu, X., Yu, Y., Baerson, S. R., Song, Y., Liang, G., Ding, C., Niu, J., Pan, Z. et Zeng, R. (2017). Interactions between Nitrogen and Silicon in Rice and Their Effects on Resistance toward the Brown Planthopper Nilaparvata lugens. *Frontiers in Plant Science*, 8.

[Xia *et al.*, 2017a] Xia, X., Ma, C., Dong, S., Xu, Y. et Gong, Z. (2017a). Effects of nitrogen concentrations on nodulation and nitrogenase activity in dual root systems of soybean plants. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 63(5) :470–482.

[Xia *et al.*, 2017b] Xia, X., Ma, C., Dong, S., Xu, Y. et Gong, Z. (2017b). Effects of nitrogen concentrations on nodulation and nitrogenase activity in dual root systems of soybean plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, 63(5) :470–482.

[Xu et Geelen, 2018] Xu, L. et Geelen, D. (2018). Developing Biostimulants From Agro-Food and Industrial By-Products. *Frontiers in Plant Science*, 9 :1567.

[Yahbi *et al.*, 2022] Yahbi, M., Nabloussi, A., Maataoui, A., El Alami, N., Boutagayout, A. et Daoui, K. (2022). Effects of nitrogen rates on yield, yield components, and other related attributes of different rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties. *OCL*, 29 :8.

[Yao *et al.*, 2011] Yao, X., Chu, J., Cai, K., Liu, L., Shi, J. et Geng, W. (2011). Silicon Improves the Tolerance of Wheat Seedlings to Ultraviolet-B Stress. *Biological Trace Element Research*, 143(1) :507–517.

[Yao *et al.*, 2022] Yao, Y., Yuan, H., Wu, G., Ma, C. et Gong, Z. (2022). Proteome Analysis of the Soybean Nodule Phosphorus Response Mechanism and Characterization of Stress-Induced Ribosome Structural and Protein Expression Changes. *Frontiers in Plant Science*, 13 :908889.

[Yu *et al.*, 2021] Yu, Z., She, M., Zheng, T., Diepeveen, D., Islam, S., Zhao, Y., Zhang, Y., Tang, G., Zhang, Y., Zhang, J., Blanchard, C. L. et Ma, W. (2021). Impact and mechanism of sulphur-deficiency on modern wheat farming nitrogen-related sustainability and gliadin content. *Communications Biology*, 4(1) :945.

[Zajaczkowska *et al.*, 2020] Zajaczkowska, A., Korzeniowska, J. et Sienkiewicz-Cholewa, U. (2020). Effect of Soil and Foliar Silicon Application on the Reduction of Zinc Toxicity in Wheat. *Agriculture*, 10(11) :522.

[Zenda *et al.*, 2021] Zenda, T., Liu, S., Dong, A. et Duan, H. (2021). Revisiting SulphurThe Once Neglected Nutrient : It's Roles in Plant Growth, Metabolism, Stress Tolerance and Crop Production. *Agriculture*, 11(7) :626.

[Zhang *et al.*, 2015] Zhang, Q., Lee, B.-R., Park, S.-H., Zaman, R., Avice, J.-C., Ourry, A. et Kim, T.-H. (2015). Sulfate resupply accentuates protein synthesis in coordination with nitrogen metabolism in sulfur deprived Brassica napus. *Plant Physiology and Biochemistry*, 87 :1–8.

[Zoffoli *et al.*, 2021] Zoffoli, B. C., Brito, L. F., Straliotto, R. et Araújo, A. P. d. (2021). Early nitrogen supplementation stimulates the nodulation and growth of common bean plants inoculated with rhizobium. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 43(1) : e55105.

[Zuber *et al.*, 2013] Zuber, H., Poignavent, G., Le Signor, C., Aimé, D., Vieren, E., Tadla, C., Lugan, R., Belghazi, M., Labas, V., Santoni, A.-L., Wipf, D., Buitink, J., Avice, J.-C., Salon, C. et Gallardo, K. (2013). Legume adaptation to sulfur deficiency revealed by comparing nutrient allocation and seed traits in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 76(6) :982–996.

Liste des activités scientifiques

Articles :

Laîné, P.; **Coquerel, R.**; Arkoun, M.; Trouverie, J.; Etienne, P. Assessing the Effect of Silicon Supply on Root Sulfur Uptake in S-Fed and S-Deprived *Brassica napus* L. *Plants* **2022**, *11*, 1606. https ://doi.org/10.3390/plants11121606

Coquerel, R.; Arkoun, M.; Dupas, Q.; Leroy, F.; Laîné, P.; Etienne, P. Silicon Supply Improves Nodulation and Dinitrogen Fixation and Promotes Growth in *Trifolium incarnatum* Subjected to a Long-Term Sulfur Deprivation. *Plants* **2023**, *12*, 2248. https ://doi.org/10.3390/plants12122248

Coquerel, R.; Arkoun, M.; Trouverie, J.; Bernay, B.; Laîné, P.; Etienne, P. Ionomic and proteomic changes highlight the effect of silicon supply on the functioning of *Trifolium incarnatum* L. nodules subjected to nitrogen starvation. *Frontiers soumis le 09/07/2024*. https ://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4522330/v1

Coquerel, R.; Arkoun, M.; Laîné, P.; Etienne, P. Silicon supply improves the N rhizodeposition and N transfer from *Trifolium incarnatum* L. to *Brassica napus* L. in intercrops. *Heliyon soumis le 29/07/2024*.

Communications :

Coquerel, R et *al.* (2022), poster. NIRStradamus : La spectrométrie proche infrarouge comme outils de pilotage de la fertilisation. Journées de la SFR Normandie Végétal (NORVEGE), 2022, Saint-Malo (FR).

Coquerel, R et *al.* (2023), poster. Effect of silicon supply on root sulphur uptake in

S-fed and S-deprived *Brassica napus* L. Plant Biology Europe, 2023, Marseille (FR).

Coquerel, R et *al.* (2023), poster. Etude de l'effet d'un apport en Si sur l'absorption du S par les racines de *Brassica napus* L. alimenté ou carencé en S. Journées de la SFR Normandie Végétal (NORVEGE), 2023, Rouen (FR).

Coquerel, R et *al.* (2023), oral. Effet de l'apport de silicium sur la nodulation et la capacité de fixation de N_2 de *Trifolium incarnatum* carencé ou non en S. Journées de la SFR Normandie Végétal (NORVEGE), 2023, Rouen (FR).

Coquerel, R et *al.* (2023), poster. Effect of silicon supply on nodulation and N_2 fixation capacity of *Trifolium incarnatum* grown in S-fed and S-deprived conditions. Biostimulant World Congress, 2023, Milan (IT).

Interventions de médiation :

2023 : Participation à la 32ème édition de la Fête de la Science (Caen).

2024 : Finaliste régional du concours "Ma Thèse en 180 secondes" (MT180) Normandie

2024 : Participation au Prix musée Schlumberger avec le projet "L'herbe y est" en association avec J. DELAMARE.

2024 : Production du podcast "Normands & Doctorants" en collaboration avec M. GUILLEMOIS et C. MESNAGE.

Enseignements :

2022 - 2023 :

— 45h TD de Statistique au Licence 2 sciences de la vie.

— 4h TD et 18h TP de Biodiversité des végétaux et des champignons au Licence 1 sciences de la vie.

2023 - 2024 :

— 10h TD et 24h TP de Biodiversité des végétaux et des champignons au Licence 1 sciences de la vie.

— 30h TP de Méthodologie en Biologie végétale au Licence 1 sciences de la vie.

Encadrement de stagiaire :

2024 : Encadrement de Carole LOTIN dans le cadre d'un stage de 1ère année de master sur la thématique de "Élaboration d'un modèle de prédiction des teneurs en silicium chez le colza et le trèfle incarnat par spectrométrie proche infra-rouge" (UMR EVA, INRAE, Caen).

Activité au sein de l'EDnBISE :

2024 : Représentant doctorant de l'EDnBISE.

Posters

Coquerel, R et *al.* (2022) NIRStradamus : La spectrométrie proche infrarouge comme outils de pilotage de la fertilisation. Journées de la SFR Normandie Végétal (NORVEGE), 2022, Saint-Malo (FR).

Coquerel, R et *al.* (2023) Effect of silicon supply on root sulphur uptake in S-fed and S-deprived *Brassica napus* L. Plant Biology Europe, 2023, Marseille (FR).

Coquerel, R et *al.* (2023) Etude de l'effet d'un apport en Si sur l'absorption du S par les racines de *Brassica napus* L. alimenté ou carencé en S. Journées de la SFR Normandie Végétal (NORVEGE), 2023, Rouen (FR).

Coquerel, R et *al.* (2023) Effect of silicon supply on nodulation and N_2 fixation capacity of *Trifolium incarnatum* grown in S-fed and S-deprived conditions. Biostimulant World Congress, 2023, Milan (IT).

4ème Journées de la SF Normandie Végétal | CMI Saint-Malo 9-10 Juin 2022

NIRStradamus : La spectrométrie proche infrarouge comme outil de pilotage de la fertilisation

COQUEREL Raphaël[1], LAINE Philippe[1], ETIENNE Philippe[1]

[1] : Unicaen, INRAE, UMR 950 EVA, SF Normandie Végétal, 14000 CAEN

- Contexte -

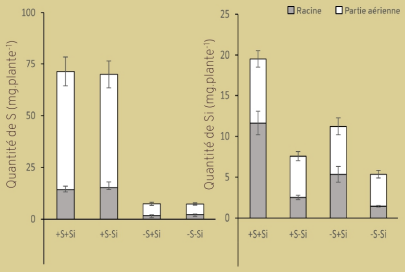
Un pilotage optimal de la fertilisation est essentiel à l'obtention d'un produit récolté de qualité tout en limitant l'impact environnemental des cultures. Dans cette optique, de nombreux outils ont vu le jour (N-tester, N-sensor, farmstar, etc ...) dans le but de piloter la fertilisation azotée. Mais une fertilisation optimale ne doit pas se focaliser exclusivement sur l'azote sous peine de perte de rendement et de qualité (Poisson et al., 2019). Actuellement peu d'outils permettent la réalisation d'une analyse multi élémentaire non-destructive en milieu naturel. L'utilisation de la spectrométrie proche infrarouge pourrait permettre de palier à ce problème. L'objectif de nos travaux est donc de mettre en évidence une potentielle corrélation entre des spectres NIRS et le statut en soufre (S) et en silicium (Si) des plantes.

- Matériels et méthodes -

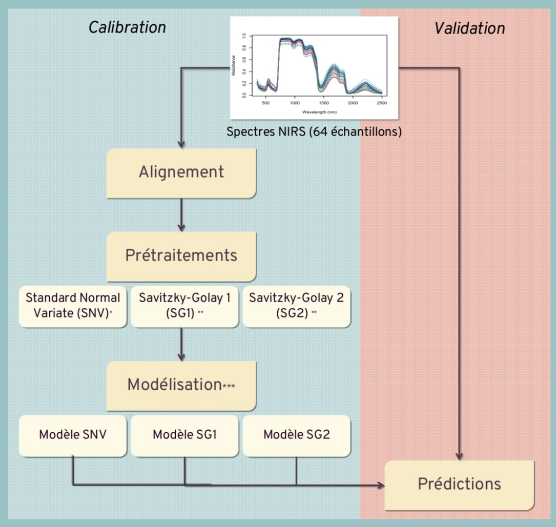
Une culture de colza a été réalisée en conditions hydroponiques, sous 4 modalités de fertilisation S et Si (S+Si+ ; S+Si- ; S-Si+ ; S-Si-).

Les quantités de S et de Si présents dans les racines et les parties aériennes ont été déterminées à l'aide de la fluorescence à rayon X (XRF).

Un analyseur ASD LabSpec ® , opérant entre 350nm - 2500nm, a été utilisé pour la réalisation des spectres NIRS au cours de cette culture. Ces derniers ont été mis en relation avec les statuts S et Si afin d'observer une potentielle relation.



- Modélisation -



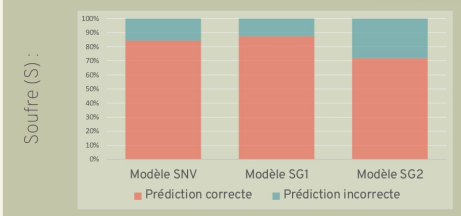
*: Standard Normal Variate permettant de supprimer les variations additives et multiplicatives de la ligne de base sans modifier la forme des spectres.

**: Utilisation de l'algorithme de Savitzky-Golay permettant de lisser les données et d'en extraire les dérivées successives

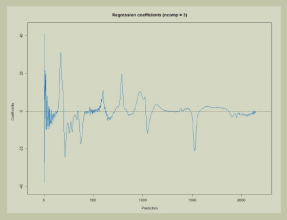
***: Modèles générés par analyses discriminantes des moindres carrés partiels (PLS-DA)

- Résultats -

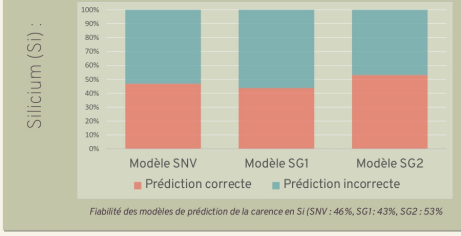
Les modèles générés ont été testés à l'aide d'un jeu de données de validation. Cette étape permet de tester leurs fiabilités en comparant les prédictions aux données mesurées.



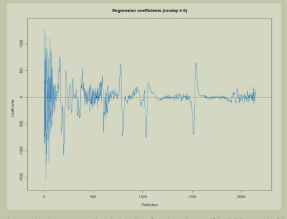
Fiabilité des modèles de prédiction de la carence en S (SNV : 84%, SG1 : 87%, SG2 : 71%



Importance des longueurs d'onde impliquées dans le modèle SG1 pour le S



Fiabilité des modèles de prédiction de la carence en Si (SNV : 46%, SG1 : 43%, SG2 : 53%



Importance des longueurs d'onde impliquées dans le modèle SG2 pour le Si

- Conclusions -

Les résultats obtenus montrent que la spectrométrie proche infrarouge (NIRS) couplée à des analyses discriminantes des moindres carrés partiels (PLS-DA, ***) permettent l'élaboration de modèles (SNV, SG1, SG2) capables de détecter une carence en S mais pas en Si chez les plantes cultivées en conditions contrôlées.

L'utilisation de jeux de données plus amples (statuts en S et Si plus contrastés) obtenus à partir de plantes cultivées en conditions contrôlées et en condition de plein champ pourrait améliorer les modèles de prédiction.

L'analyse des différentes longueurs d'onde reflétant le statut en S des plantes permettra d'identifier les molécules affectées par la carence.

Références :

Poisson E, Trouverie J, Brunel-Muguet S, Akmouche Y, Pontet C, Pinochet X and Avice J-C (2019) Seed Yield Components and Seed Quality of Oilseed Rape Are Impacted by Sulfur Fertilization and Its Interactions With Nitrogen Fertilization. Front. Plant Sci. 10:458. doi: 10.3389/fpls.2019.00458

Sergey Kucheryavskiy, *mdatools – R package for chemometrics*, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, Volume 198, 2020. doi : 10.1016/j.chemolab.2020.103937

Remerciements :

Les auteurs remercient la Région Normandie de contribuer au financement de ces travaux de recherche (projet RIN doctorant 100%) ainsi que la plateforme PLATIN' (PLATeau d'Isotopie de Normandie) pour la réalisation des analyses élémentaires et isotopiques.

MARSEILLE PBE 2023 Plant Biology Europe — 2023 July 3 – 6 Palais du Pharo Marseille

Effect of silicon supply in S-fed and S-deprived *Brassica napus* L.

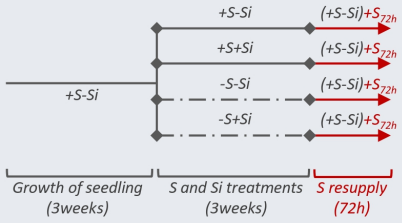
Raphaël Coquerel [1], Philippe Laîné[1], Mustapha Arkoun [2], Jacques Trouverie [1], Philippe Etienne [1]

[1] Unicaen, INRAE, UMR 950 EVA, SF Normandie Végétal (FED4277), Normandie Université, 14000 Caen, France
[2] Laboratoire de Nutrition Végétale, Agro Innovation International-TIMAC AGRO, 35400 Saint-Malo, France

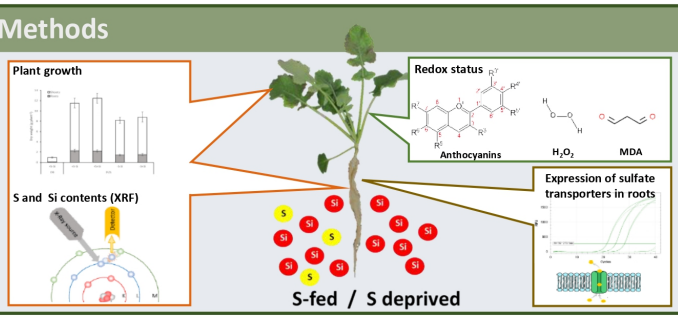
Context & objectives

Sulfur (S) is an essential element for growth and quality product in *Brassica napus* L. Interestingly, the addition of silicon (Si) to crops under biotic and abiotic stress conditions, improves their resistance and the quality and yield of the crops harvested. However, in literature, effect of Si supply to alleviate S deficiency is poorly documented. The aims of this study were to assess whether a Si supply can alleviate negative effect of S deficiency in *Brassica napus* L. For this, effects of Si supply on growth, sulfur amount and expression of gene encoding root sulfate transporters have been monitored in plants subjected (S) or not to S-deficiency (+S) for 3 weeks and resupplied with S during 72h.

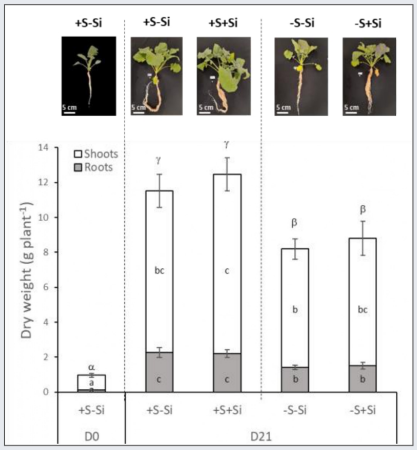
Experimental design



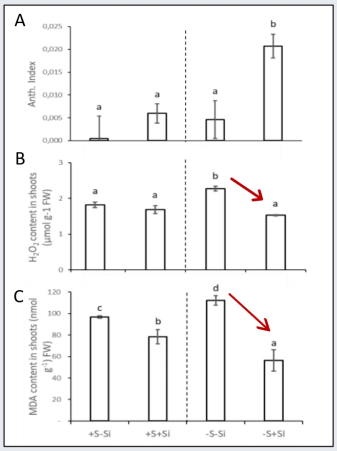
Methods



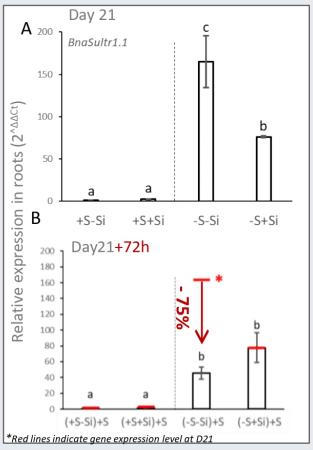
Main results



S deprivation during 21 days leads to a **decrease in whole plant biomass. However, whatever the S nutrition (+S or -S), Si supply has no effect on plant growth.**



After 21 days of S deprivation, Si supply leads to a reduction in oxidative stress reflected by **an increase in anthocyanin content** (A) and **a decrease in H_2O_2** (B) **and MDA contents in shoots** (C).



In S deprived plants, the induction of ***BnaSultr 1.1* is lower in +Si than in -Si plants** (A)**. Surprisingly, in plants previously deprived of S, sulfur resupply maintains the expression of *BnaSultr 1.1* in +Si plants while it is strongly reduced in -Si plants** (B).

Conclusion & perspectives

The current study is only the third to investigate S-Si interactions and the first to explore the effect of Si supply to alleviate S deficiency in *Brassica napus* L., a field crop of substantial agronomic interest with high sulfur requirements and low Si accumulation.
Interestingly, this study reveals that Si supply leads to a lower induction of the expression of genes encoding sulfate transporters (especially *BnaSultr1.1*) in roots of -S+Si plants compared to -S-Si plants. After the period of S-deprivation, S resupply leads to a down regulation of expression of this transporter which is lower in +Si than -Si plants. This maintain of expression of sulfate transporter could enable of +Si plants to take up sulfur more efficiently over a longer period than -Si plants. The results of this study suggest new investigation ways to elucidate the role of Si to alleviate the negative effect of S deficiency in *Brassica napus*.

The authors would like to thank the "Region Normandie" for its support for research in Normandy and especially for funding the RIN grant to R.C.

Contact author : Raphaël Coquerel
Mail : raphael.coquerel@unicaen.fr
Post : Université de Caen Normandie, UMR INRAE-UNICAEN 950 EVA, Esplanade de la Paix CS 14032, 14032 Caen cedex 5

Article available here :

5èmes Journées de la SFR NORVEGE & de l'Entente franco-québécoise NOR-SÈVE, Rouen 11 & 12 juillet 2023

Si supplementation modulates expression of genes encoding sulfate transporters in S-deprived *Brassica napus* L.

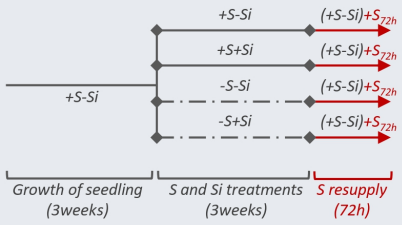
Raphaël Coquerel [1], Philippe Laîné[1], Mustapha Arkoun [2], Jacques Trouverie [1], Philippe Etienne [1]

[1] Unicaen, INRAE, UMR 950 EVA, SF Normandie Végétal (FED4277), Normandie Université, 14000 Caen, France
[2] Laboratoire de Nutrition Végétale, Agro Innovation International-TIMAC AGRO, 35400 Saint-Malo, France

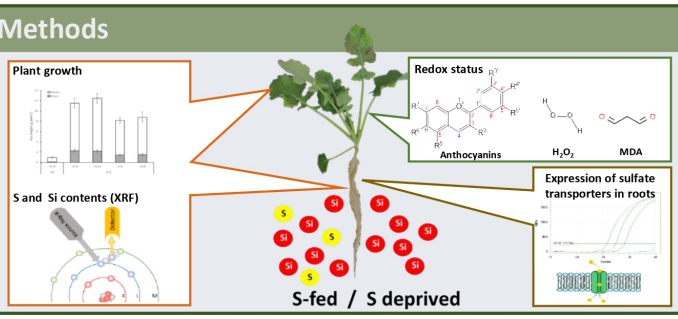
Context & objectives

Sulfur (S) is an essential element for growth and quality product in *Brassica napus* L. Interestingly, the addition of silicon (Si) to crops under biotic and abiotic stress conditions, improves their resistance and the quality and yield of the crops harvested. However, in literature, effect of Si supply to alleviate S deficiency is poorly documented. The aims of this study were to assess whether a Si supply can alleviate negative effect of S deficiency in *Brassica napus* L. For this, effects of Si supply on growth, sulfur amount and expression of gene encoding root sulfate transporters have been monitored in plants subjected (S) or not to S-deficiency (+S) for 3 weeks and resupplied with S during 72h.

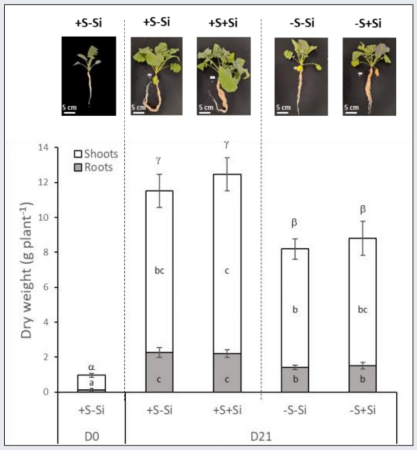
Experimental design



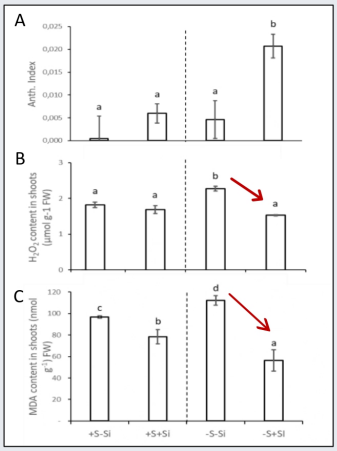
Methods



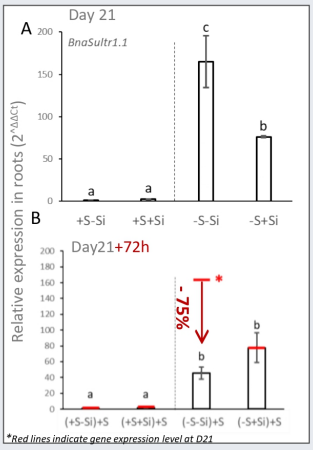
Main results



S deprivation during 21 days leads to a **decrease in whole plant biomass. However, whatever the S nutrition (+S or -S), Si supply has no effect on plant growth.**



After 21 days of S deprivation, Si supply leads to a reduction in oxidative stress reflected by **an increase in anthocyanin content** (A) and **a decrease in H_2O_2** (B) **and MDA contents in shoots** (C).



In S deprived plants, the induction of ***BnaSultr 1.1* is lower in +Si than in -Si plants** (A)**. Surprisingly, in plants previously deprived of S, sulfur resupply maintains the expression of *BnaSultr 1.1* in +Si plants while it is strongly reduced in -Si plants** (B).

Conclusion & perspectives

The current study is only the third to investigate S-Si interactions and the first to explore the effect of Si supply to alleviate S deficiency in *Brassica napus* L., a field crop of substantial agronomic interest with high sulfur requirements and low Si accumulation.
Interestingly, this study reveals that Si supply leads to a lower induction of the expression of genes encoding sulfate transporters (especially *BnaSultr1.1*) in roots of -S+Si plants compared to -S-Si plants. After the period of S-deprivation, S resupply leads to a down regulation of expression of this transporter which is lower in +Si than -Si plants. This maintain of expression of sulfate transporter could enable of +Si plants to take up sulfur more efficiently over a longer period than -Si plants. The results of this study suggest new investigation ways to elucidate the role of Si to alleviate the negative effect of S deficiency in *Brassica napus*.

The authors would like to thank the "Region Normandie" for its support for research in Normandy and especially for funding the RIN grant to R.C.

Contact author : Raphaël Coquerel
Mail : raphael.coquerel@unicaen.fr
Post : Université de Caen Normandie, UMR INRAE-UNICAEN 950 EVA, Esplanade de la Paix CS 14032, 14032 Caen cedex 5

Article available here :

Effect of silicon supply on nodulation and N_2 fixation capacity of *Trifolium incarnatum* grown in S-fed and S-deprived conditions

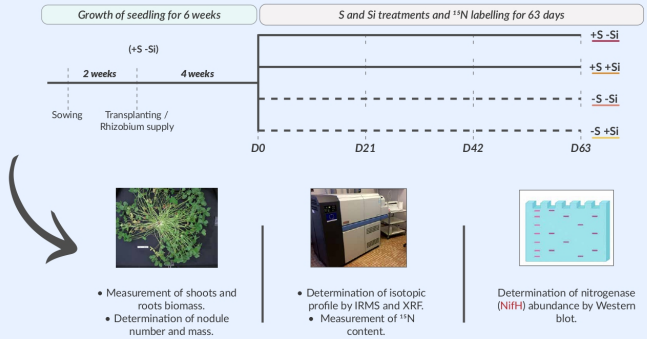
Raphaël Coquerel[1], Mustapha Arkoun[2], Quentin Dupas[1], Fanny Leroy[3], Philippe Etienne[1] and Philippe Laîné[1]

[1] Unicaen, INRAE, UMR 950 EVA, SF Normandie Végétal (FED4277), Normandie Université, 14000 Caen, France
[2] Laboratoire de Nutrition Végétale, Agro Innovation International-TIMAC AGRO, 35400 Saint-Malo, France
[3] Plateau Technique d'Isotopie de Normandie (PLATIN'), Unité de Services EMERODE, Normandie Université, 14000 Caen, France

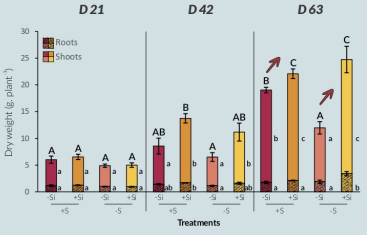
Context & Objectives

Sulfur deficiency leads to many metabolic perturbations such as reduced atmospheric dinitrogen (N_2) fixation and nitrogen (N) uptake from soil and it usually leads to sharp drops in the yield and quality of the harvested products in *Trifolium incarnatum*. Interestingly, the addition of silicon (Si) to crops under biotic and abiotic stress conditions, improves their resistance and the quality and yield of the crops harvested.However, in literature, effect of Si supply to alleviate S deficiency is poorly documented. The aims of this study were to assess the effect of silicon supply in *Trifolium incarnatum* subjected (or not) to a long-term S deficiency.For this, the effect of Si supply on the growth, nodulation (number, biomass and nitrogenase abundance of nodules) and atmospheric N_2 fixation capacity of plants was performed in S-deprived (-S) or S-fed (+S) plants and those supplied (+Si) or not (-Si) with Si.

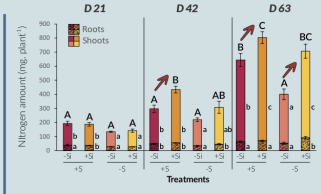
Experimental design



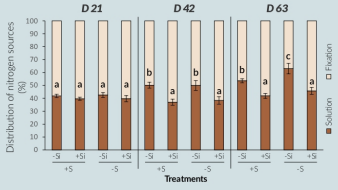
Results



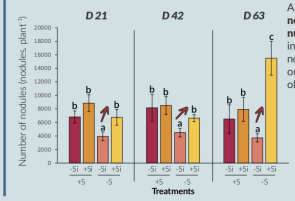
At D63, a Si supply led to a **significant increase in shoot biomass** in both +S and -S plants. In comparison to +S plants, at D63 -S plants have a lower total biomass when plants were cultivated without Si. Whathever S treatment was considered (+S or -S), Si supplementation resulted in an **increase in total plant biomass**.



Si supply led to an **increase in total nitrogen amount** in +S plants from D42 and in -S plants only at D63.

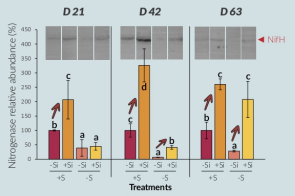


From D42 a Si supply led to an **increase of N_2 fixation capacity** of +S and -S plants.v



A Si supply to -S plants **alleviated the negative effect of S deprivation on the number of nodules per plant**, a high increase at D63 (15,000 vs. 4000 nodules plant⁻¹ in +S plants supply (+Si) or not (-Si) with Si, respectively) is observed.

A Si supply to +S plants **increase the relative nitrogenase abundance** at every dates, for -S plants the same result is observed from D42.



Conclusion

The current study has shown clearly that supplying Si alleviates the negative effects of S-deprivation in *Trifolium incarnatum*, especially by promoting root nodulation and N_2 fixation. Interestingly, this study shows that Si supplementation increases biomass and the total nitrogen amount in plants gronwed with or whitout S. In addition, we found that this increase in total nitrogen amount results in both nitrogenase abundance and nodules numbers which lead to an improvement of N_2 fixation capacity especially in plant growned under S defiency. All these results pave the way for new agricultural and agroecological practices to limit the negative effects of S deprivation on agronomic performance of *Trifolium incarnatum*.

Full article available here :

Titre : Etude d'un apport de silicium sur le métabolisme azoté et les performances agronomiques du colza (*Brassica napus* L.) et du trèfle (T*rifolium incarnatum* L.) cultivés en monoculture et en association.

Résumé : Chaque année, plus de 3,7 millions de tonnes d'engrais azotés sont utilisées par l'agriculture française. Bien qu'étant un élément essentiel au bon développement et à la bonne croissance des plantes, la fertilisation azotée est de plus en plus décriée en raison des nombreuses nuisances aux écosystèmes et à la biodiversité qu'il induit. Le colza (*Brassica napus* L.) est l'une des plantes de grandes cultures les plus exigeantes en azote (N), en raison de sa faible efficience d'usage de cet élément. Dans le but de maintenir une croissance et des rendements optimaux de la culture de colza tout en limitant les apports en fertilisants azotés, il est essentiel de mettre au point de nouvelles pratiques culturales plus respectueuses de l'environnement. Dans ce contexte, l'utilisation combinée des cultures associées à base de Fabacées et de produits biostimulants constitue une alternative intéressante aux pratiques actuelles de la culture de colza. Du fait de ses nombreux effets bénéfiques lors de stress biotiques et abiotiques, le silicium (Si) semble être un biostimulant pertinent. Les objectifs de ces travaux de thèse visent à observer les effets d'un apport en Si sur (i) les performances agronomiques du colza et du trèfle en monoculture cultivés en conditions contrôlées et (ii) sur une possible potentialisation du fonctionnement de l'association colza-trèfle incarnat. Dans un premier temps, nos travaux ont permis de montrer qu'en condition de carence en soufre (S), un apport de Si s'accompagne d'une baisse du stress oxydatif et d'une modulation de l'expression des gènes codant les transporteurs racinaires de sulfate qui permet aux plantes traitées au Si d'être plus efficaces pour absorber le S lorsque celui-ci est à nouveau disponible. Dans un second temps, l'apport de Si à une culture de trèfle incarnat soumis à une carence en S ou cultivé avec une solution nutritive dépourvue d'N a un impact positif sur la nodulation et les capacités de fixation du diazote atmosphérique. Le Si induit une augmentation significative du nombre de nodules racinaires ainsi que de leur teneur en nitrogénase. En outre, l'étude du ionome et du protéome des nodules a permis de mieux comprendre les effets d'un apport en Si en montrant notamment l'accumulation d'éléments et de protéines impliqués directement ou indirectement dans la fixation de diazote atmosphérique. Enfin, nos travaux ont mis en lumière les effets bénéfiques d'un apport en Si sur une association colza-trèfle notamment en augmentant le transfert d'N de la Fabacée vers la Brassicacée et en améliorant le rendement grainier du colza.

Mots-clés : Colza (*Brassica napus* L.), culture associée, fixation et transfert d'azote, nodulation, nutritions azotée et soufrée, silicium, trèfle incarnat (*Trifolium incarnatum* L.).

Title: Impact of silicon on nitrogen metabolism and agronomic performances of rapeseed (*Brassica napus* L.) and crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.) grown in monoculture and in association.

Abstract: Over 3.7 million tonnes of N fertilizers are used in French agriculture every year. Although N fertilization is an essential element for the growth of crops, it is increasingly criticized for its harmful effects on ecosystems and biodiversity. rapeseed (*Brassica napus* L.) is one of the most N requiring field crops, due to its low N use efficiency. To maintain optimum the growth and the yield of rapeseed with lower N fertilizer inputs, it is crucial to develop new cultural practices more respectful of environment. In this context, the combination of rapeseed-clover intercrops and biostimulants is an interesting alternative to the current cultivation practices of rapeseed. Considering its numerous beneficial effects under biotic and abiotic stresses, Silicon (Si) appears to be a relevant biostimulant. The aim of this PhD work was to observe the effects of Si supply on (i) the agronomic performance of monoculture rapeseed and clover grown under controlled conditions, and (ii) the possible potentiation of the functioning of the rapeseed-clover intercrop. Firstly, our work has shown that under sulfur (S) deficiency conditions, the supply of Si leads to a reduction in oxidative stress and modulation of the expression of genes encoding root sulfate transporters, allowing +Si plants to take up S more efficiently when it becomes available again. Secondly, the Si supply to crimson clover subjected under S-deficiency or or grown without N in the nutrient solution, had a positive impact on nodulation and atmospheric dinitrogen fixation capacities. Si induces a significant increase in the number of root nodules and their nitrogenase content. In addition, the study of the nodule ionome and proteome has enhanced our knowledge of the benefit effects of Si supply, particularly by showing the accumulation of elements and proteins directly or indirectly involved in the fixation of atmospheric dinitrogen. Finally, our work has highlighted the beneficial effects of Si supply on a rapeseed-clover intercrop, notably by increasing the N transfer from the Fabaceae to the Brassicaceae and improving the yield of the rapeseed.

Keywords: Crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.), intercropping, nitrogen and sulfur nutritions, nitrogen fixation and transfer, nodulation, rapeseed (*Brassica napus* L.), silicon.