Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES AGRONOMIQUES, BIOTECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES

Préparée au sein de l'UMR INRAE-UCN 950 EVA

Effets des stress thermiques répétés sur le rendement et la qualité grainière du colza : caractérisation écophysiologique et modélisation

Présentée et soutenue par
LETHICIA MAGNO MASSUIA DE ALMEIDA

Soutenance prévue le 07 décembre 2022
devant le jury composé de

M. Philippe DEBAEKE	Directeur de recherche, INRAE, UMR AGIR, Toulouse	Rapporteur du jury
Mme Christine GRANIER	Directrice de recherche, INRAE, UMR AGAP, Montpellier	Rapporteur du jury
M. Jean-Christophe AVICE	Professeur, Université de Caen Normandie, Caen	Membre du jury
Mme Alice BAUX	Chercheuse, Agroscope, Nyon, Suisse	Membre du jury
Mme Marie LAUNAY	Ingénieure de Recherche, INRAE, US Agroclim, Avignon	Membre du jury
Mme Marie-Pascale PRUD'HOMME	Professeure, Université de Caen Normandie, Caen	Membre du jury
Mme Sophie BRUNEL-MUGUET	Chargée de recherche, INRAE, UMR EVA, Caen	Directrice de thèse
M. Alain MOLLIER	Chargé de recherche, INRAE, UMR ISPA, Bordeaux	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par Sophie BRUNEL-MUGUET (INRAE, UMR EVA, Caen) et Alain MOLLIER (INRAE, UMR ISPA, Bordeaux)

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

INRAE la science pour la vie, l'humain, la terre

EVA Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N,C,S

Effets des stress thermiques répétés sur le rendement et la qualité grainière du colza : caractérisation écophysiologique et modélisation

"But being a scientist is not just a profession.

It's a frame of mind - a mode of thinking that differs from preaching, prosecuting, and politicking."

Adam Grant, Think again: The power of knowing what you don't know

Remerciements

On m'a dit que quand on se lance dans la rédaction des remerciements c'est parce que le plus dur est déjà fini ! Et voilà que ce moment est arrivé pour moi, la fin d'un cycle. Je termine cette aventure avec un mélange d'émotions qui peuvent être résumés en trois mots : fierté, soulagement et gratitude. Gratitude pour l'ensemble des personnes qui ont participé à ce travail de façon directe ou indirecte. Ce manuscrit est l'occasion de vous remercier.

D'abord, je tiens à remercier tous les membres de mon jury de thèse pour votre temps et vos partages de connaissances. Grand merci à **Christine Granier** et **Philippe Debaeke** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Merci à **Alice Baux, Marie Launay, Marie-Pascale Prud'homme** et **Jean-Christophe Avice** qui ont accepté d'être les examinateurs de mes travaux. Veuillez m'excuser pour les « s » ou « e » potentiellement manquants dans certaines parties de ce manuscrit, le français reste une langue assez complexe quand-même !

Je remercie chaleureusement mes directeurs de thèse pour leur soutien et conseils. **Sophie**, merci pour toute la confiance que tu m'as accordé depuis 2018. J'admire énormément ta capacité de mettre en place des recherches très complexes tout en étant une personne extrêmement bienveillante, positive et dynamique. Tu m'as appris beaucoup de choses pendant ces trois dernières années, d'une part évidement concernant de questions scientifiques, mais aussi beaucoup d'autres aspects importants (rigueur, curiosité, ouverture d'esprit, conceptualisation des idées, rédaction et même des expressions françaises !). Je suis ravie d'avoir partagé avec toi non seulement des conquêtes au niveau professionnel, mais aussi personnel (nos voyages, mon PACS, ton crochet, la naissance d'Apo). Merci infiniment de m'avoir soutenu dans toutes les étapes de mon doctorat, et même dans mes engagements extérieurs à la thèse. De plus, il faut quand-même souligner que nous sommes un binôme imbattable dans l'acquisition et la gestion de sous, hehe. **Alain**, je ne sais pas pourquoi mais souvent j'ai l'image du Yoda en tête quand je pense à toi ! Merci d'avoir participé activement de toutes des étapes de mon doctorat même en étant loin de Caen. Je te remercie énormément pour avoir été toujours là pour nous rappeler des objectifs et nous recentrer sur les priorités de ce travail, surtout quand je partais dans des idées un peu farfelues. J'oserai dire que tu étais un point d'équilibre très important tout au long de ma thèse ! Merci d'avoir apporté ton calme, ta bienveillance et ton savoir-faire, surtout en ce qui concerne R (PS : tu nous as convaincu que c'est beaucoup mieux qu'Excel !). Enfin, je voulais dire que j'ai beaucoup appris avec vous deux et que j'ai beaucoup apprécié nos réflexions ensemble. En plus, votre réactivité et rigueur m'ont permis de mener toute ma thèse dans un cadre paisible et rassurant, avec une planification bien construite et des objectifs clairs. Encore une fois, MERCI.

Je remercie **l'équipe de l'UMR EVA** pour leur accueil et leur soutien au bon déroulement de mon travail. Merci à **Marie-Pascale Prud'homme, Philippe Lainé** et **Philippe Etienne** pour leurs efforts en créant une ambiance agréable au labo, même avec toutes les difficultés que nous avons dû affronter pendant la période du COVID. Je remercie particulièrement **Jean-Christophe** et **Annette** pour leur partage d'expertises, leur aide précieuse dans l'amélioration de nos articles et leurs efforts pour sauver mes colzas pendant le confinement de 2020 (ah, des bons souvenirs !). Je tiens à remercier vivement toute l'équipe des combattants qui m'a aidé lors des manips en serre, des récoltes, ou encore pendant les merveilleuses séances de détente pendant le dépiautage des siliques de plus de 300 plantes du colza. Mentions spéciales à **Anne-Françoise** pour son savoir-faire exceptionnel dans la gestion des cultures en serre, à **Josiane** et **Magali** pour leur bonne humeur même pendant les manips les plus pénibles de récolte et broyage des colzas, à **Olivier** pour les relevés de température de la serre qui ont prouvé l'exactitude de nos protocoles de stress, à **Bénédicte** pour le gros travail de broyage des organes des colzas, à **Josette** pour son efficacité imbattable lors de micropesées, à **Aurélia** pour le partage de tout son expertise concernant les sucres et à toute l'équipe de **PLATIN'** pour leurs efforts en nous fournir des résultats fiables le plus rapidement possible. Ce travail n'aurait pas été possible sans votre collaboration.

En ce qui concerne l'ambiance, merci à **Jean-François** pour le papotage régulier, ton partage d'expériences et les discussions philosophiques… j'apprécie énormément ta sagesse et ta bienveillance ! Merci à **Jean-Christophe, Servane** et **Sylvain** pour m'avoir donnée l'opportunité de faire des cours aux Masters. Merci à **Jacques** pour le partage de son talent à résoudre des bricoles informatiques et à **Fred** pour toujours nous inspirer à réfléchir « out of the box ». Enfin, je ne peux pas oublier mes chers collègues doctorants et post-doctorants qui se sont occupés de mettre l'ambiance dans notre bureau, même si ma présence n'était pas si fréquente. Merci aux doctorants de la « vieille génération » **Mohamed, Victor, Aurélien, Galatéa, Hans, Charlotte** et ma chère **Hahn** pour leurs échanges d'expériences. Merci aux doctorants et post-docs de la « nouvelle génération » **Raphael, Jérémy, Antoine, Agathe, Anouk et Lorane** pour le soutien émotionnel converti sous forme de rigolades, ainsi que pour leur expertise concernant le colza, le monde de la recherche et les tests de personnalité.

En étant une thèse multidisciplinaire, je tiens également à remercier plusieurs personnes extérieures à l'UMR EVA qui ont fortement contribué à ce travail. Merci à **Miguel Couceiro** et **Yannick Toussaint**, ainsi qu'à leurs équipes, de m'avoir si gentiment accueilli au sein du LORIA. Mentions spéciales à **Nyoman Juniarta, Alexandre Bazin** et **Zachary Assoumani** qui ont accepté de discuter sur le data mining avec une agronome qui ne connaissait rien du

tout sur le sujet. Merci à **Nathalie Nesi, Anne Laperche** et **Erwan Corlouer** pour leur sympathique accueil au sein de l'IGEPP et leur partage de connaissances sur les jeux de données du projet RAPSODYN. Merci à **Nicolas Elie** et **Maelle Coquemont** du CMABio3 pour leur rigueur et réactivité concernant les analyses des graines du colza. Merci à **Tae-Hwan Kim** et **Dr. Bae** pour les analyses d'hormones à l'autre bout du monde. Merci à **Marina Le Guédard** pour les analyses et discussions concernant les lipides.

Je remercie également les membres de mon comité individuel de thèse (CSI) **Delphine Moreau, Sébastien Faure, Michael Aubert** et **Maeva Drouault** pour leurs conseils et regards extérieurs sur mon travail. Merci également à **Marie Launay** et **Iñaki Garcia de Cortazar-Atauri** pour les discussions très intéressantes que nous avons pu mener ensemble. Merci à **Mélanie Fortier** de m'avoir invité à participer de son CSI. Je remercie **Meg Letellier, Mathias Coulon** et **Candice Kerdreux** pour leur travail respectif lors des stages. De plus, merci également aux autres stagiaires avec qui j'ai pu collaborer (**Zachary et Guillaume**) de m'avoir donné l'opportunité de partager mes connaissances.

Enfin, je remercie toutes les sources de financements qui ont soutenu mon travail et les personnes que j'ai pu côtoyer tout au long de mon chemin dans ces trois dernières années. Mes expériences au sein du **Thought For Food** et du **World Food Forum** m'ont permis de créer des relations avec des personnes du monde entier et améliorer considérablement mon niveau d'anglais. Merci également à **Florian Andrianiazy** de PhDTalent et à l'équipe de **Technique Solaire** pour m'avoir offert l'opportunité exceptionnelle de faire une mission de conseil en entreprise en parallèle à ma thèse. C'était génial ! Merci aux bénévoles qui m'ont permis de faire deux retraites silencieuses au sein de **Dhamma Mahi**, vous m'avez appris à observer et accepter les changements constants.

Pour finir, je remercie ma **famille** qui m'envoie des énergies positives depuis les tropiques et en particulier ma mère **Luciana**, qui n'a toujours pas compris sur quoi je travaille, mais qui est toujours trop fière de moi. Merci aux **amis** et **collègues** qui m'ont encouragé et soutenu du début à la fin. Merci à mon cher **Alexandre** pour être toujours à mon côté (littéralement) à la maison et lors de nos voyages canon, dans la joie et la détresse. Tu as fortement contribué à mon équilibre émotionnel et physique (« L'important c'est de participer ! »).

Et merci à **moi-même** d'avoir gardé le cap.

Préambule

Ma thèse a été codirigée par Sophie Brunel-Muguet, Chargée de Recherches HDR à l'UMR Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions C.N.S. (EVA, Caen) et Alain Mollier, Chargé de Recherches HDR à l'UMR Interactions Sol Plante Atmosphère (ISPA, Bordeaux). J'ai été basée à l'UMR EVA pendant 3 ans, et plus particulièrement au sein de l'équipe Interactions Nutritionnelles, Conduites et Contraintes Abiotiques (INCCA). Les recherches menées au sein de l'**équipe INCCA** visent à améliorer (ou *a minima* maintenir) la productivité des agroécosystèmes et la qualité des produits récoltés dans un contexte agro-environnemental de diminution des intrants (notamment azotés et soufrés) et de changements globaux (principalement les stress thermique et hydrique). Ces recherches sont conduites à différentes échelles (de la parcelle aux gènes) qui peuvent être couplées à des approches de modélisation.

Pour réaliser ma thèse (projet « Colza Stress Modélisation », **COSMOS**), j'ai bénéficié d'un contrat doctoral cofinancé par l'INRAE et la COMUE Normandie Université. Les démarches mises en œuvre font suite au projet « Climat Change and Quality of fruit, grain and seeds in the next 40 years » (CAQ40), financé par le métaprogramme « Adaptation de l'Agriculture et de la Forêt au Changement Climatique » (ACCAF) de l'INRAE (2012-2016).

Les travaux réalisés tout au long de ma thèse ont été financés par plusieurs projets de recherche. Les premières expérimentations en serre et analyses biochimiques qui ont alimenté nos hypothèses sur la mémoire du stress thermique ont été réalisées dans le cadre d'un pari scientifique financé par le département Environnement-Agronomie de l'INRAE (désormais AgroEcoSystem, projet « MemorY foR oIlseed rApe aDaptation », **MYRIAD**). J'ai eu l'occasion de commencer mes travaux sur MYRIAD lors de mon stage de fin d'études à l'UMR EVA en 2018, pendant lequel j'ai réalisé les analyses biochimiques du projet (protéines, sucres, teneurs en C/N/S) et la rédaction d'un mémoire de fin d'études pour l'obtention du double-diplôme d'ingénieur de l'Institut Supérieur d'Agriculture de Lille (ISA Lille, France) et de l'Escola Superior de Agricultura « Luiz de Queiroz » (ESALQ, Brésil). Ce projet s'est poursuivi par deux autres projets de recherche visant à approfondir les résultats obtenus dans MYRIAD et à intégrer une approche de modélisation des stress thermiques répétés, à savoir le projet **MEMOSTRESS**, également financé par le métaprogramme ACCAF, et le projet « ModelIng cRop Responses tO Repeated Stresses » (**MIRRORS**), financé par le métaprogramme DIGIT-BIO. De plus, des financements complémentaires et des prix provenant de plusieurs institutions scientifiques françaises et européennes m'ont permis de financer une partie de mes séjours de travail à Nancy et Bordeaux, ainsi que ma participation aux congrès PBE 2021 (Turin, Italie) et IHC 2022 (Angers, France). Je remercie vivement tous ces soutiens.

Liste des abréviations

A

ABA : Abscisic Acid
AG : Acides Gras
AIC : Akaike Information Criterion

B

BSA : Bovine Sérum Albumine

C

C : Carbon
CDPK : Calcium-Dependent Protein Kinases
CFCA : Causal Formal Concept Analysis
CSN5A : Constitutive Photomorphogenesis 5A
CLT : Control

D

DAV : Days After Vernalization
DW : Dry Weight

E

EMS : Early Mild Stress

F

FA : Fatty Acid
FAMES: Fatty Acid Methyl Esters
FPCA : Focused Principal Components Analysis

G

GA3 : Acide Gibbérellique
GDD : Growing Degree Days
GES : Gaz à Effets de Serre
GS : Growth Stages

H

HE: Hematoxylin and Eosin
HS : High Sulphur
HSP : Heat Shock Protein
HSFA2 : Heat Shock Transcription Factor A2
HPLC : High Performance Liquid Chromatography

I

IAA : Indole-3-acetic acid

J

JA : Jasmonic Acid

L

LAI : Leaf Area Index
LS : Low Sulphur

M

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

N

N : Nitrogen

O

ORO: Oil Red O

P

PAI : Pod Area Index
PAR : Photosynthetically Active Radiation
PAS: Periodic Acid–Schiff
PCA : Principal Components Analysis
PMG : Poids de Mille Grains
PTGS : Post-Transcriptional Gene Silencing
PTMs : Modifications Post-Transcriptionnelles

R

RCP : Representative Concentration Pathway
REF6 : Relative of Early Flowering 6
REG : Réticulum Endoplasmique Granuleux
RFO : Raffinose Family Oligosaccharides
ROS : Reactive Oxygen Species
RSS : Repeated Stress Sequence

S

S : Sulphur
S-SO_4 : Soufre du sulfate
SA : Salicylic Acid
SAM : S-Adénosyl-Methionine
SFA : Saturated Fatty Acids
smRNA : Small RNA
SSP : Seed Storage Proteins
SSP : Shared Socioeconomic Pathways
SuMoToRI : Sulphur Model Towards Rapeseed Improvement

T

t : Tonnes
TAGs : Triacylglycérides
TDW : Total Dry Weight
TSW : Thousand Seed Weight
Tmax : Température maximale

U

UFA : Unsaturated fatty acids

CHIFFRES

3LHP : 3 Late Heat Peaks
4LHP : 4 Late Heat Peaks

Table des matières

Introduction générale **19**

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique **25**

1.1. Contexte agroclimatique ---------- 27

1.1.1. Le réchauffement climatique 27

1.1.2. Définition des vagues de chaleur et du stress thermique 29

1.1.3. Impacts du stress thermique sur les végétaux 31

1.1.4. Les stratégies de réponse des végétaux au stress thermique 36

1.1.5. Réflexion : quels impacts des stress thermiques répétés ? 39

1.2. La mémoire du stress ---------- 40

1.2.1. Définition du concept 40

1.2.2. Effets de la mémoire pendant le cycle de culture 42

1.2.3. Effets de la mémoire au cours des générations 44

1.2.4. Les mécanismes d'acquisition de la mémoire du stress 46

1.2.5. Réflexion : la mémoire peut-elle être un levier face aux stress répétés ? 48

1.3. La qualité grainière du colza d'hiver ---------- 49

1.3.1. Le colza : origine et aspects agronomiques 49

1.3.2. Importance de la fertilisation soufrée 51

1.3.3. Débouchés industriels des graines 53

1.3.4. Les composantes de rendement et définitions des critères de qualité 55

1.3.5. Développement de la graine du colza 58

1.3.6. Impacts du stress thermique sur le rendement et les qualités grainières 60

1.3.7. Réflexion : comment limiter les impacts des stress répétés ? 64

1.4. La prédiction des effets du stress thermique ---------- 66

1.4.1. Concepts généraux de modélisation des cultures 66

1.4.2. Les trois approches de modélisation testées dans le cadre de la thèse 67

1.4.3. Réflexion : comment prédire les effets des stress thermiques répétés ? 70

Chapitre 2 : Plan de recherche **72**

2.1. Problématique et objectifs ---------- 74

2.2. Axes de recherche et démarches associées ---------- 75

2.2.1. Axe I : Caractérisation écophysiologique 76

2.2.2. Axe II : Modélisation numérique 79

Chapitre 3 : Effets des stress répétés au cours d'un cycle de culture 82

3.1. Effets des stress thermiques répétés sur le rendement et la qualité grainière du colza, dans de conditions contrastées d'apport en soufre ---------- 84

3.1.1. Préambule 84

3.1.2. Introduction 86

3.1.3. Materials and methods 88

3.1.4. Results 94

3.1.5. Discussion 106

3.1.6. Conclusion 112

3.2. Effets des stress thermiques répétés sur le développement cinétique des composés de stockage dans la graine du colza ---------- 113

3.2.1. Préambule 113

3.2.2. Introduction 115

3.2.3. Materials and methods 117

3.2.4. Results 123

3.2.5. Discussion 134

3.2.6. Conclusion 139

Chapitre 4 : Effets des stress répétés sur deux générations successives 142

4.1. Effets des stress thermiques répétés sur le rendement et la qualité grainière du colza sur deux générations de plantes stressées ---------- 144

4.1.1. Préambule 144

4.1.2. Introduction 146

4.1.3. Materials and methods 148

4.1.4. Results 153

4.1.5. Discussion 167

4.1.6. Conclusion 174

Chapitre 5 : Modélisation des effets des stress thermiques répétés 176

5.1. Utilisation des indicateurs écoclimatiques pour améliorer la prise en compte des stress thermiques répétés dans les approches de modélisation ---------- 178

5.1.1. Préambule 178

5.1.2. Introduction 180

5.1.3. Materials and methods 182

5.1.4. Results 185

5.1.5. Discussion 190

5.1.6. Conclusion 196

5.2. Prise en compte des stress répétés dans les modèles (semi-) mécanistes ---- 204
5.2.1. Préambule 204
5.2.2. Fonctionnement du modèle SuMoToRI 205
5.2.3. Extension de la période de prédiction du modèle 208
5.2.4. Implémentation du modèle et évaluation des performances 213
5.2.5. Simulations en conditions de stress thermiques répétés 217
5.2.6. Conclusions et pistes d'amélioration 221
5.3. Analyses exploratoires avec des modèles de fouille de données ---------- 224
5.3.1. Préambule 224
5.3.2. Préparation des données et méthodologie 225
5.3.3. Méthode CFCA : concept et résultats 226
5.3.4. Méthode biclustering : concept et résultats 228
5.3.5. Conclusions et pistes d'amélioration 231

Chapitre 6 : Discussion générale et perspectives 234
6.1. Les stress répétés et la mémoire du stress ---------- 238
6.1.1. Effets intra- et intergénérationnels des stress thermiques 238
6.1.2. Caractéristiques des protocoles thermo-sensibilisants 241
6.1.3. Perspectives sur l'étude de la mémoire du stress 243
6.2. Apports et applications de la modélisation ---------- 245
6.2.1. Effets des stress répétés au sein des modèles de culture 245
6.2.2. Amélioration de la prédiction des effets des stress répétés 246
6.2.3. Perspectives sur la modélisation des stress répétés 247

Liste des activités scientifiques 250

Annexes 256

Références 288

Résumé 307

Introduction générale

Introduction générale

Le phénomène de stress thermique résultant du réchauffement climatique est un problème pour l'agriculture dans de nombreuses régions du monde. Faire face aux augmentations de la température et à sa variabilité constitue un défi important pour une productivité durable des cultures dans un avenir proche. De plus, les dernières projections climatiques ont mis en évidence une **tendance d'augmentation de la fréquence, de la durée et de l'intensité** des évènements climatiques extrêmes, telles que des vagues de chaleur (IPCC, 2021). Ainsi, il s'avère nécessaire d'approfondir les connaissances des réponses des plantes dans ce contexte de répétition des vagues de chaleur qui entraine des stress thermiques successifs, pour apporter de nouvelles stratégies d'acclimatation et/ou d'adaptation, et ainsi permettre d'améliorer la résilience des systèmes de cultures face au changement climatique.

Dans ce contexte climatique fluctuant, plusieurs stratégies d'amélioration génétique des plantes et de conduites de cultures sont développées (Ceccarelli et al., 2010; Soares et al., 2019b; Verma et al., 2020; Zheng et al., 2022a). De plus, des travaux récents font le constat que des conditions de stress modéré peuvent potentiellement permettre aux plantes de se sensibiliser et de répondre de façon plus rapide, plus sensible et/ou plus efficace à des stress postérieurs grâce à un « **effet mémoire** » bénéfique du premier stress (Boyko and Kovalchuk, 2011; Crisp et al., 2016; Kinoshita and Seki, 2014; Lämke and Bäurle, 2017). Ainsi, la caractérisation de ces « effets mémoire » permettrait d'une part une meilleure compréhension de la réponse des plantes dans un contexte de stress thermiques répétés, et d'autre part d'améliorer la prédiction de ces effets dans les approches de modélisation, en considérant des scénarios climatiques plus réalistes et proches des projections

Avec une production en forte hausse depuis 30 ans, le **colza d'hiver** est la première culture oléagineuse en termes de surface cultivée et de production de grains en Europe, devant le tournesol et le soja (Annexe 1, Terres Univia, 2021). L'huile extraite des graines est principalement destinée à l'alimentation humaine, ainsi qu'à l'élaboration de biocarburant et de sous-produits liés à l'essor des filières de la chimie verte (lubrifiants, détergents, cosmétiques). De plus, le tourteau, qui est un sous-produit de la trituration des graines, est très riche en protéines et est de plus en plus utilisé dans l'alimentation animale à la place du tourteau de soja. Ainsi, la diversité des débouchés fait du colza une culture majeure pour répondre aux demandes énergétiques croissantes et assurer la sécurité alimentaire mondiale (Von Der Haar et al., 2014). Le défi des prochaines décennies est donc de maintenir voire augmenter le rendement de cette culture, tout en améliorant également la qualité des graines

et en optimisant son bilan agroenvironnemental (e.g. fertilisation raisonnée, réduction de l'apport des produits phytosanitaires), et ce dans un contexte de changement climatique.

Cette thèse a donc visé à analyser les **impacts des stress thermiques répétés sur le rendement et la qualité grainière** du colza en interaction avec la nutrition soufrée, en couplant une caractérisation écophysiologique à différentes approches de modélisation. Dans ce contexte qui associe la variabilité climatique, une demande alimentaire croissante et la prise en compte de l'environnement par le biais du développement des systèmes agricoles plus durables, les **objectifs associés** à ce travail sont de (i) comprendre les effets de différentes séquences d'évènements stressants qui peuvent expliquer une thermo-sensibilisation du colza à des stress thermiques répétés au cours du cycle de culture et/ou sur deux générations de plantes stressées, et (ii) améliorer les prévisions des performances du colza en termes de rendement et de qualité des graines, par la prise en compte de l'effet des stress thermiques répétés dans des approches de modélisation agro-climatique (collaboration avec l'Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, IGEPP, INRAE, Le Rheu), mécaniste (collaboration avec l'UMR Interactions Sol Plante Atmosphère, ISPA, INRAE, Bordeaux) et des méthodes de fouille des données (collaboration avec le Laboratoire Lorrain de Recherche en Informatique et Applications, LORIA, INRIA, Nancy).

L'originalité de cette thèse repose sur la **caractérisation et la modélisation des effets des stress thermiques répétés** qui peuvent se traduire par des « effets mémoire » bénéfiques sur le rendement et la qualité grainière, encore très peu étudiés chez les grandes cultures telles que le colza. Notre hypothèse initiale sous-jacente est que la réponse des cultures à un événement thermique stressant (ici, des températures élevées) peut être modifiée suite à une exposition antérieure à un stress de même nature. De plus, les approches *in planta* et *in silico* s'avèrent complémentaires pour analyser les impacts de stress thermiques répétés sur les performances des cultures, puisqu'elles apportent des informations à la fois sur la physiologie de la réponse des végétaux aux stress, mais aussi sur les formalismes mathématiques pour les traduire numériquement, pour faire des prédictions et analyser les conséquences de séquences thermiques. Ce projet de thèse soulève des questions originales pour les écophysiologistes et les agronomes modélisateurs.

Présentation du manuscrit de thèse

- **Chapitre 1** : Introduction sur les thématiques centrales de la thèse, notamment les effets des stress thermiques sur les cultures, le concept de mémoire du stress, les critères de qualité de la graine du colza d'hiver et les particularités des différentes approches de modélisation.

- **Chapitre 2** : Explication de la problématique, des objectifs, des hypothèses, des stratégies adoptées et des axes du projet de recherche. Ce chapitre présente une vision générale des axes de recherche de la thèse, tandis que les méthodes détaillées sont présentées dans chaque chapitre de résultats associé.

- **Chapitre 3** : Présentation des résultats relatifs aux impacts des stress thermiques répétés appliqués au cours d'un cycle de culture, sur le rendement et la qualité grainière du colza. Ce chapitre est présenté sous forme d'un article publié (Magno et al., 2021 dans Environmental and Experimental Botany) et d'un article soumis (Magno et al., 2022 dans Plant Science).

- **Chapitre 4** : Présentation des résultats relatifs aux impacts des stress thermiques répétés sur le rendement et la qualité grainière de la deuxième génération des plantes stressées. Ce chapitre est présenté sous forme d'un article publié (Magno et al., 2022 dans Environmental and Experimental Botany).

- **Chapitre 5** : Présentation des résultats de modélisation, visant à prendre en compte les effets des stress thermiques répétés au moyen de différentes approches (i) modélisation agro-climatique, en utilisant des indicateurs écoclimatiques (présenté sous forme d'un article publié, Magno et al., 2022 dans European Journal of Agronomy) ; (ii) modélisation mécaniste en utilisant le modèle SuMoToRI (Brunel-Muguet et al., 2015a) ; et (iii) méthodes exploratoires de fouille des données (i.e. Causal Formal Concept Analysis et biclustering).

- **Chapitre 6** : Discussion générale, conclusion et perspectives à ces travaux.

- **Liste des activités scientifiques :** Liste des publications, des communications et d'autres activités scientifiques complémentaires.

- **Annexes :** Informations complémentaires, données supplémentaires, photos et posters.

- Références bibliographiques : L'ensemble des références bibliographiques sont présentées à la fin du manuscrit, en incluant celles citées dans les articles publiés.

- Résumé en français et en anglais.

Chapitre 1 :

Synthèse bibliographique

1.1. Contexte agroclimatique

1.1.1. Le réchauffement climatique

Le récent rapport du Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC, en anglais Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC) a analysé l'augmentation de la température moyenne de la surface terrestre et ses origines au cours des quatre dernières décennies, qui ont été chacune successivement plus chaude que toutes les décennies précédentes depuis 1850 (IPCC, 2021). Entre 2011-2020, la température à la surface terrestre (continentale et océanique) a augmenté en moyenne de 1,09 °C par rapport à la période 1850-1900, avec une **hausse sur les continents variant de 1,34 à 1,83 °C**. Ce contexte climatique est étroitement lié aux activités humaines qui induisent des émissions croissantes des gaz à effets de serre (GES) tels que le dioxyde de carbone, le méthane et le protoxyde d'azote. Ces émissions ont connu une forte hausse notamment depuis la première révolution industrielle, à la fin du XVIIIème siècle en Angleterre, qui a reposé sur l'utilisation d'énergies fossiles très génératrices des GES.

Dans la continuité des scenarii passés, les projections futures indiquent que la température terrestre continuera d'augmenter au moins jusqu'au milieu du siècle et ce quel que soit les scénarios d'émissions des GES envisagés. Par ailleurs, cinq scénarios qui couvrent un large éventail de variables ont été récemment publiés par le GIEC (IPCC, 2021), allant d'un scénario dans lequel les émissions de CO_2 diminuent drastiquement pour atteindre la neutralité carbone vers 2050 (SSP1-1.9) à un scénario dans lequel les émissions de CO_2 continuent d'augmenter fortement jusqu'à être deux fois supérieures aux niveaux actuels en 2050 (SSP5-8.5). Appelées SSP pour « **Shared Socioeconomic Pathways** », ils incluent non seulement des prévisions en termes d'émissions de GES, mais aussi des aspects économiques, politiques et sociaux.

En utilisant ces scénarios d'émissions de GES en entrée de modèles climatiques, il a été possible d'estimer leurs impacts futurs sur des variables climatiques. Par rapport à la période de référence 1850-1900, la température moyenne entre 2081-2100 sera très probablement supérieure de 1,0 à 1,8 °C avec le scénario prévoyant de très faibles émissions de GES (SSP1-1.9, dit « le plus optimiste »), mais elle pourra atteindre une augmentation de l'ordre de 3,3 à 5,7 °C avec le scénario prévoyant de très fortes émissions de GES (SSP5-8.5, dit « le plus pessimiste »). Tel qu'illustrées dans la Figure 1, ces tendances prévoient des augmentations plus importantes dans les régions continentales qu'océaniques, notamment dans les zones proches du pôle Arctique.

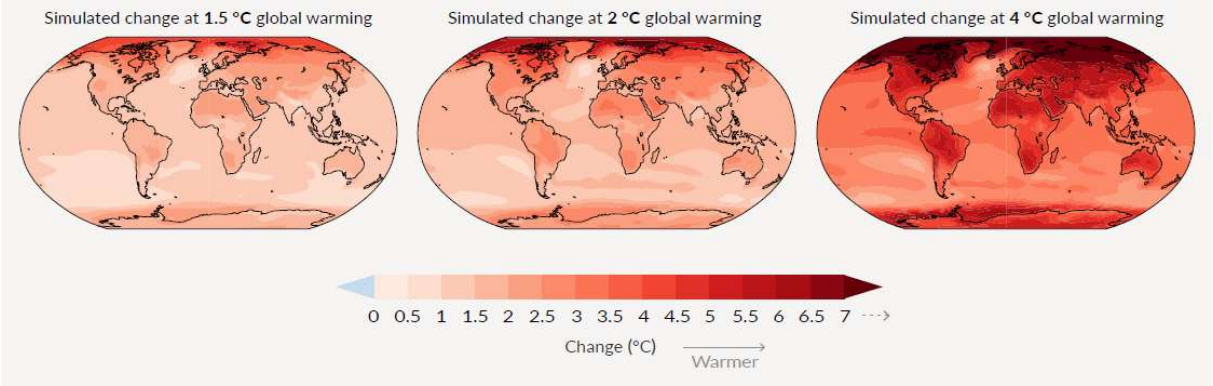


Figure 1 : Changement mondial de la température moyenne annuelle (°C), par rapport à 1850-1900. Les données simulées correspondent à des moyennes multi-modèles (IPCC, 2021).

En France, une augmentation de la température moyenne annuelle entre 0,6 et 1,3 °C (par rapport à la période de référence 1976-2005) est attendue d'ici 2050. Cette hausse devrait être plus importante dans le Sud-Est en été, avec des écarts à la référence pouvant atteindre de 1,5 à 2 °C (Ouzeau et al., 2014). Puisque les zones continentales se réchauffent plus rapidement que les zones océaniques, les températures moyennes nationales présentent toujours des augmentations plus importantes que la moyenne mondiale correspondante, pour le même scénario. La Figure 2 illustre l'augmentation historique des températures moyennes en France (°C) par rapport à la fin du 19ème siècle, ainsi que les projections futures simulées pour les scénarios intermédiaires SSP1-2.6, SSP2-4.5 et SSP3-7.0. Les données historiques montrent une augmentation observée de **2 °C en 2020, pouvant aller jusqu'à 4,4 °C en 2100**, en comparaison avec la période de référence 1850-1900 (Berkeley Earth, 2022).

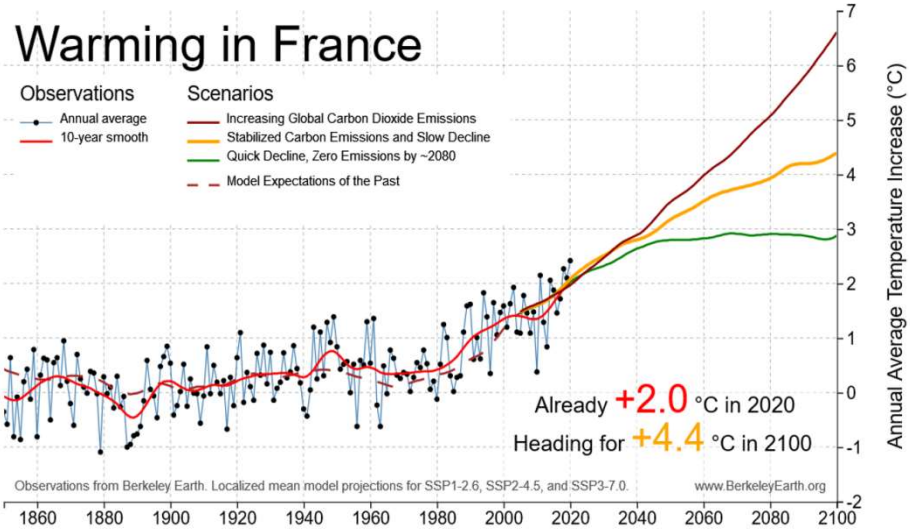


Figure 2 : Changement de la température moyenne annuelle (°C) en France, par rapport à 1850-1900. Les données historiques proviennent du Berkeley Earth's Land Temperature Dataset (Berkeley Earth, 2022).

Plusieurs conséquences environnementales sont attendues à cause de ce phénomène de réchauffement climatique (IPCC, 2021), notamment (i) l'augmentation de la fréquence et de l'intensité des évènements extrêmes (tels que les vagues de chaleur, fortes pluies) ; (ii) la sécheresse généralisée sur certaines régions du globe, qui impactera notamment la biodiversité et les productions agricoles ; (iii) l'occurrence accrue des catastrophes naturelles (telles que les ouragans, cyclones, feux de forêts) ; et (iv) la montée du niveau des océans. Les incertitudes concernant la sécurité alimentaire pour une population mondiale croissante sont d'autant plus préoccupantes dans ce contexte climatique (Gitz et al., 2016), ce qui a conduit l'Organisation des Nations Unies (ONU) à définir 17 objectifs de développement durable (ODD) au niveau mondial, qui inclut notamment les ODD « Pas de zone de famine » et « Action climatique » dans l'agenda (FAO, 2015). En effet, ces phénomènes climatiques associés à une demande alimentaire croissance attendue d'ici 2050, risquent d'exposer les populations et les écosystèmes à **plusieurs types de vulnérabilité**, tels que la pauvreté, la précarité climatique, l'incidence des maladies, la migration et la disparition des espèces. Les travaux sur les effets du réchauffement climatique sur les espèces végétales s'inscrivent donc dans une problématique associant des enjeux sociétaux, économiques et environnementaux.

1.1.2. Définition des vagues de chaleur et du stress thermique

Le contexte de réchauffement climatique inclut plusieurs notions telles que la météorologie, la variabilité climatique et les évènements extrêmes (Figure 3). A la différence de la **météorologie**, qui peut être très variable sur une base journalière, le **climat** est basé sur des moyennes observées sur une échelle de temps beaucoup plus longue. Cependant, le climat est également variable. En prenant la température comme exemple, la **variabilité climatique** concerne l'échelle de variation des observations en comparaison à une moyenne, due à des facteurs naturels et anthropiques. Différemment, les **événements extrêmes** sont des événements météorologiques ponctuels et spécifiques qui s'écartent de la moyenne de manière significative.

Même si les évènements extrêmes sont de plus en plus cités en littérature, sa définition précise reste encore **très dépendante du contexte dans lequel on l'utilise**. Pour les études d'impacts climatiques, ces évènements sont généralement définis via des « indices extrêmes », qui peuvent être basés sur sa probabilité d'occurrence ou sur des dépassements d'un seuil. En utilisant les vagues de chaleur comme exemple, ces « indices extrêmes » peuvent être calculés en considérant le nombre, le pourcentage ou la fraction de jours où la température maximale (Tmax) est supérieure au 90ème, 95ème ou 99ème percentile du jeu de données, généralement

définis pour des périodes spécifiques (mois, saison, année) par rapport à une période de référence (Seneviratne et al., 2012). Ces mêmes indices calculés sur des périodes journalières sont appelés « jours/nuits chauds » dans le langage courant, et leur utilisation permet de comparer des observations ou simulations entre différentes régions géographiques.

Le réchauffement climatique entraîne à la fois une augmentation des moyennes de référence sur l'échelle du temps, mais aussi une **probabilité accrue d'occurrence des événements extrêmes**, ces derniers contribuant également à la variabilité climatique (Figure 3). En effet, il a été démontré que chaque 0,5 °C supplémentaire dans les températures moyennes entraîne une augmentation perceptible de l'intensité et de la fréquence des évènements climatiques extrêmes, y compris les vagues de chaleur, les fortes précipitations et les sécheresses agricoles (IPCC, 2021). Par exemple, la probabilité qu'un jour d'été en France soit marqué par des vagues de chaleur (tels que les canicules) augmente à mesure que la moyenne des températures terrestres augmente (Ouzeau et al., 2014). De plus, plusieurs études ont mis en évidence une augmentation de la durée, fréquence et intensité des vagues de chaleur dans le monde (Bador et al., 2017; Christidis et al., 2015; Lemonsu et al., 2014; Trnka et al., 2014).

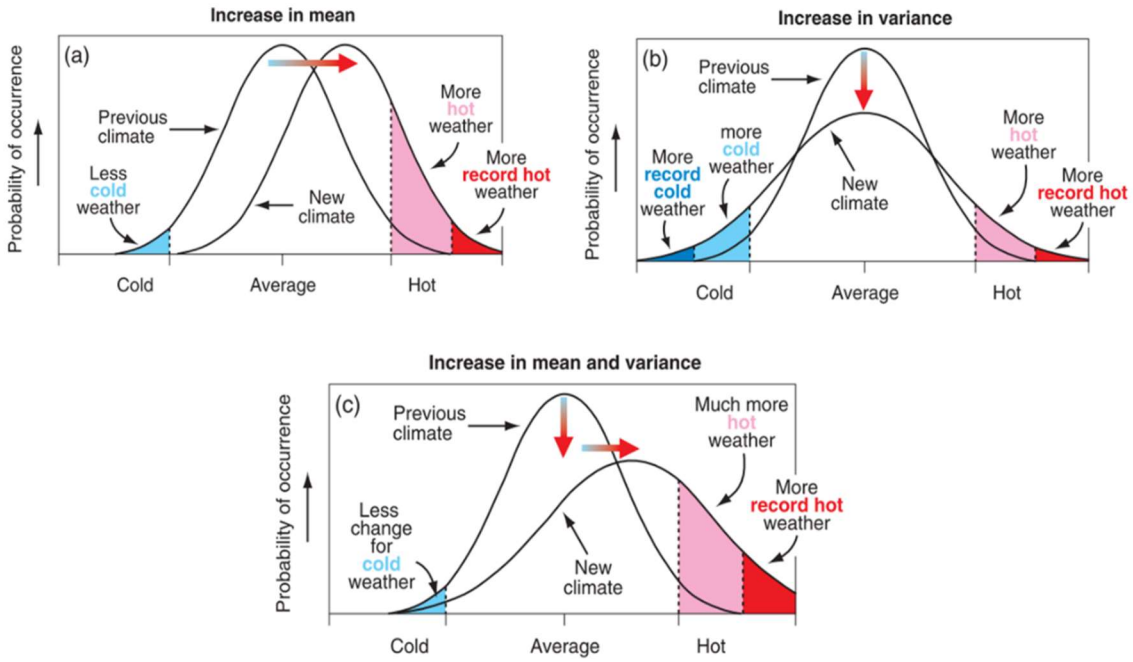


Figure 3 : Schéma illustratif du changement de la probabilité d'occurrence des évènements climatiques extrêmes pour une distribution normale de la température lorsque (a) la température moyenne augmente ; (b) la variabilité augmente ; et (c) la moyenne et la variabilité augmentent (Folland et al., 2001).

Des études régionales détaillées ont mis en évidence que les augmentations de température en termes de durée et fréquence seront les caractéristiques les plus importantes des vagues de chaleur, et non l'augmentation de l'intensité qui ne devrait pas être significative dans la plupart des régions du monde (Perkins-Kirkpatrick and Lewis, 2020). Une durée et une fréquence plus importantes peuvent être à l'origine des « **événements composés** » (« compound events ») en climatologie (Seneviratne et al., 2012), qui sont le résultat (i) de deux ou plusieurs événements extrêmes se produisant simultanément ou successivement ; (ii) des combinaisons d'événements extrêmes avec des conditions sous-jacentes qui amplifient l'impact des événements ; ou (iii) des combinaisons d'événements qui ne sont pas eux-mêmes extrêmes mais qui, une fois combinés, conduisent à un impact extrême.

La variabilité climatique significative autour de la moyenne, notamment liée à la fréquence accrue des évènements extrêmes, représente un vrai défi pour la production agricole et la sécurité alimentaire dans le monde (Bita and Gerats, 2013; Jagadish et al., 2020; Wheeler et al., 2000). Ainsi, le caractère composé des vagues de chaleur expose les espèces végétales à **plusieurs périodes susceptibles au stress thermique** au cours de leur cycle de culture et/ou au fil des générations. Le stress thermique chaud chez les végétaux est souvent défini comme l'augmentation de la température au-delà d'un niveau seuil pendant une période suffisante pour impacter la croissance et le développement des plantes (Shekhawat et al., 2022; Wahid et al., 2007). Pour des applications agronomiques, la définition purement climatique des vagues de chaleur n'est donc pas suffisante pour définir un stress thermique ressenti par les cultures, ses caractéristiques intrinsèques (i.e. durée, intensité, fréquence) devant d'abord être confrontées à des seuils propres à chaque espèce ou variété. En d'autres termes, il s'agira de définir par exemple le nombre de jours dépassant un seuil de température spécifique d'un processus métabolique ou d'un stade de croissance, spécifique pour une espèce ou un génotype. Cela implique que l'on étudie la réponse des végétaux à un stress thermique ponctuel, mais aussi la réponse résultante de la séquence des stress thermiques répétés qui peut conduire à des effets différés, amplifiés ou atténués.

1.1.3. Impacts du stress thermique sur les végétaux

Les vagues de chaleur peuvent entraîner un stress thermique chez les végétaux selon (i) **la localité géographique**, puisque les conditions pédoclimatiques et les seuils de température sont différents entre les tropiques et les latitudes moyennes ; (ii) **l'espèce/la variété**, puisque la température optimale pour les processus physiologiques et métaboliques peut être

spécifique de l'espèce voire de la variété ; et (iii) **le moment d'exposition**, puisque le cycle de développement de la plante inclut des périodes plus ou moins sensibles à l'exposition aux stress abiotiques (Hasanuzzaman et al., 2013).

Impacts sur la production agricole

Concernant la production agricole, le rendement est la première variable dont on cherche la stabilité voire la progression. À l'échelle mondiale (Figure 4), la variabilité climatique en termes de température et de pluviométrie est **responsable de plus de 30% de la variabilité observée des rendements** des grandes cultures (Lobell and Field, 2007; Ray et al., 2015). En effet, de nombreuses études soulignent les effets délétères des températures élevées sur le rendement des principales cultures d'intérêt économique. Zhao et al. (2017) ont montré qu'une augmentation de 1°C de la température moyenne mondiale réduirait, en moyenne, les rendements mondiaux de blé (-6,0 %), de riz (-3,2 %), de maïs (-7,4 %) et de soja (-3,1 %), même si des tendances contrastantes liées à la localisation géographique ont été également démontrées (pour le maïs, blé et soja, Deryng et al., 2014). Il a été estimé que la productivité mondiale du blé diminuera de 6 % pour chaque degré d'augmentation de la température moyenne annuelle et deviendra plus variable dans l'espace et dans le temps (Asseng et al., 2015a). Au cours des dernières décennies, des **tendances à la stagnation et/ou à l'augmentation de la variabilité** des rendements des céréales ont été observées dans plusieurs pays (Chandio et al., 2020; Olesen et al., 2011; Peltonen-Sainio et al., 2010), pour lesquelles le changement climatique semble largement contributeur.

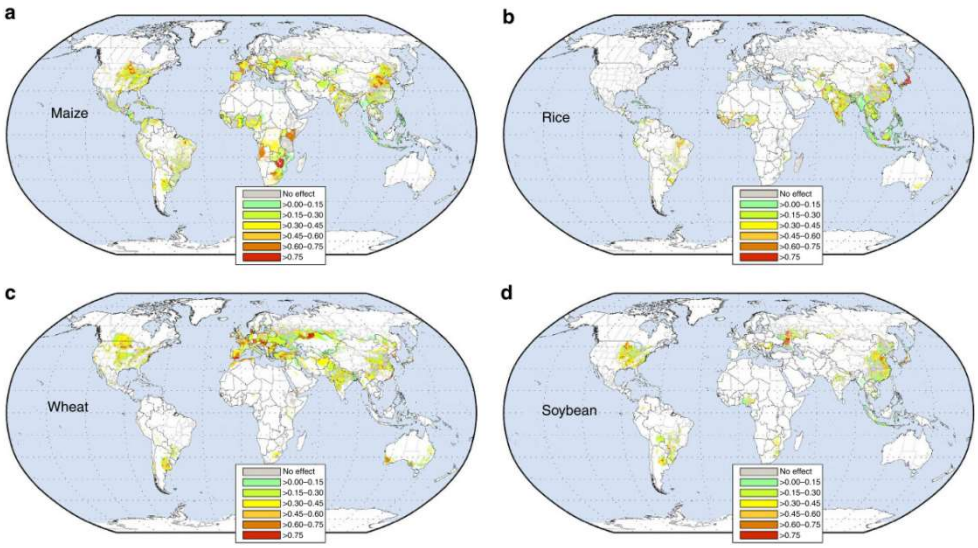


Figure 4 : Variabilité totale du rendement des cultures expliquée par la variabilité climatique au cours des trois dernières décennies (Ray et al., 2015). (a) Maïs, (b) Riz, (c) Blé, et (d) Soja.

Impacts aux échelles morphologique et anatomique

Le stress thermique peut être à l'origine de dégâts au cours de la croissance (Figure 5) tels que les « coups de soleil » sur les feuilles, branches et tiges, la sénescence et l'abscission des feuilles, l'inhibition de la croissance des pousses et du système racinaire (en impactant le support physique, l'absorption de l'eau et des nutriments), des perturbations d'équilibres hydriques et d'une baisse de la qualité des récoltes (Wahid et al., 2007). Lors de la **germination**, des températures élevées peuvent entraîner une réduction du taux de germination des graines et une perte de vigueur (i.e. homogénéité de germination, potentiel de levée en conditions défavorables, aptitude au stockage) par la mise en place de mécanismes de thermo-inhibition (Hills and Van Staden, 2003). Pendant la **croissance végétative**, une étude sur la féverole a montré une diminution progressive de la hauteur des plantes, des poids sec et frais des tiges, et de la surface foliaire dans les plantes exposées au stress thermique (Siddiqui et al., 2015), comme conséquence de la perte de turgescence des feuilles. Chez le blé, le stress thermique induit une réduction de la biomasse aérienne totale, avec des impacts sur le développement des feuilles et la formation des talles (Wang et al., 2011). A la **floraison**, les hautes températures peuvent induire l'infertilité du pollen, favoriser l'avortement des parties reproductives et/ou réduire le nombre des graines formés (Bita and Gerats, 2013; Kumar et al., 2019; Morrison and Stewart, 2002; Young et al., 2004), impactant ainsi le rendement et ses composantes (i.e. nombre et poids des graines). D'autres effets morphologiques ont été démontrés, tels que la stérilité des fleurons par le biais d'une réduction de la dispersion du pollen, de la germination du pollen sur le stigmate et de l'élongation des tubes polliniques chez le riz (Kumar et al., 2019).

Impacts à l'échelle physiologique

Pendant la **croissance végétative** (Figure 5), des températures trop élevées peuvent avoir principalement un effet négatif sur la photosynthèse, la respiration, et la stabilité des membranes (Wahid et al., 2007). La photosynthèse nette est généralement réduite lorsque les plantes sont exposées à des températures élevées, en raison d'une plus faible affinité de la Rubisco pour le CO_2, ce qui impacte directement la fixation du carbone (Salvucci and Crafts-Brandner, 2004). Par ailleurs, plusieurs études montrent que la tolérance des végétaux au stress thermique est étroitement liée à leur capacité à maintenir les échanges gazeux des feuilles sous condition de stress (Bita and Gerats, 2013; Sharma et al., 2015; Wahid et al., 2007). De plus, la chaleur induit une augmentation de la conductance stomatique par une augmentation du taux de transpiration, malgré la diminution du potentiel hydrique de la feuille à haute température (Verma et al., 2020). La réduction de la fixation du carbone et

l'augmentation du taux d'oxygène qui en résulte entraînent le stress oxydatif via la production des Reactive Oxygen Species (ROS). Plusieurs études ont mis en évidence l'impact négatif des vagues de chaleur pendant la **phase reproductrice**, identifiée comme une période critique pour l'élaboration du rendement et de la qualité des produits récoltés de plusieurs grandes cultures (Bita and Gerats, 2013; Deryng et al., 2014; Kourani et al., 2022; Kutcher et al., 2010; Wheeler et al., 2000; Young et al., 2004). Enfin, les températures élevées pendant le **développement des graines** peuvent causer des défauts de remplissage et maturation (Angadi et al., 2000; Habekotté, 1993), en impactant potentiellement le poids des graines et les critères de qualité associés aux produits récoltés (i.e. amidon, protéines, lipides).

Impacts à l'échelle moléculaire

Les changements de température de l'air sont détectés par les végétaux grâce à un ensemble complexe de capteurs positionnés dans divers organes et compartiments cellulaires (Hasanuzzaman et al., 2013; Wahid et al., 2007). L'augmentation de la fluidité de la membrane cellulaire conduit à l'activation de cascades de signalisation impliquant des acides gras (AG), à une affluence accrue de Ca^{2+} et à une réorganisation du cytosquelette. La signalisation entre les différentes voies conduit à la **production d'osmolytes et d'antioxydants en réponse au stress thermique** (Bita and Gerats, 2013). Tel que d'autres stress abiotiques, le stress thermique induit des mécanismes de réponse au stress qui incluent principalement la modulation des niveaux d'hormones (ABA, GA3, JA, SA) et d'autres métabolites tels que les Heat Shock Proteins (HSP), les ROS et les antioxydants (Wahid et al., 2007). Le stress thermique induit également des réponses « omiques » (transcriptome, protéome et métabolome), qui impliquent l'ADN, l'ARN, des enzymes, etc (Figure 5).

La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse des plantes au stress thermique s'avère essentielle pour **soutenir les approches conventionnelles de sélection végétale** reposant sur une variabilité génétique naturelle (Janni et al., 2020). Néanmoins, cette variabilité génétique naturelle s'est fortement réduite au fil des programmes de sélection ayant visé l'amélioration de caractères d'intérêt (Esquinas-Alcázar, 2005). Face à ce constat, la mise en évidence d'une variabilité induite de l'expression de gènes associés à des modifications transitoires de leur conformation laisse envisager de nouvelles voies d'améliorations possibles. Ces modifications peuvent être induites par l'environnement et contribuent potentiellement à un effet mémoire du stress parfois bénéfique, permettant aux plantes de résister au cours de leur cycle et/ou de transmettre cette capacité à leur descendance. Ce sujet sera abordé en détails dans le sous-chapitre sur la mémoire du stress.

Conséquences sur la conduite des cultures

En plus des impacts morphologiques, physiologiques et moléculaires qui peuvent conduire à des pertes de rendement et de qualité (Figure 5), la fréquence accrue des vagues de chaleur peut être un corolaire à **d'autres stress biotiques et abiotiques**, e.g. induire le stress hydrique, favoriser la prolifération de pathogènes et ravageurs par la hausse des températures, ou encore modifier les itinéraires techniques des cultures. Par ailleurs, les espèces qui ont une floraison précoce, sont d'autant plus sensibles aux températures élevées printanières (Wolkovich et al., 2012). Enfin, il est important de souligner que les **pratiques culturales** sont aussi un levier pour protéger les cultures du stress thermique ou de les rendre plus résistantes. Concernant les pratiques envisageables, les solutions les plus répandues sont : l'adaptation des itinéraires techniques (dates de semis et récolte), l'adoption de nouveaux itinéraires techniques (rotation, cultures associées), utilisation d'outils d'aide à la décision, le prétraitement des semences, la fertilisation raisonnée, l'application des promoteurs et/ou régulateurs de la croissance végétale, la gestion des apports d'eau et la conservation de l'humidité du sol (Ali et al., 2020; Bakhshi, 2021; Hassan et al., 2021; Yadav et al., 2022).

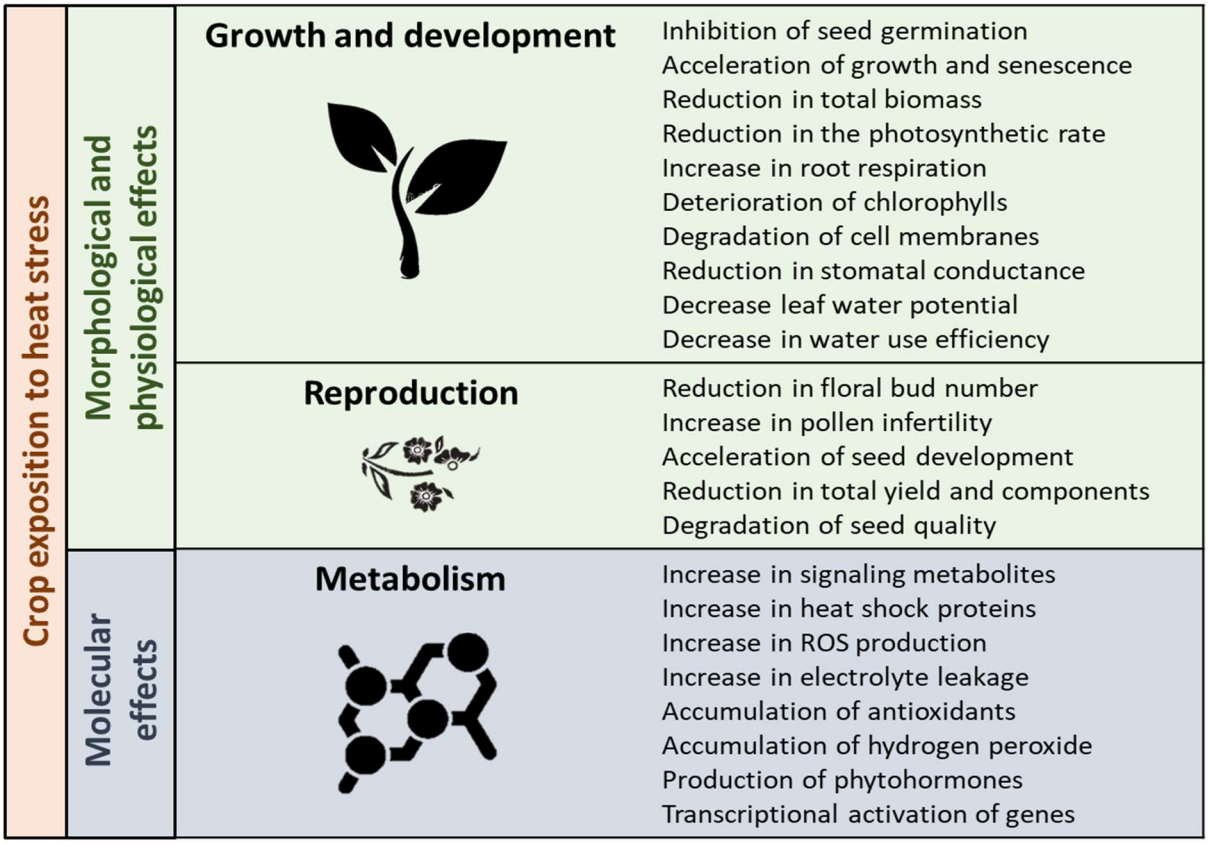


Figure 5 : Schéma simplifié des impacts du stress thermique sur les végétaux, en considérant les aspects morphologiques, physiologiques et moléculaires. Basé sur des synthèses de la littérature (Ali et al., 2020; Hassan et al., 2021; Verma et al., 2020; Wahid et al., 2007).

1.1.4. Les stratégies de réponse des végétaux au stress thermique

Tel que présenté, le stress arrivant en début du stade végétatif des cultures impacte principalement la croissance des organes, la biomasse totale et des feuilles, affecte les processus impliqués dans la photosynthèse et augmente la production des ROS. L'exposition au stress thermique lors de la phase reproductrice impacte principalement le rendement et la qualité grainière. La réponse des plantes au stress thermique varie en fonction de l'espèce/la variété et des stades de croissance qui subissent le stress (Aksouh et al., 2001; Bita and Gerats, 2013; Liu et al., 2021a), mais également en fonction des caractéristiques intrinsèques des évènements stressants (i.e. période, durée, fréquence et intensité). La survie des plantes exposées au stress thermique dépend de leur capacité à percevoir le stimulus chaud, à générer et à transmettre des signaux, et ainsi mettre en place des réponses morpho-anatomiques, physiologiques et moléculaires appropriées (Bita and Gerats, 2013; Verma et al., 2020).

Le concept de thermotolérance

Face à un stress, les plantes périssent ou résistent (Figure 6). Tel qu'illustré pour *Arabidopsis thaliana* sous stress hydrique (Verslues and Juenger, 2011), la résistance est mise en place par des mécanismes d'échappement (« escape »), d'évitement (« avoidance ») ou de tolérance du stress, avec des ajustements à plusieurs niveaux métaboliques. **L'échappement** fait référence aux plantes qui ajustent leur cycle de vie pour éviter le stress, en induisant par exemple une germination plus rapide et/ou une floraison précoce pour achever la maturation avant des pics thermiques de fin de saison ; tandis que **l'évitement** est une réaction intermédiaire qui consiste à la mobilisation des ressources pour résister au stress tout en maintenant l'activité métabolique (Verslues and Juenger, 2011). Enfin, on parlera de **thermotolérance** pour ce qui concerne la tolérance au stress thermique.

La thermotolérance désigne la capacité des plantes à résister à des températures élevées en mobilisant la plupart de ses ressources métaboliques (Vierling, 1991; Wahid et al., 2007). Cette stratégie semble être un résultat de la réparation des composants sensibles à la chaleur et de la prévention de nouvelles lésions, dans l'objectif de maintenir l'homéostasie métabolique même pendant l'exposition au stress (Bita and Gerats, 2013). La tolérance à la chaleur est un caractère multigénique chez les plantes et il existe une variabilité génotypique (i.e. certains génotypes étant plus tolérants au stress thermique que d'autres), ce qui implique donc de nombreux processus métaboliques. Ainsi, les plantes peuvent faire face au stress thermique en utilisant deux stratégies décrites par Bokszczanin et al. (2013), à savoir (i) **la thermotolérance basale**, qui est une capacité de tolérance inhérente à la plante ; et/ou (ii) la thermotolérance acquise, qui est induite par une sensibilisation préliminaire à des

températures élevées (mais non létales). Le concept de thermotolérance acquise repose sur la théorie que la réponse au stress thermique est un processus qui peut être stimulé par une exposition préalable à un traitement chaud pour déclencher la signalisation et, par conséquent, conditionner une réponse plus performante des plantes face à un stress thermique ultérieur plus intense (Bokszczanin et al., 2013). Cette tolérance peut également être induite par une augmentation progressive de la température jusqu'à des niveaux létaux, en reproduisant certaines tendances observées sous conditions naturelles, tel que démontré par Vierling (1991). Des résultats sur l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* ont mis en évidence que, en plus de la synthèse de HSP (e.g. HSP32 et HSP101), les voies hormonales (ABA, SA) et ROS semblent être également impliquées dans le développement et le maintien de la thermotolérance acquise (Charng et al., 2006; Larkindale and Huang, 2005; Vierling, 1991).

Acclimatation, acclimatisation et adaptation

Si les plantes sont capables de résister à la chaleur par la mise en place des mécanismes d'évitement, d'échappement et/ou de tolérance, on parlera donc d'« acclimatation », d'« acclimatisation » ou d'« adaptation » (Figure 6), qui sont des concepts basées sur plusieurs mécanismes de la réponse des plantes au stress thermique avec des effets plus ou moins durables (Smith and Dukes, 2013). Ces mécanismes de réponse au stress sont déjà bien documentés dans la littérature (Bita and Gerats, 2013; Chaudhary et al., 2020; Hassan et al., 2021; Jha et al., 2014; Peer et al., 2020; Sung et al., 2003; Verma et al., 2020; Wahid et al., 2007). Les voies métaboliques impliquées dans la réponse au stress incluent des processus à plusieurs échelles (morpho-anatomiques, physiologiques, moléculaires) tels que la modification de l'orientation des feuilles, la régulation thermique via la transpiration, le maintien de la stabilité des membranes, l'accélération de la transcription des gènes codant des HSP, la production de phytohormones tels que l'ABA et le SA, ainsi que la production d'antioxydants en réponse au stress oxydatif induit par la production accrue des ROS face au stress thermique (Wahid et al., 2007). En outre, ces mécanismes incluent des facteurs impliqués dans les cascades de signalisation tels que les transporteurs d'ions, les protéines (notamment les mitogen-activated protein kinases [MAPK] et les calcium-dependent protein kinases [CDPK], Wahid et al., 2007), les osmoprotecteurs et les antioxydants, ainsi que l'activation transcriptionnelle des gènes.

Ainsi, le terme « **acclimatation** » est utilisé pour les ajustements physiologiques, structurels ou biochimiques d'une plante individuelle en réponse à un stress environnemental induit expérimentalement, et ces mécanismes de réponse sont mis en place à court terme (Smith and Dukes, 2013). La définition de terme « **acclimatisation** » est similaire, à la différence

que le stress est le résultat de changements naturels dans les conditions environnementales. Ces deux réponses de court-terme ont l'objectif principal de compenser les altérations biochimiques et physiologiques induites par le stress pour rétablir la stabilité métabolique rapidement. Le terme « **adaptation** » concerne des modifications sur plusieurs générations en réponse à un stress environnemental qui agit sur le long terme, en étant le résultat de la sélection naturelle sur des traits variables et génétiquement héritables. Cette stratégie implique généralement des régulations transcriptomiques, métabolomiques, et/ou protéomiques associées au processus de détection, de signalisation et de régulation de la réponse au stress thermique pour assurer la survie (Bokszczanin et al., 2013; Sung et al., 2003). La capacité de synthétiser des métabolites et de moduler l'expression génique induits par la chaleur peuvent améliorer considérablement l'adaptation des plantes aux stress thermiques au long terme.

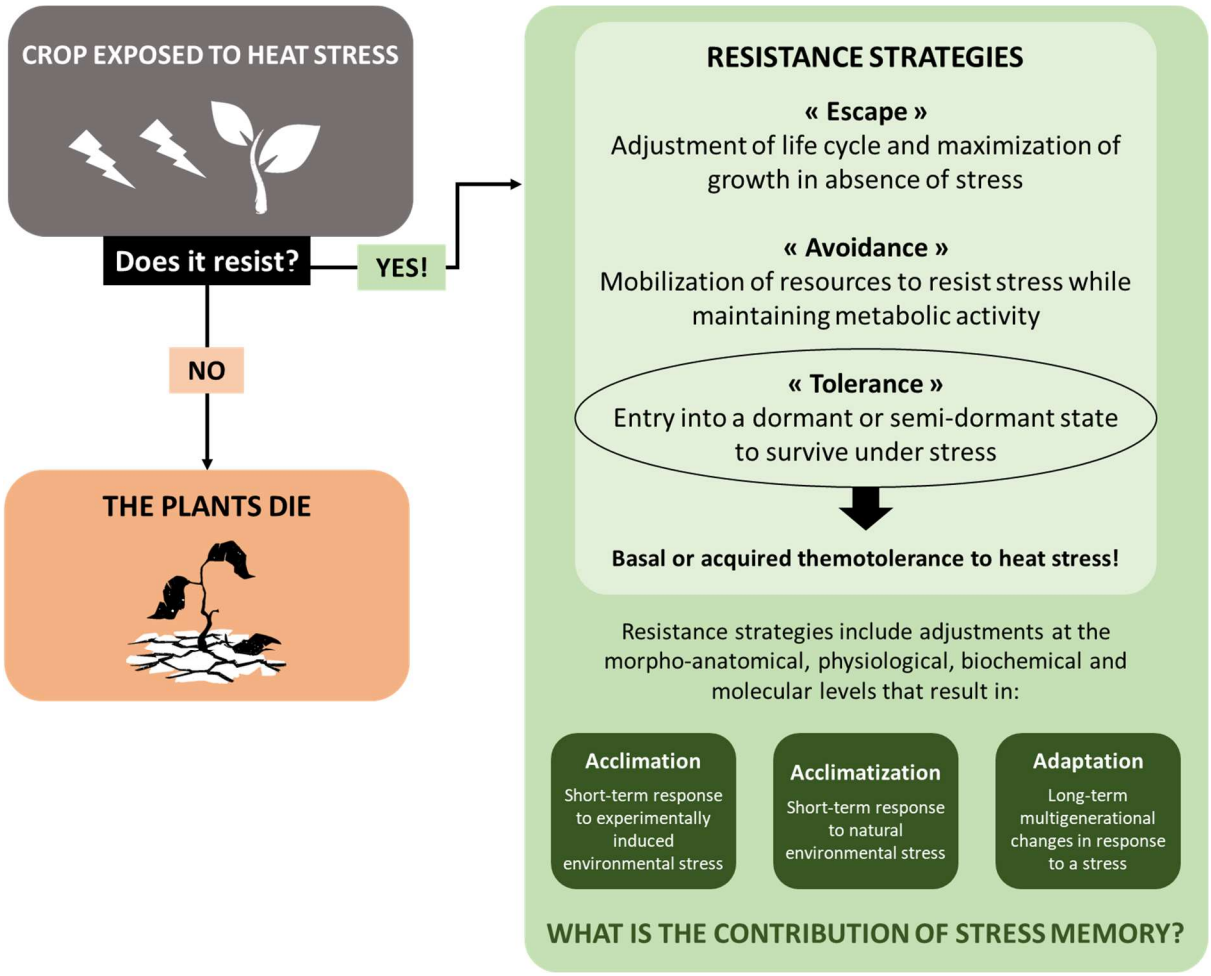


Figure 6 : Schéma simplifié des concepts liés à la résistance des plantes face au stress thermique. Basé sur des concepts de la littérature (Smith and Dukes, 2013; Verslues and Juenger, 2011; Vierling, 1991).

1.1.5. Réflexion : quels impacts des stress thermiques répétés ?

Plusieurs études en conditions contrôlées et/ou par la modélisation des cultures ont été menées dans l'objectif de mimer des conditions de stress thermique au champ, en considérant les projections climatiques des prochaines décennies. Cependant, il a été démontré que les effets de la chaleur sur les plantes sont potentiellement encore plus importants que les résultats observés sous serres ou par les prévisions réalisées par des modèles, car ces expériences en général **sous-estiment l'ampleur de la réponse des plantes** aux variations interannuelles de température, notamment en ce qui concerne les avancées dans le calendrier de la floraison (Wolkovich et al., 2012).

Le défi repose donc sur le fait que les dispositifs expérimentaux ne permettent pas de représenter exactement la complexité des conditions au champs, ni de mesurer la complexité des effets du stress thermique, et ce en raison des caractéristiques intrinsèques à ces événements de stress et les interactions entre plusieurs facteurs biotiques et abiotiques. Ce constat met en évidence les besoins de (i) **améliorer les protocoles de stress** afin d'appliquer des séquences de stress thermiques plus réalistes (e.g. événements de plus courtes durées) ; (ii) **comparer les résultats** expérimentaux sous conditions contrôlées avec les observations au champ, pour vérifier si les tendances observées sont cohérentes ; et (iii) comparer les **observations réelles avec les résultats des simulations des modèles**, pour évaluer leur capacité prédictive. Ainsi, les expérimentations *in planta* et *in silico* sont complémentaires pour bien comprendre les effets des stress répétés sur les végétaux.

Contexte agroclimatique : Points à retenir

- L'augmentation de la fréquence des vagues de chaleur expose les végétaux à des stress thermiques répétés au cours de leur cycle et/ou au fil des générations.

- Le stress thermique chaud chez les végétaux est souvent défini comme l'augmentation de la température au-delà d'un niveau seuil pendant une période suffisante pour impacter la croissance et le développement des plantes, les effets étant ainsi dépendants des conditions pédoclimatiques, de l'espèce/la variété et du stade physiologique lors de l'exposition au stress.

- La phase reproductrice a été identifiée comme une période critique pour l'élaboration du rendement et de la qualité des produits récoltés de plusieurs grandes cultures.

- Face à un stress, les plantes périssent ou résistent. Le fait de résister au stress indique que les végétaux ont mis en place des mécanismes morpho-anatomiques, physiologiques et/ou moléculaires pour répondre au stress. La durée de l'effet de ces mécanismes (court ou long terme) indique si la plante est capable de « s'acclimater », « s'acclimatiser » ou « s'adapter ».

1.2. La mémoire du stress

1.2.1. Définition du concept

Les végétaux sont exposés à de nombreux stress biotiques et abiotiques pendant leur cycle, et sont donc potentiellement soumis à des stress répétés plus ou moins intenses (i.e. des stress de même nature mais avec différentes intensités, qui surviennent successivement). La contribution de la mémoire du stress dans la capacité d'acclimatation, d'aclimatisation ou d'adaptation des cultures repose sur l'hypothèse **qu'une exposition préalable à un stress modéré peut induire une réponse différente des plantes face à un événement stressant postérieur**, celui-ci étant éventuellement plus intense. Cette réponse différente peut avoir un caractère bénéfique si l'exposition préalable à un stress modéré induit une sensibilisation qui favorise une réponse au stress postérieur plus performante, i.e. plus rapide, précoce, intense et/ou sensible (Lämke and Bäurle, 2017). Dans ce cas, le premier stress a eu un effet préparatoire (« priming ») qui peut être un levier à explorer pour le développement de la thermotolérance acquise chez les végétaux. A l'inverse, dans certains cas, l'effet d'un stress précoce peut amplifier les effets négatifs d'un stress postérieur, la mémoire du stress ayant ainsi un caractère pénalisant.

En biologie végétale, le concept de mémoire du stress bénéfique a été initialement développé pour décrire des stratégies de défense des plantes suite à des stress biotiques, tels que les attaques des pathogènes ou d'herbivores (Dowen et al., 2012; Frost et al., 2008; Pastor et al., 2013). Ensuite, le concept a été utilisé pour décrire les réponses des plantes aux stress abiotiques récurrents, notamment la réponse des plantes à des stress hydriques pendant leur cycle de culture (Crisp et al., 2016; Kinoshita and Seki, 2014; Lämke and Bäurle, 2017). De façon générale, **la mémoire du stress (« stress memory ») chez les végétaux est un phénomène complexe qui s'oppose à la réinitialisation** (« resetting » ou « reprogramming »), au cours de laquelle la plante efface les signaux métaboliques induits par la première exposition au stress, ce qui est normalement observé puisque la plante n'a pas d'intérêt à mémoriser des informations induites par un stress aléatoire (Figure 7). Le phénomène de mémoire est caractérisé par une période variable de récupération (de quelques heures à quelques jours) après la première exposition au stress, temps au cours duquel la plante maintient les mécanismes de réponse déclenchés suite au premier stress (memory) ou réinitialise son statut (reset), ceci en mettant en balance les investissements énergétiques et métaboliques respectifs de ces deux stratégies. Le concept de mémoire bénéfique repose sur

le fait que les plantes gardent une mémoire lors de la période de récupération, leur permettant de répondre plus efficacement à des évènements stressants postérieurs (Figure 7).

Cet effet mémoire met en jeu des **modifications métaboliques, transcriptionnelles et/ou épigénétiques**. On parlera de **mémoire intragénérationnelle** lorsque ces modifications perdurent au cours du cycle de culture. En considérant le contexte agro-environnemental où les variations de rendement interannuelles des principales grandes cultures résultent principalement de la variabilité climatique, l'acquisition d'une capacité à s'acclimater et/ou s'adapter à des conditions de stress abiotiques répétés est non seulement importante à l'échelle du cycle de culture, mais aussi sur plusieurs générations. Ainsi, on parlera de **mémoire intergénérationnelle ou transgénérationnelle** si les modifications sont observées sur une ou plusieurs générations consécutives. On distingue la mémoire intergénérationnelle et transgénérationnelle par la durée des effets de la mémoire du stress aux générations suivantes. En effet, la mémoire intergénérationnelle est observée lorsque seule la première génération sans stress a un effet de mémoire détectable. Au contraire, la mémoire transgénérationnelle est détectable après au moins deux générations sans stress, et implique probablement des processus épigénétiques (Lämke and Bäurle, 2017). La durée de la persistance de cet effet mémoire (au cours d'un cycle ou sur plusieurs générations) tend à employer les termes d'acclimatation si durée courte, ou d'adaptation si durée longue (Smith and Dukes, 2013).

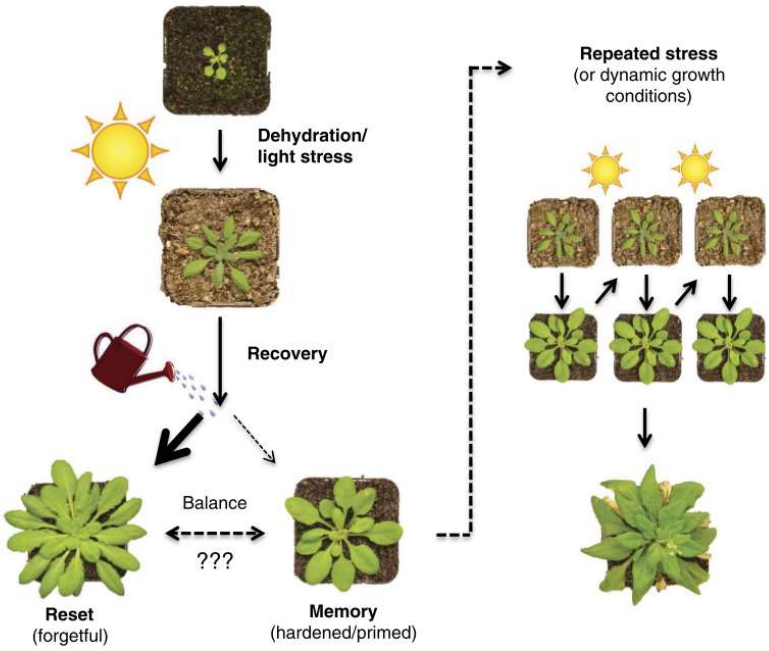


Figure 7 : Illustration de l'acquisition de la mémoire du stress bénéfique suite à une période de récupération après le premier événement stressant (stress hydrique, Crisp et al., 2016).

1.2.2. Effets de la mémoire pendant le cycle de culture

En ce qui concerne les réponses des plantes à des stress répétés au cours de leur cycle (i.e. **mémoire intragénérationnelle**), le concept de mémoire bénéfique a illustré principalement les réponses adaptatives à des stress abiotiques, notamment des stress thermiques, hydriques et lumineux (Liu et al., 2021a). Même si plusieurs travaux ont cherché à comprendre ces effets par des approches moléculaires, les travaux qui démontrent ces effets sur le rendement et la qualité des récoltes des espèces cultivées restent encore peu nombreux. Le Tableau 1 présente la liste des principales publications sur la mémoire intragénérationnelle des stress thermiques et hydriques, en mettant l'accent sur la découverte des traits moléculaires impliqués dans l'acquisition de la mémoire et les effets sur des variables d'intérêt agronomique (i.e. rendement, qualité) pour des grandes cultures et des espèces modèles.

Tel que présenté dans le Tableau 1, les effets de la mémoire intragénérationnelle sur les variables d'intérêt agronomique sont **principalement décrits chez le blé** (Fan et al., 2018; Wang et al., 2011, 2019, 2021b, 2021a). Ces travaux suggèrent qu'un prétraitement à des températures élevées lors des premiers stades de développement (i.e. élongation de la tige, enracinement et anthèse) peut améliorer la capacité des plantes à faire face à des stress plus sévères à des stades ultérieurs (i.e. remplissage du grain, qui conditionne davantage le rendement et la qualité). Cet effet bénéfique de la mémoire du stress a également conduit à des teneurs en saccharose plus élevées dans les feuilles et une matière sèche aérienne plus importante que les plantes non soumises au priming, et également une augmentation de la capacité photosynthétique, de la conductance stomatique et de la teneur en chlorophylle. En effet, une meilleure tolérance au stress thermique chez le blé semble être liée à l'augmentation des activités des enzymes antioxydantes et à la réduction des ROS (Fan et al., 2018). Une autre étude sur le blé a mis en évidence que les plantes soumise à une période chaude avant l'anthèse voient leurs activités photosynthétiques et enzymatiques antioxydantes augmenter, ce qui permet d'améliorer leur réponse à un stress postérieur (Wang et al., 2011).

Les travaux conduits sur l'espèce modèle des brassicacées *Arabidopsis thaliana* apportent des caractérisations moléculaires telles que l'étude des protéines BRU1, HSA32 et CSN5A (Brzezinka et al., 2019; Ding et al., 2012; Singh et al., 2021; Song et al., 2021). Chez le colza, de nombreux travaux sur les effets du stress thermique sur le rendement et qualité grainière ont été conduits (Aksouh-Harradj et al., 2006; Angadi et al., 2000; Baux et al., 2013; Brunel-Muguet et al., 2015b; Gauthier et al., 2017; Huang et al., 2019; Koscielny et al., 2018; Kutcher et al., 2010). Néanmoins, ils sont davantage centrés sur les effets d'un épisode de stress soutenu et aucun ne s'est encore intéressé à l'effet mémoire de stress thermiques répétés.

Tableau 1 : Principaux effets de la mémoire intragénérationnelle des stress thermique et hydrique. D'après Liu et al. (2021a).

Espèce	Résultats sur la mémoire intragénérationnelle du stress thermique	Références
Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* L.)	La protéine de chromatine BRU1 est requise pour la mémoire du stress thermique et pour maintenir l'induction transcriptionnelle de la protéine HSA32	Brzezinka et al., 2019
	La protéine Constitutive Photomorphogenesis 5A (CSN5A) participe de la régulation de la méthylation des histones et la mémoire transcriptionnelle du stress après un stress thermique récurrent	Singh et al., 2021
	Les histones H3K4 méthyltransférases SDG25 et ATX1 sont nécessaires au maintien de l'expression des gènes sensibles au stress pendant la récupération	Song et al., 2021
	Modification des voies énergétiques et augmentation de la production d'acides aminés à chaîne ramifiée, des RFO, de produits de la lipolyse et de tocophérols	Serrano et al., 2019
Bread wheat (*Triticum aestivum* L.)	Atténuation de la perte de rendement en grains, augmentation de la teneur en saccharose et de la capacité photosynthétique, réduction des ROS	Fan et al., 2018
	Le priming avant l'anthèse atténue les dommages photosynthétiques et oxydatifs du stress thermique post-anthèse dans la feuille étendard	Wang et al., 2011
Tall fescue (*Festuca arundinacea* L.)	Le gène *FaHSP17.8-CII* contribue à réduire l'accumulation de ROS et à prévenir la dégénérescence de la structure des chloroplastes	Bi et al., 2021
Tomato (*Solanum lycopersicum* L.)	Plus sensible au stress combiné qu'au stress individuel. Le priming augmente l'évaporation et réduit la température des feuilles	Zhou et al., 2020
White mustard (*Brassica alba* L.)	La thermoprotection induite par la pulvérisation de SA ou par la chaleur peut être obtenue par une voie de transduction du signal commune impliquant une augmentation précoce de H_2O_2	Dat et al., 1998
Autres exemples – Stress hydrique		
Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* L.)	Mémoire transcriptionnelle du stress qui se manifeste par des niveaux élevés de transcription d'un sous-ensemble de gènes de réponse au stress (gènes entraînables)	Ding et al., 2012
Bread wheat (*Triticum aestivum* L.)	Le priming favorise la croissance des racines et l'accumulation de la biomasse, et augmente les niveaux de proline et de glycine-bétaïne	Wang et al., 2021a
	L'ABA et le H_2O_2 sont nécessaires pour la tolérance au stress hydrique induite par le priming au moment du remplissage des grains	Wang et al., 2021b
	Réduction des pertes de rendement en grains, longueur maximale des racines plus élevée, et potentiel osmotique plus faible lié à des teneurs plus élevées en proline et en saccharose dans les feuilles	Wang et al., 2019
Cowpea (*Vigna unguiculata* L.)	Le priming augmente le rendement en grains et l'efficacité d'utilisation de l'eau. Niveaux d'ABA plus faibles et d'IAA plus élevés dans les feuilles	Tankari et al., 2021
Maize (*Zea mays* L.)	La réponse transcriptionnelle des gènes répondant aux stress répétés est plus complexe qui celle suite à un stress unique, ce qui suggère que la mémoire est un résultat de réponses coordonnées de multiples voies de signalisation	Ding et al., 2014
Soybean (*Glycine max* L.)	Plus de 1000 gènes présentent une expression significativement modifiée dans les plantes soumises au priming par rapport à un stress individuel	Kim et al., 2020

1.2.3. Effets de la mémoire au cours des générations

Le concept de mémoire du stress transmise à la descendance (i.e. **mémoire intergénérationnelle ou transgénérationnelle**) a été également développé principalement pour décrire des réponses adaptatives des cultures à des stress abiotiques (Liu et al., 2021a). Le Tableau 2 présente la liste des principales observations moléculaires et agronomiques sur la mémoire inter/transgénérationnelle des stress thermiques et hydriques.

Comme présenté ultérieurement pour les effets de la mémoire intragénérationnelle, parmi les espèces cultivées, **le blé est également l'espèce la plus étudiée** concernant les effets des stress répétés au cours de plusieurs générations. En effet, il a été démontré que l'exposition des plantes mères au stress thermique a une influence bénéfique sur la descendance en termes de teneur en chlorophylle, poids des grains, nombre de grains et leur teneur totale en amidon (Liu et al., 2021b). En comparaison avec les réponses au stress thermique de la descendance des plantes mères qui n'ont pas été exposées à un stress, la descendance des plantes mères stressées présentait un rendement en grains, une photosynthèse foliaire et les activités d'enzymes antioxydantes plus élevés, ainsi que des dommages à la membrane cellulaire plus faibles (Wang et al., 2016). De plus, leurs gènes cibles ont montré une expression différentielle en fonction du traitement parental et de la descendance (Liu et al., 2021b), ce qui laisse envisager des applications de protocoles thermo-sensibilisants reposant sur la mémoire inter- ou transgénérationnelle pour améliorer les performances du blé.

Quelques exemples de la mémoire inter- ou transgénérationnelle peuvent également être cités pour les **brassicacées**, notamment pour l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* (Groot et al., 2017; Liu et al., 2019a; Migicovsky et al., 2014; Suter and Widmer, 2013; Whittle et al., 2009; Yadav et al., 2020). Au-delà des traits moléculaires, plusieurs travaux ont mis en évidence une accélération de la floraison de la descendance des plantes soumises au stress thermique (Groot et al., 2017; Migicovsky et al., 2014), même si cet effet semble être transitoire et réversible puisqu'il se perd au cours des générations (Suter and Widmer, 2013). Chez le colza, une étude sur les effets du stress hydrique a démontré que, si la sécheresse impacte négativement le rendement et la qualité des graines des plantes mères stressées, leur vigueur germinative est meilleure que celle des graines issues de plantes mères non stressées (Hatzig et al., 2018). Les teneurs en protéines et en huile des graines, ainsi que la composition en acides gras, ont été fortement impactées par les traitements de stress hydrique (Hatzig et al., 2018), avec une diminution significative de la teneur en huile des graines impliquant une augmentation significative de la teneur en protéines, ainsi qu'une une modification du profil d'acides gras en défaveur des AG polyinsaturés.

Tableau 2 : Principaux effets de la mémoire inter- ou transgénérationnelle des stress thermique et hydrique. D'après Liu et al. (2021a).

Espèce	Résultats sur la mémoire inter- ou transgénérationnelle du stress thermique	Références
Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* L.)	Les plantes issues des parents stressés présentent des feuilles plus grandes et leur montaison a été accélérée	Migicovsky et al., 2014
	Le priming induit un post-transcriptional gene silencing (PTGS) qui s'est maintenu sur trois générations	Liu et al., 2019a
	Les plantes issues de plusieurs générations de plantes stressées thermiquement présentent des signes d'une mémoire du stress en termes de résilience aux échelles phénologique, génétique et épigénétique	Yadav et al., 2020
	Le priming conduit à une augmentation significative de la production de graines des générations ultérieures exposées au stress	Whittle et al., 2009
	Les effets parentaux (n-1) sont prépondérants sur les effets « grand-parentaux » (n-2) pour tous les caractères, sauf la biomasse des parties reproductives. La floraison a été accélérée	Groot et al., 2017
	L'accélération de la floraison observée était transitoire et réversible, car elle n'était pas exprimée dans la deuxième génération sans stress thermique	Suter and Widmer, 2013
Bread wheat (*Triticum aestivum* L.)	Les plantes issues des parents stressés ont un meilleur rendement en grains, une photosynthèse et des activités enzymatiques antioxydantes plus élevées, ainsi que des dommages sur les membranes cellulaires plus faibles	Wang et al., 2016
Durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.)	Les plantes issues des parents stressés ont des meilleurs traits physiologiques foliaires, ainsi qu'un meilleur rendement et qualité grainière, même pour un génotype initialement peu thermotolérant	Liu et al., 2021b
Field mustard (*Brassica rapa* L.)	Les plantes issues des parents stressés présentent des changements dans l'expression de fragments d'ARN non codants	Byeon et al., 2019
	Les plantes issues des parents stressés présentent les plus fortes fluctuations des niveaux de smRNA, mais peu de fluctuations du transcriptome	Bilichak et al., 2015
Soybean (*Glycine max* L.)	L'exposition parentale au stress thermique pendant le remplissage des gousses a diminué la capacité germinative des graines de la descendance	Alsajri et al., 2022
Autres exemples – Stress hydrique		
Bread wheat (*Triticum aestivum* L.)	Le stress appliqué sur les plantes mères améliore le taux de photosynthèse, le statut hydrique des feuilles, les niveaux d'enzymes antioxydants et le rendement en grains	Wang et al., 2018
Durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.)	Les plantes issues des parents stressés ont des meilleurs traits physiologiques foliaires, ainsi qu'un meilleur rendement et qualité grainière, même pour un génotype initialement peu thermotolérant	Liu et al., 2021c
Oilseed rape (*Brassica napus* L.)	Le priming parental entraîne une diminution de la qualité nutritionnelle des graines, mais augment leur vigueur au semis	Hatzig et al., 2018
Peanut (*Arachis hypogaea* L.)	Les effets intergénérationnels du stress sont dépendants des génotypes	Racette et al., 2019
Sunflower (*Helianthus annuus* L.)	Les cinétiques de germination sont plus rapides en conditions de stress hydrique pour les graines issues de plantes mères stressées	Vancostenoble et al., 2022
Rice (*Oryza sativa* L.)	Les plantes issues des parents stressés présentent une meilleure tolérance au stress, i.e. moins de dommages cellulaires et augmentation des enzymes antioxydantes	Zheng et al., 2017
	Les effets mémoire transgénérationnelle n'ont pas permis d'atténuer les défaut de stérilité des épillets chez les espèces tolérantes et sensibles	Shi et al., 2016

1.2.4. Les mécanismes d'acquisition de la mémoire du stress

La diversité et la complexité des travaux sur la mémoire du stress listés ultérieurement mettent en évidence la multitude des mécanismes sous-jacents à l'acquisition de la mémoire du stress chez les végétaux (Figure 8). Les principaux mécanismes de la mémoire sont les suivants :

(i) **Le stockage de signaux métaboliques** non dégradés après la première exposition au stress. Cela comprend le piégeage des ROS, la stabilisation des membranes, la production de métabolites et la coordination des cascades de signalisation. Plusieurs études suggèrent que la mémoire du stress est étroitement liée à des changements dans la capacité antioxydante, les modifications biochimiques et les voies hormonales (Dat et al., 1998; Fan et al., 2018; Sun et al., 2019; Wang et al., 2011, 2021b).

(ii) **La stabilité de protéines « signal ».** Par exemple, la protéine régulatrice de la chromatine BRUSHY1 (BRU1) assure la transmission de la structure de la chromatine après l'exposition au stress et soutient l'induction transcriptionnelle des gènes sensibles au stress thermique (Brzezinka et al., 2019). De plus, Liu et al. (2019) ont démontré que le Heat Shock Transcription Factor A2 (HSFA2), induit par la chaleur, active directement la H3K27me3 Demethylase Relative of Early Flowering 6 (REF6), qui à son tour favorise l'expression de HSFA2. REF6 and HSFA2 établissent ainsi une boucle de rétroaction héréditaire, et activent une ubiquitine ligase impliquée dans les marques épigénétiques.

(iii) **Des pauses transcriptionnelles par la ARN Polymérase II**. Ding et al. (2012) ont démontré que la ARN Polymérase II reste bloquée au niveau des gènes de mémoire du stress hydrique pendant la période de récupération du stress. Cette mémoire du stress a conduit à des niveaux supérieurs de la teneur en eau relative des feuilles lors des stress subséquents.

(iv) **Des régulations épigénétiques**. Ces régulations épigénétiques décrivent des modifications héritables (par mitose ou par méiose) de l'expression des gènes, sans modifications de leur séquence nucléotidique (Baulcombe and Dean, 2014; Bokszczanin et al., 2013; Conrath et al., 2015; Crisp et al., 2016). Selon la nature de ces marques épigénétiques, la transmission de la mémoire est possible à l'échelle d'un cycle de culture (mémoire intragénérationelle, par mitoses ; appelée aussi mémoire somatique) ou aux générations suivantes (mémoire inter- ou transgénérationelle, par méioses) (Crisp et al., 2016; Iwasaki and Paszkowski, 2014).

Les principales marques épigénétiques sont les suivantes :

- **La méthylation de l'ADN** : la méthylation des cytosines présentes dans les séquences d'ADN modifie l'accessibilité aux gènes et par conséquent module leur transcription. Des

études sur *Arabidopsis thaliana* ont montré qu'une augmentation de la méthylation d'ADN était corrélée à une répression de l'expression des gènes sensibles au stress thermique pendant la période de récupération (Migicovsky et al., 2014; Song et al., 2021).

- **Les modifications post transcriptionnelles (PTMs) des histones** : ces modifications consistent en des méthylations, phosphorylations, acétylations, ubiquitylations, (…) de la chromatine qui vont modifier l'accessibilité aux gènes et également leur expression. Il a été démontré que la mémoire du stress thermique est associée à l'accumulation de la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4) au niveau des loci liés à la mémoire du stress, en résultat d'une hyper-induction de l'expression génétique lors des stress thermiques récurrents (Lämke et al., 2016).
- **Les « small RNA »** : les smRNA sont de petits ARN non codants qui modulent l'expression des gènes par un phénomène de gene silencing (Duempelmann et al., 2020). Chez *Brassica rapa*, la contribution des smRNA à la mémoire intergénérationnelle du stress thermique a été mise en évidence en séquençant le transcriptome dans les tissus somatiques et reproducteurs des plantes parentales stressées et de leur descendance (Bilichak et al., 2015; Byeon et al., 2019).

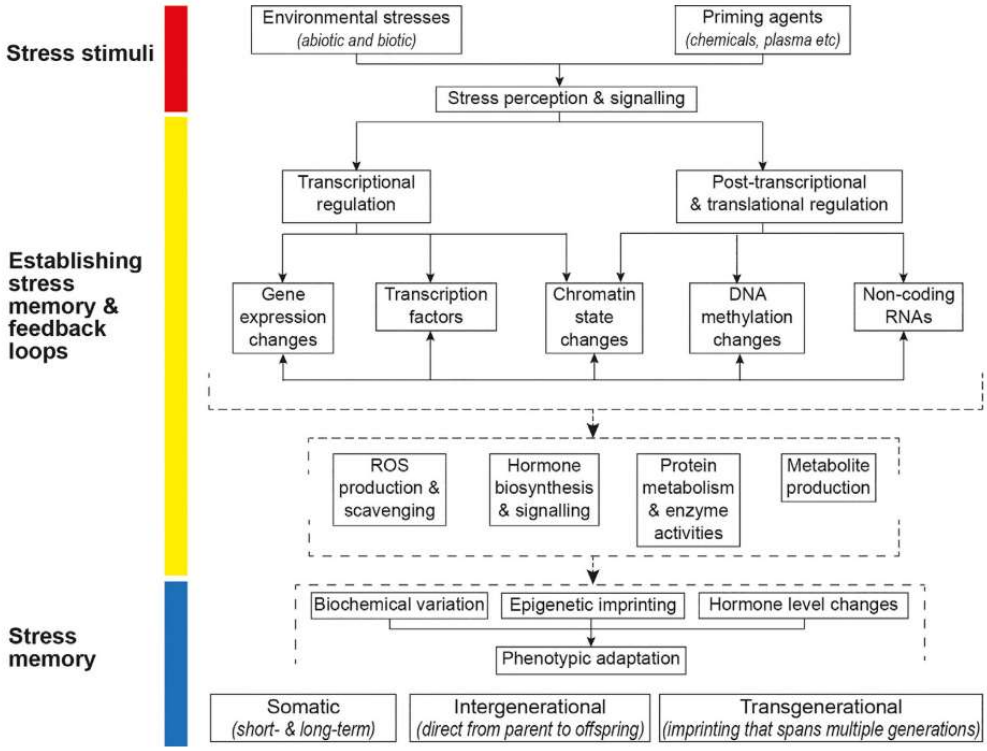


Figure 8 : Schéma synthétisant les processus impliqués dans l'acquisition de la mémoire du stress pendant le cycle de la culture et au cours des générations (Liu et al., 2021a).

1.2.5. Réflexion : la mémoire peut-elle être un levier face aux stress répétés ?

Une caractéristique inhérente à la mémoire du stress est que **la réponse de la plante à une succession d'événements stressants ne résulte pas simplement d'une activation répétée des mêmes voies activées lors de chaque événement stressant.** Les exemples donnés précédemment montrent que cette mémoire peut s'avérer bénéfique, ce qui laisse envisager des perspectives d'application. Néanmoins, une meilleure connaissance de la mise en place de ces effets bénéfiques est nécessaire pour utiliser la mémoire de stress comme levier d'acclimatisation pour maintenir voire améliorer les performances des cultures dans un contexte d'augmentation de la fréquence des vagues de chaleur.

Une des pistes en plein essor concerne la compréhension des régulations épigénétiques qui contribuent à cet effet mémoire. Dans la perspective d'exploiter ces **régulations épigénétiques comme marqueurs de sélection**, la compréhension de ces mécanismes et la caractérisation de leur transmissibilité est un nouvel enjeu des programmes de sélection. Ces analyses sont complétées par des approches « omiques », qui permettent d'identifier les gènes, les protéines et les voies métaboliques impliquées dans la mémoire du stress. Cependant, si ces analyses couplées font l'objet de nombreux travaux, le lien avec les effets à l'échelle de la plante et sur des variables d'intérêt agronomique est encore peu étudié. Néanmoins, les travaux sur la mémoire du stress montrent que les effets mémoire dépendent étroitement de la nature, de l'intensité, de la durée du stress, ainsi que du stade de développement de la plante au moment de l'apparition de l'événement stressant, et de l'espèce voire de la variété. Les caractérisations à ces différentes échelles d'analyses peuvent fournir des pistes d'applications reposant sur le priming pour améliorer la réponse des cultures face à des stress thermiques répétés.

La mémoire du stress : Points à retenir

- La mémoire du stress décrit le phénomène par lequel une exposition préalable à un stress modéré peut induire une réponse différente face à un événement stressant postérieur (Lämke and Bäurle, 2017). L'effet mémoire est bénéfique si les plantes sont capables de répondre de façon plus performante, ou au contraire cet effet est pénalisant si les effets cumulés conduisent à une amplification des effets négatifs.

- La mémoire intragénérationnelle s'observe à l'échelle du cycle de culture i.e. les informations générées par le premier stress sont stockées et réutilisées lors d'exposition ultérieure pendant le cycle de culture, tandis que la mémoire inter- ou transgénérationnelle s'observe sur une ou plusieurs générations de plantes stressées, et repose principalement sur la transmission de marques épigénétiques.

1.3. La qualité grainière du colza d'hiver

1.3.1. Le colza : origine et aspects agronomiques

Brassica napus L. résulte du croisement interspécifique entre la navette (*Brassica rapa* L.) et le chou (*Brassica oleracea* L.), et présente une diversité génétique qui inclut principalement des colzas de type oléagineux (hiver ou printemps), des colzas fourragers (hiver ou printemps) et des légumes (le rutabaga, le chou kale). Les colzas fourragers sont génétiquement distants des colzas oléagineux. **Les cultivars de colza oléagineux sont classés en types hiver ou printemps selon leur besoin de vernalisation pour induire la floraison** (Hasan et al., 2006) et, par conséquent, leur aire de répartition géographique (majoritairement Europe de l'Ouest pour le type hiver, et Europe de l'Est, Asie, Canada et Australie pour le type printemps).

Dans cette thèse, nous avons conduit les expérimentations sur le colza oléagineux d'hiver, qui est le plus répandu en Europe et en France. Dans les années 1970, les travaux de sélection conduits ont abouti à la production de **variétés « double zéro (00) »** ayant moins d'acide érucique et de glucosinolates, deux composés nocifs pour la santé humaine et antinutritionnels pour l'alimentation animale respectivement. Ces améliorations ont largement contribué à promouvoir cette culture en Europe et à diversifier les débouchés industriels. Les aspects économiques de la production du colza sont présentés sous forme d'une fiche (Annexe 1).

Cycle de culture

La culture du colza d'hiver débute par un semis en septembre/octobre et s'achève à maturité physiologique des graines en juin/juillet. Ce cycle long de plusieurs mois se répartit en une phase végétative et une phase reproductrice (Figure 9). La **phase végétative** commence par la germination-levée, et est suivie d'une phase de croissance lente (i.e. production de biomasse aérienne faible) jusqu'au stade de 4-5 feuilles. La phase de croissance automnale correspond au développement de la rosette, pendant laquelle la plante a une forte dynamique d'expansion de la biomasse aérienne. Ensuite, le colza d'hiver a besoin d'une période de vernalisation et de journées courtes (typiquement en hiver) pour permettre l'induction de la phase reproductrice. La reprise de la croissance végétative a lieu à la sortie de l'hiver par la formation rapide de nouvelles feuilles et est suivie par l'élongation de la tige. Pendant la phase de montaison, les feuilles commencent à chuter (sénescence séquentielle), ce qui permet d'assurer la remobilisation de l'azote vers les jeunes organes. Les itinéraires techniques conventionnels préconisent des apports minéraux (essentiellement d'azote et de soufre) à la

sortie d'hiver pour soutenir la production de biomasse. La **floraison** qui suit marque l'arrêt de la production de feuilles et le début de la phase reproductrice, pendant laquelle on observe un phénomène de sénescence monocarpique qui favorise également la remobilisation de l'azote vers les organes reproducteurs. A ce stade, l'activité photosynthétique est assurée par l'enveloppe des siliques (péricarpes) afin de couvrir les besoins en carbone de la plante (Jullien et al., 2011). La floraison se prolonge sur plusieurs mois, avec l'apparition quasi continue de siliques dès le début de la pollinisation (essentiellement autogame). Enfin, il est important de souligner que le colza possède une **croissance indéterminée**, ce qui implique la mise en place séquentielle des ramifications, puis des siliques et des graines qui ont des âges différents selon leur position dans la plante. Cette spécificité explique la forte capacité de compensation observée chez cette culture (Diepenbrock, 2000).

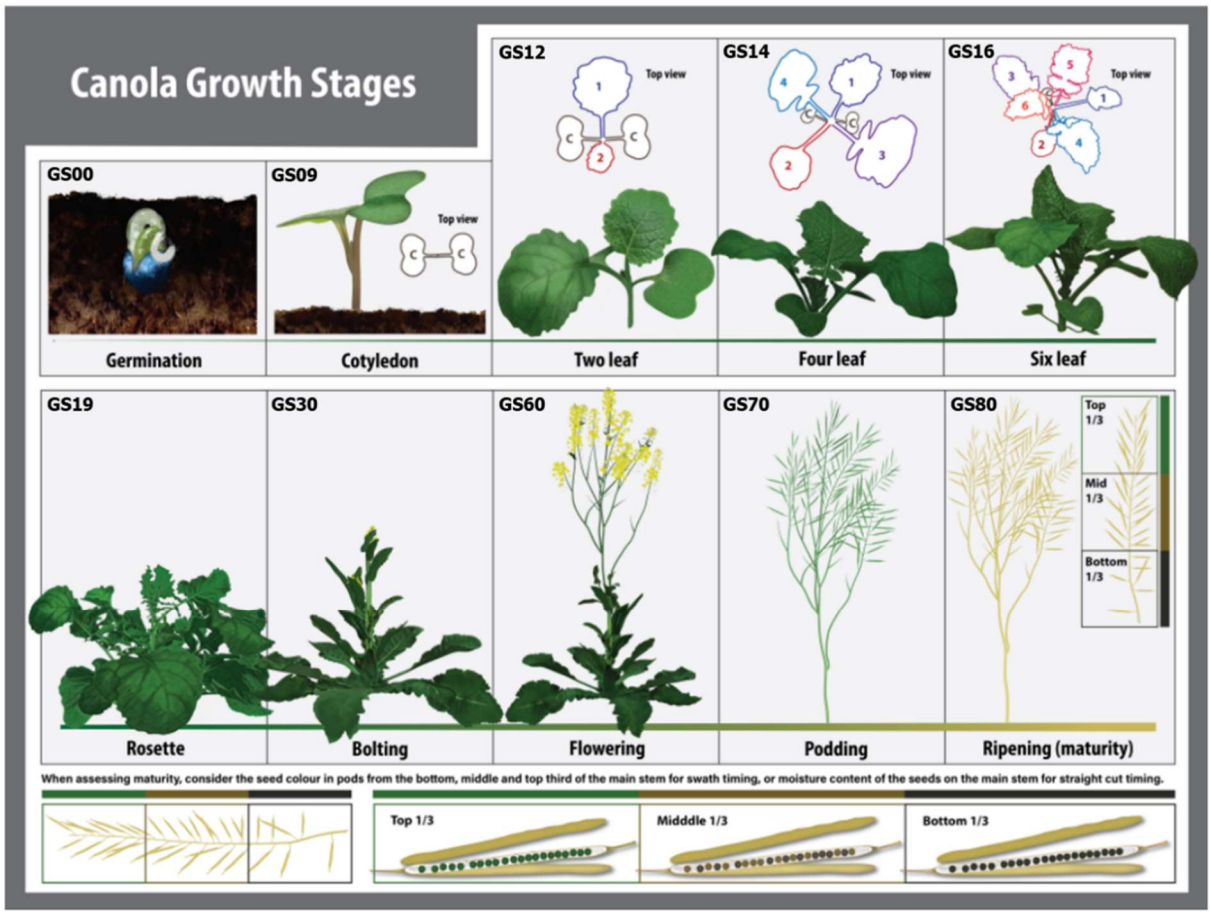


Figure 9 : Illustration des stades de croissance du colza (i.e. growth stages, GS, échelle BBHC). GS00-GS09 : germination et émergence ; GS10-GS19 : croissance foliaire ; GS30-GS39 : élongation de la tige ; GS50-GS59 : apparition des inflorescences ; GS60-GS69 : floraison ; GS70-GS79 : développement de la graine ; GS80-GS89 : maturation ; GS90-GS99 : senescence (Canola Council of Canada, 2022).

1.3.2. Importance de la fertilisation soufrée

Comme pour la plupart des cultures, le colza est une culture exigeante en macroéléments tels que l'azote (N), le potassium (K) et le phosphore (P). De plus, le soufre (S) est essentiel chez les Brassicacées, puisqu'il est impliqué dans des nombreuses fonctions métaboliques et réponses aux stress biotiques et abiotiques. Plusieurs travaux démontrent que des limitations d'apports en soufre ont un impact négatif sur les composantes du rendement et la qualité des graines (Brunel-Muguet et al., 2015b; D'Hooghe et al., 2013). Parmi les principales grandes cultures, **le colza présente des besoins en S importants** (40 kg de S/ha) par rapport à d'autres espèces cultivées comme le blé (15-25 kg de S/ha) (Oenema and Postma, 2003). Les préconisations de Terres Inovia sont de 75 kg/ha de SO_3 au début de la montaison, afin de satisfaire les exigences de croissance et production de la culture. Néanmoins des travaux de modélisation ont montré que des apports fractionnés permettaient d'ajuster les besoins car les apports conventionnels peuvent être pléthoriques selon la disponibilité de sulfate (SO_4^{2-}) dans les sols (Poisson et al., 2018).

Les plantes peuvent prélever le S présent dans les sols et plus marginalement dans l'air par absorption foliaire. **Les quantités de S atmosphériques ont considérablement diminué** au cours des 40 dernières années suite aux mesures environnementales réglementant les émissions industrielles (protocoles d'Helsinki, 1985 ; Oslo, 1994 ; Kyoto, 1997), qui ont ainsi entraîné une réduction des dépôts de S atmosphérique et, par conséquent une oligotrophie des sols en S. La gestion de la fertilisation soufrée est donc devenue plus importante, en particulier pour les cultures exigeantes en S comme le colza. Au niveau du sol, le S est principalement absorbé sous forme minérale (sulfate). Par ailleurs, le remplacement de certains fertilisants phosphatés et azotés (de type ammonitrate ou superphosphate concentré), à l'origine riches en S, a aussi conduit à limiter les apports passifs de S. En plus de la réduction de ces « apports gratuits », le colza est **sujet à des pertes en S stockés sous formes de sulfates dans les feuilles**, dues à la sénescence séquentielle ou monocarpique au cours de son cycle de croissance (Dubousset et al., 2010). Ainsi, malgré ses fortes capacités d'absorption du sulfate, le colza présente une faible efficience agronomique d'utilisation du S (i.e. rapport entre la production de graines par quantité d'engrais soufrée apportée) en condition non limitante (Dubousset et al., 2010).

En raison des facteurs environnementaux ou à des caractéristiques intrinsèques de la culture, la limitation en S peut arriver tout au long du cycle du colza et causer des effets divers (Figure 10). D'abord, une faible disponibilité en S affecte négativement la vigueur et la capacité germinative des graines produites, via notamment une chute de la vitesse et du taux de

germination (D'Hooghe et al., 2013). Les plantes soumises à des stress nutritionnels sévères en S dès la phase végétative peuvent développer plusieurs symptômes visibles tout au long du cycle de culture, tels que le jaunissement du limbe des feuilles les plus jeunes, le ralentissement de la croissance lors de la montaison, le blanchissement des fleurs lors de la floraison, et l'avortement de siliques, avec notamment des pertes de rendement.

Au niveau métabolique, le soufre chez le colza intervient dans la **synthèse des acides aminés** essentiels (notamment la cystéine et la méthionine), des composés soufrés impliqués dans les mécanismes de réponse au stress, ainsi que dans la synthèse des vitamines, d'enzymes et de précurseurs de la synthèse d'hormones (Kopriva et al., 2016). De plus, une partie importante des protéines des graines sont des protéines de réserves (Seed Storage Protein, SSP), principalement les crucifèrines (type globuline 12S) qui contiennent peu d'acides aminés soufrés et les napines (type albumine 2S) riches en cystéine. Par ailleurs, il a été montré des impacts négatifs de la limitation en soufre au stade reproducteur avec notamment un changement des profils d'acides gras, résultant à un ratio ω6 :ω3 plus élevé, mais aussi à des impacts sur la qualité protéique des graines en réduisant l'abondances des SSP riches en S (les napines) (Brunel-Muguet et al., 2015b).

La **combinaison d'une limitation en S et de températures élevées** peut ainsi correspondre à des situations réalistes et pénalisantes sur le rendement et la qualité grainière chez le colza d'hiver. L'intérêt d'étudier cette combinaison repose non seulement sur l'implication du S dans la synthèse et la signalisation de phytohormones qui contrôlent la tolérance au stress (Hasanuzzaman et al., 2018), mais également sur son implication dans l'acquisition de la mémoire du stress médiée par des régulations épigénétiques (Bokszczanin et al., 2013). En effet, cette implication probablement repose sur la contribution du soufre dans la méthylation de l'ADN, par le rôle de la S-adénosylméthionine (SAM) comme donneur de groupes méthyles -CH3 (Meng et al., 2018), l'un des principaux marqueurs épigénétiques impliqués dans la mémoire du stress. Par conséquent, l'analyse de la disponibilité en S se justifie dans le cadre de protocoles visant à mieux comprendre les mécanismes de mémoire du stress thermique chez le colza.

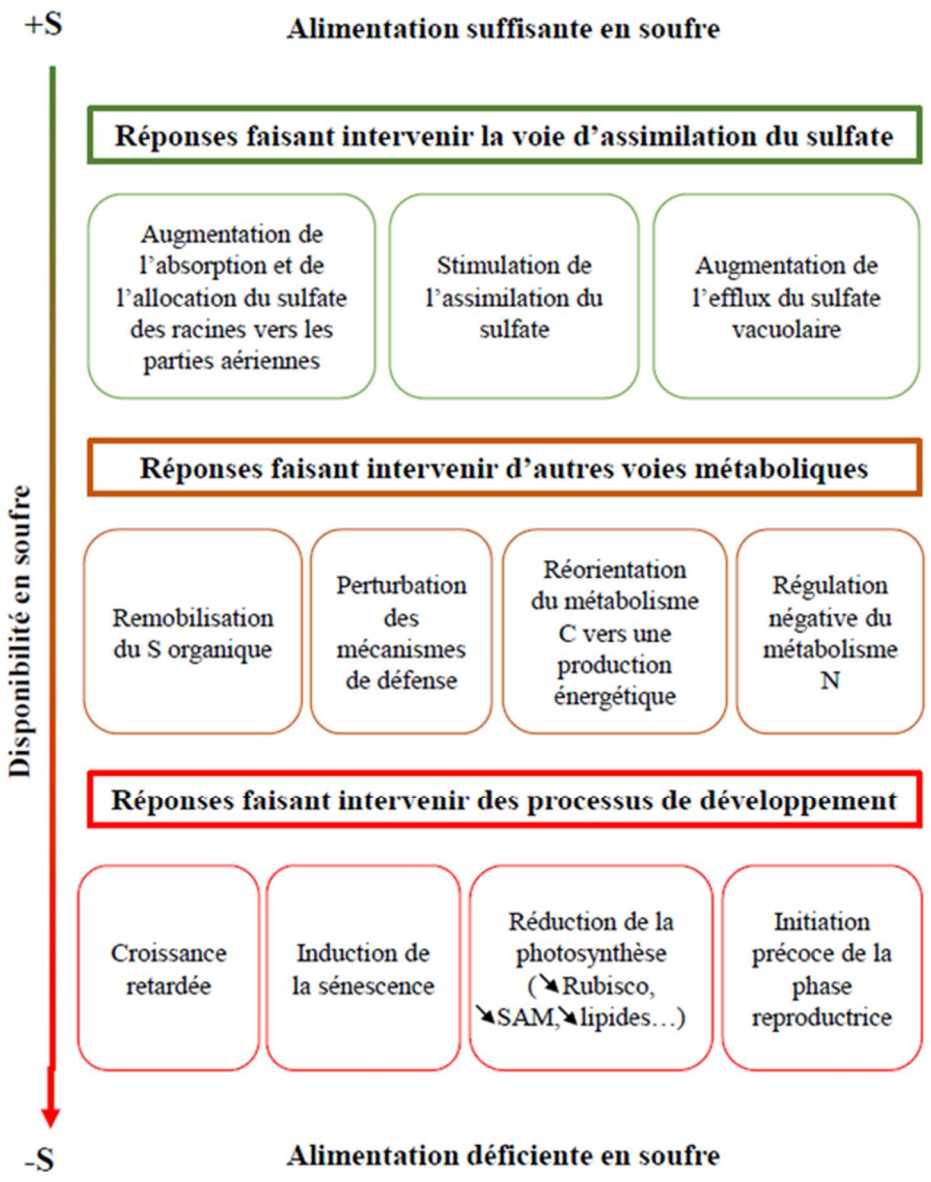


Figure 10 : Modifications physiologiques et métaboliques induites par la limitation en S chez les végétaux (d'après la thèse de doctorat d'Emilie Poisson, 2018).

1.3.3. Débouchés industriels des graines

Avec une production mondiale de plus de 65 Mt en 2020, le colza occupe la première place dans les cultures oléo-protéagineuses produites en Europe (Annexe 1, Terres Univia, 2021). Son intérêt économique repose sur ses **graines très riches en huile** (en moyenne 43% de la composition totale, Figure 11a) **et en protéines** (en moyenne 19%). Après la récolte, les graines du colza subissent un processus de trituration permettant de séparer l'huile brute du tourteau résiduel. L'huile extrait (Figure 11b) est riche en acide gras polyinsaturés, précurseurs des oméga-3 et oméga-6, ainsi qu'un faible ratio ω6:ω3 (d'environ 2:1, inférieur aux

recommandations de l'OMS comprises entre 5:1 et 10:1). L'**huile de colza** est ainsi adaptée à des usages à la fois alimentaires (huile alimentaire, industrie agroalimentaire) et industrielles (biocarburants, biolubrifiants, détergents, cosmétiques). Le **tourteau** (Figure 11c), coproduit solide issu de l'extraction d'huile, est riche en protéines et principalement utilisé dans l'alimentation animale. Grâce à sa qualité nutritionnelle, le tourteau de colza a le potentiel de remplacer le tourteau de soja (dont la production est dépendante des exportations), et ainsi de contribuer à l'amélioration de la qualité des produits d'origine animale (lait, viande, œufs). Dans un contexte de demande mondiale croissante en aliments et de vulnérabilité climatique, le colza représente également une alternative prometteuse aux protéines d'origine animale (Von Der Haar et al., 2014).

Dans un premier temps, les efforts de sélection se sont principalement concentrés sur la réduction drastique des teneurs en acide érucique et en glucosinolates dans les graines. Puis, les programmes ont cherché à augmenter la teneur en lipides des graines, ce qui a permis de positionner le colza comme une **culture oléagineuse majeure pour la filière des huiles végétales**. Par ailleurs, la concentration élevée en huile contribue à l'attribution des prix supplémentaires payés aux agriculteurs lors du calcul du prix de vente des graines du colza. Dans l'objectif de créer de la valeur ajoutée, une norme de référence pour les graines a été mise en place dans les années 90, connue sur le nom de « **point d'huile** », qui correspond à un paiement de 1,5% du prix d'achat par l'acheteur final pour chaque point d'huile au-delà de 40% (FOP, 2016). Le 1,5% correspond à la valorisation d'une moyenne historique sur 10 ans de la différence entre la rémunération de la protéine et de la rémunération de l'huile. En ce que concerne la rémunération de la teneur en protéines des graines, une nouvelle initiative de rémunération adaptée a été lancée par Saipol (filiale du groupe Avril) via sa plateforme OleoZE, mais les résultats du projet ne sont pas encore disponibles (Saipol, 2022).

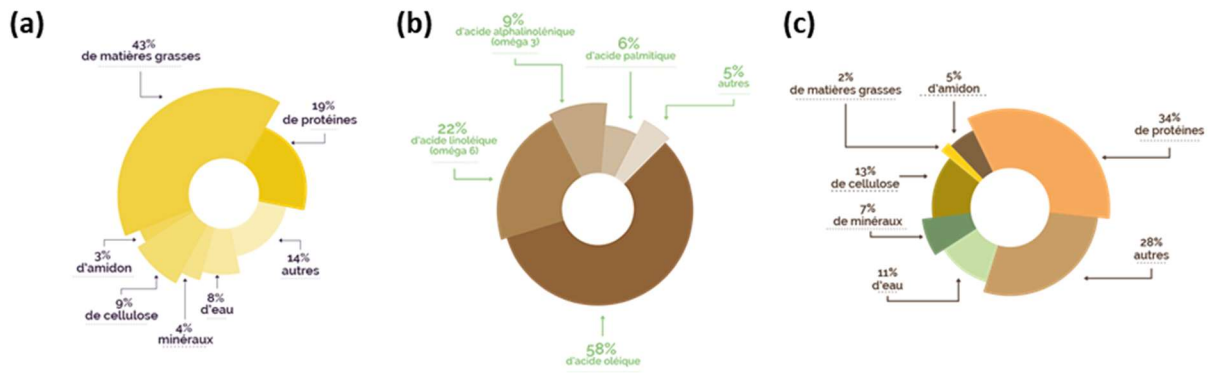


Figure 11 : Composition standard de la graine (a), de l'huile (b) et du tourteau (c) de colza (Terres Univia, 2021).

1.3.4. Les composantes du rendement et définitions des critères de qualité

L'intérêt des graines de colza ne se limite pas uniquement aux rendement élevés, puisque les **critères de qualité jouent un rôle central selon le débouché visé**. La définition des critères de qualité grainière est plus complexe car ils concernent non seulement la qualité nutritionnelle (e.g. teneurs en huile et protéines, profils d'acides gras), mais aussi la qualité physiologique (e.g. vigueur germinative, aptitude à la conservation), technologique (e.g. aptitude à la pressabilité) et sanitaire (e.g. absence de pathogènes).

Les composantes de rendement

Chez le colza, le nombre de graines est directement lié à la densité en plantes, au nombre de siliques par plantes et du nombre de graines par silique (Diepenbrock, 2000). Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence la dynamique des composantes de rendement (Figure 12), qui se mettent en place séquentiellement au cours du cycle de culture (Corlouer et al., 2019; Diepenbrock, 2000; Habekotté, 1993; Jullien et al., 2011). La période critique pour la formation des graines est concomitante à la période de floraison (Habekotté, 1993, 1997a), qui est également considérée comme la période la plus sensible au stress thermique (Weymann et al., 2015). Des études de modélisation prédictive ont indiqué que la période de 350 °Cj (T_{base} = 0°C) à partir du début de la floraison est particulièrement critique pour la définition du rendement chez le colza (Habekotté, 1997b).

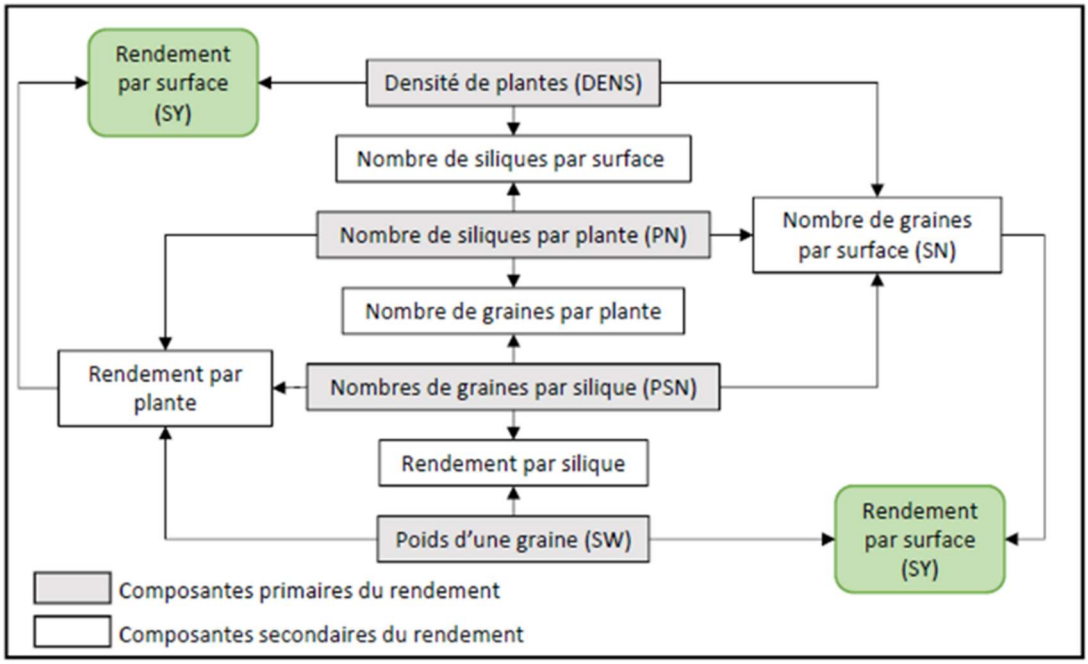


Figure 12 : Relations entre les composantes de rendement chez le colza (d'après la thèse de doctorat d'Erwan Corlouer, 2020).

Définition de la qualité nutritionnelle

Les huiles représentent un aspect central de la qualité nutritionnelle de nombreuses graines, grâce à leur utilité en tant que source énergétique et leurs diverses propriétés physico-chimiques (Bewley et al., 2013). En effet, la qualité nutritionnelle de la graine de colza dépend étroitement de la **quantité et qualité des huiles dans les graines**, qui représente environ 40-50% de son poids sec (Figure 11a). Les huiles végétales sont composées d'acides gras (AG) qui possèdent une chaîne carbonée (entre 12 et 24 atomes de carbones) caractérisée par la présence éventuelle de doubles liaisons définissant son degré d'insaturation. La composition de l'huile en AG détermine sa qualité nutritionnelle, ses applications industrielles et ses propriétés organoleptiques (Aguirrezábal et al., 2015). Pour les variétés double-zéro (00, Figure 11b), l'huile de colza est principalement composée d'acide oléique (C18:1, ~60%), linoléique (C18:2, ~20%) et alpha-linolénique (C18:3, ~10%). Les AG linoléique et alpha-linolénique appartiennent aux groupes essentiels des oméga-6 et oméga-3 respectivement. Ces AG essentiels ne sont pas synthétisés par les animaux mais sont nécessaires à leur développement selon un **ratio ω6:ω3 faible** (compris entre 5:1 et 10:1, d'après les recommandations de l'OMS). Ainsi, l'huile de colza est reconnue pour sa haute qualité nutritionnelle car elle est une source équilibrée d'AG essentiels, avec un ratio ω6:ω3 d'environ 2:1. En ce qui concerne les autres applications industrielles comme les lubrifiants et biocarburants, l'huile de colza est également recherchée car la majorité des AG ont un faible degré d'insaturation (e.g. acide oléique), ce qui permet d'augmenter la viscosité et les propriétés de combustion (Ge et al., 2017). La graine du colza possède environ 20% de protéines (Figure 11a), celles-ci étant majoritairement des **protéines de réserves qui sont une source centrale d'azote, de soufre et de carbone**. Ces protéines sont classées en trois principales familles (i.e. albumines, globulines et prolamines) en fonction de leurs propriétés de solubilisation. Comme pour les huiles, certains acides aminés sont dits essentiels dans la mesure où ils nécessaires à leur métabolisme, mais ne sont pas synthétisés par les animaux. Ainsi, les globulines 12S (cruciférines) et les albumines 2S (napines) sont des sources de lysine, et les albumines représentent également une source de cystéine et méthionine.

Outre les lipides et protéines, les **glucides,** bien que moindre dans les graines de colza, jouent également un rôle important dans la qualité nutritionnelle. L'amidon est le glucide principal des réserves énergétiques, même si les polysaccharides constituants de la paroi cellulaire représentent également une fraction importante. Dans les graines d'*Arabidopsis thaliana*, l'amidon est accumulé dès la fin de l'embryogenèse et est presque totalement dégradé pendant la phase de remplissage des graines et l'accumulation d'huile (Baud et al., 2002).

Définition de la qualité physiologique

Les graines de colza peuvent être valorisées par différents procédés de transformation du grain ou en tant qu'organe reproducteur (i.e. semence). La qualité physiologique des semences recouvre la vigueur germinative, de dormance, de longévité et d'aptitude au stockage. Selon l'Association Internationale des Essais de Semences (ISTA) et le Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés et des Semences (GEVES), la **vigueur** est l'ensemble des propriétés de la semence ou du lot de semences déterminant son niveau d'activité et de développement au cours de la germination et de la levée des plantules (GEVES, 2016). L'analyse de la vigueur germinative considère l'ensemble des étapes comprises entre le début de l'imbibition et la percée des tissus externes de la graine par l'embryon (généralement par sa radicule), ainsi que le développement des plantules. Ces caractères font objet des essais de germination dans le but de déterminer le potentiel de germination d'un lot de semences. Ainsi, les essais de vigueur et les essais de germination sont complémentaires pour déterminer la qualité physiologique des graines. Selon le GEVES (2014), ces tests incluent les mesures des taux et de l'homogénéité de germination (vitesse, durée), de croissance des plantules, du potentiel de levée en conditions défavorables et de l'aptitude au stockage. Le taux et l'homogénéité de la germination sont des critères physiologiques importants pour l'implantation des cultures.

La **dormance et la longévité** sont d'autres aspects importants en lien avec la vigueur germinative. A la différence des graines récalcitrantes qui meurent quand elles se dessèchent, les graines orthodoxes chez des espèces comme le colza sont « dormantes ». Si cette capacité est acquise lors de la phase de dessiccation sur la plante mère, on parlera alors de dormance primaire. La dormance secondaire correspond à la perte de l'aptitude à germer par des conditions environnementales non favorables après la séparation de la graine de la plante mère (Gruber et al., 2004; Momoh et al., 2002). Bien que le colza ne présente que peu de dormance primaire, certains facteurs environnementaux comme la sécheresse induisent une dormance secondaire (Momoh et al., 2002). La longévité est liée à la capacité de stockage des graines, c'est-à-dire si elles sont plus ou moins sensibles au vieillissement. Lors de la conservation, la longévité des graines diminue principalement avec l'augmentation de la température, de l'humidité relative et de la teneur en oxygène (Leprince et al., 2017). Pour les mesures de la capacité de stockage, les tests le plus utilisés sont les tests de perméabilité membranaire. La mesure du ratio ([raffinose + stachyose]:saccharose), qui sont des Raffinose Family Oligosaccharides (RFOs), peut également être un indicateur physiologique de l'acquisition de la tolérance à la dessiccation des graines, avec un ratio élevé exprimant une meilleure aptitude à la conservation (Bailly et al., 2001).

Autres aspects de la qualité des graines

Les **qualités technologique et sanitaire** sont aussi importantes selon le débouché des graines. Les critères de qualité technologique généralement incluent le taux d'humidité pour la conservation, le pourcentage d'impuretés, le poids spécifique pour gérer le stockage et le transport des lots, et le nombre de graines non conformes (i.e. germées, cassées, bruchées ou endommagées par des insectes). Par ailleurs, les pathogènes tels que des virus, bactéries, champignons, nématodes et insectes présents dans la surface ou à l'intérieur des graines peuvent impacter à la fois ses qualités sanitaire, nutritionnelle et physiologique, mais aussi favoriser la dispersion de maladies et/ou ravageurs. Des normes et tests de qualité sanitaire sont réglementés par l'ISTA (Association Internationale des Essais de Semences).

1.3.5. Développement de la graine de colza

La graine de colza est composée de trois tissus principaux : le tégument (tissus protecteurs), l'albumen (tissus de réserves) et l'embryon. De nombreux processus physiologiques et métaboliques interviennent tout au long du développement de la graine (Figure 13), qui peut être divisé en trois phases principales :

(i) **L'embryogenèse**, allant de la fécondation jusqu'à la formation de l'embryon. Cette phase de division et de différenciation active des cellules est largement décrite dans la littérature (Biancetti, manuscrit de thèse, 2021). La différenciation cellulaire s'intensifie après l'établissement des principaux tissus issus de la double fécondation, à savoir le méristème racinaire et les tissus vasculaires. Ensuite, les cotylédons et le méristème apical caulinaire se différencient et se développent pour donner naissance à un embryon en forme de cœur.

(ii) **Le remplissage**, qui correspond à la phase d'accumulation des réserves lipidiques et protéiques déterminantes pour la qualité nutritionnelle de la graine de colza. Il s'agit également de la phase d'élongation des cellules embryonnaires, pendant laquelle la croissance de l'embryon est soumise au volume interne disponible dans la graine, le cotylédon externe représentant plus de la moitié du poids frais de l'embryon (Borisjuk et al., 2013). Ces deux événements sont déterminants pour l'accumulation de la matière sèche des graines et, par conséquent, de leur poids. Ainsi, les cotylédons continuent de croître et de remplir le volume de la graine jusqu'à la fin du développement embryonnaire (Bewley et al., 2013). Durant cette phase, une accumulation transitoire d'amidon en tant que réserve énergétique a été observée chez *Arabidopsis thaliana* (Baud et al., 2002) et *Brassica napus* (da Silva et al., 1997). Les composés de stockage des graines en développement sont principalement synthétisés à partir

du carbone et de l'azote fournis par la plante mère par les siliques et transférés dans la graine en majorité sous la forme de saccharose et d'acides aminés libres (Bennett et al., 2011). L'amidon préalablement accumulé va être hydrolysé eu même temps que l'accumulation de lipides s'accentue, tandis que les sucres solubles (i.e. saccharose, stachyose et raffinose) vont s'accumuler jusqu'à la fin de la phase de remplissage (Baud et al., 2002). Après la dégradation de l'amidon, les lipides, majoritairement présents sous forme de triacylglycérides (TAGs), deviennent une source de carbone et d'énergie nécessaires à la germination et au début de la croissance de la plantule avant que celle-ci ne devienne autotrophe (Bewley et al., 2013). Les protéines des graines sont synthétisées à partir des acides aminés dans le réticulum endoplasmique granuleux (REG), modifiées au niveau de l'appareil de Golgi, puis transportées et accumulées dans des vacuoles de stockage. Comme pour les lipides, les protéines de stockage seront également utilisées lors de la germination et de la croissance de la plantule comme source de C, N et S (Bewley et al., 2013). Étant donné la concomitance de l'accumulation des lipides et des protéines dans la graine (Figure 13), cela pourrait indiquer une concurrence pour l'énergie et l'espace, et expliquer en partie la corrélation négative entre la teneur en lipides et protéines des graines du colza (Hammac et al., 2017; Kambhampati et al., 2020; Magno et al., 2021, 2022a; Si et al., 2003).

(iii) **La maturation et la dessiccation**, qui correspondent au moment où l'embryon entre en quiescence métabolique (ralentissement ou arrêt), et à la déshydration de la graine. Au cours de cette phase, la synthèse de protéines et de lipides de réserves prend fin. Tel qu'illustré pour *Arabidopsis thaliana* (Baud et al., 2002, Figure 13), la diminution de la teneur en huile en fin de maturation est un résultat de la remobilisation des ressources énergétiques en fin de développement de la graine, de façon à assurer la maturation finale indépendamment des autres parties de la plante (Baud et al., 2002). Après la fin de la maturation et dessiccation, la graine atteint son optimum de qualité physiologique.

Le développement de la graine et l'acquisition de ses qualités reposent ainsi sur plusieurs processus morphologiques et physiologiques, qui sont à leur tour régulés par de nombreux facteurs métaboliques et moléculaires tels que des précurseurs d'hormones ou d'enzymes. En résumé, **le saccharose est la source de carbone principale pour la synthèse des réserves glucidiques et lipidiques, et les acides aminés libres permettent la synthèse des protéines de réserves**. De plus, certaines hormones tels que l'ABA, le GA3 et le SA sont aussi impliquées dans ces processus, et notamment ceux associés à l'induction de la transcription de gènes impliqués dans la synthèse des réserves énergétiques. De plus, l'ABA et le GA3 jouent un rôle important dans la dormance des graines. En effet, l'ABA est

impliqué dans l'induction, le contrôle et le maintien de la dormance primaire, en partie par l'inhibition de l'action des gibbérellines (Ali et al., 2022). Ces hormones sont également impliquées dans la réponse des plantes aux stress abiotiques.

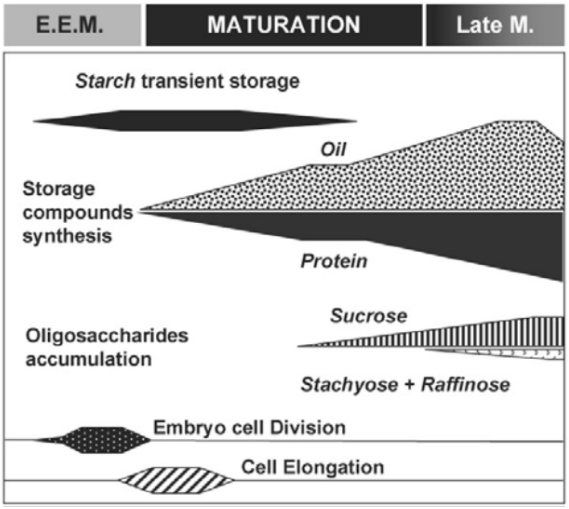


Figure 13 : Développement physiologique de la graine d'*Arabidopsis thaliana* (Baud et al., 2002). EMM : Early Embryo Morphogenesis, Late M : Late Maturation.

1.3.6. Impacts du stress thermique sur le rendement et les qualités grainières

La phase reproductrice du colza inclut plusieurs processus morphologiques, physiologiques et moléculaires qui sont déterminants pour le rendement et les critères de qualité grainière. Alors que la floraison est une période critique pour la définition du nombre des graines (Angadi et al., 2000; Habekotté, 1993; Young et al., 2004), la phase de développement de la graine, qui regroupe le remplissage et la maturation, est déterminante pour l'accumulation des réserves (e.g. lipides, sucres et protéines), ainsi que pour l'acquisition de la qualité physiologique (e.g. tolérance à la dessiccation et induction de la dormance).

Des approches expérimentales *in planta* (conditions contrôlées et au champ) et *in silico* (modélisation) ont mis en lumière les effets du stress thermique sur le rendement et sur certains critères de la qualité grainière, tels que les teneurs en lipides, protéines, sucres et hormones (Tableau 3). La température optimale de croissance pendant le remplissage des graines du colza semble être d'environ 21/16°C (jour/nuit), et **des températures supérieures à 29ºC peuvent causer une réduction du nombre de fleurs ainsi que du nombre et de la taille des graines produites**, en impactant directement le rendement (Morrison and Stewart, 2002). Par ailleurs, de nombreuses études ont souligné que lorsque la température augmente, le nombre de graines produites par plante augmente alors que le poids

individuel des graines diminue (Aksouh-Harradj et al., 2006; Aksouh et al., 2001; Brunel-Muguet et al., 2015b; Magno et al., 2021, 2022a).

Cependant, ces effets du stress thermique sur les composantes du rendement sont très dépendants des caractéristiques intrinsèques du **protocole de stress**, notamment la période, l'intensité et la durée de l'exposition à la chaleur (Chen et al., 2020; Gan et al., 2004). Ainsi, si l'exposition au stress dure plusieurs jours ou semaines, le rendement et ses composantes seront probablement affectés, car le stress peut endommager la pollinisation et accélérer le développement, les graines étant donc contraintes pendant les phases de remplissage et maturation. Au contraire, si l'exposition au stress est courte et/ou arrive à un stade physiologique moins critique, les plantes du colza semblent capables de mettre en place des mécanismes de compensation via le nombre ou le poids des graines. Des études comparant les effets des températures élevées sur le rendement à différents stades de croissance des cultures ont mis en évidence que plus le stress survient tôt, plus les possibilités de récupération sont importantes, en particulier pour les espèces à croissance indéterminée telles que le colza (Aksouh-Harradj et al., 2006; Angadi et al., 2000; Gan et al., 2004). Cette capacité de compensation peut être expliqué par des relations source-puits (Jullien et al., 2011).

Du fait que les **processus de synthèse des différents composés de réserves sont séquentiels** (Figure 13), on peut supposer que l'effet direct d'un stress lors du remplissage sera observable uniquement sur le/les composés dont la synthèse et/ou la maturation sont concomitants au stress. Pour les lipides, deux tendances communes sont retrouvées dans plusieurs travaux : (i) la réduction de la teneur totale en lipides associée à l'augmentation de la teneur en protéines (Aksouh-Harradj et al., 2006; Aksouh et al., 2001; Elferjani and Soolanayakanahally, 2018; Hammac et al., 2017); et (ii) la réduction de la teneur en AG polyinsaturés (C18:2 et C18:3) associée à l'augmentation de la teneur des AG saturés (C16:0, C18:0) et monoinsaturés (C18:1), en raison de l'altération de l'activité des enzymes désaturases sous les températures élevées (Aksouh-Harradj et al., 2006; Deng and Scarth, 1998; Gauthier et al., 2017; 2022a; Schulte et al., 2013). En ce qui concerne la qualité physiologique des graines, les effets du stress thermique les plus documentés incluent (i) des impacts sur le taux et la vitesse de germination ; (ii) la réduction de la capacité de stockage, notamment en lien avec une augmentation de la perméabilité membranaire ; (iii) la réduction de la tolérance à la dessiccation, avec un ratio [raffinose + stachyose]:saccharose plus faible ; et enfin (iv) réduction de la dormance, avec les graines stressés présentant un ratio ABA/GA3 plus élevé et des niveaux de graines germées sur pied plus élevés (Brunel-Muguet et al., 2015b; Mácová et al., 2022).

Tableau 3 : Principaux effets du stress thermique sur le rendement et les qualités grainières du colza.

Protocole de stress	Critères analysés	Effets du stress thermique	Références
Deux traitements : (i) augmentation rapide de la température jusqu'à 40°C, maintenue pendant 4h durant 5 jours successifs; ou (ii) 5 jours d'augmentation progressive jusqu'à 40°C	Composantes de rendement, lipides, composition d'AG, protéines, glucosinolates	Le traitement (i) est le plus pénalisant, avec accélération de la maturité des plantes, réduction du poids des graines et du rendement, réduction de la teneur en huile, augmentation des concentrations de protéines et de glucosinolates. De plus, effet prononcé sur la composition en AG, augmentant la teneur en AG saturés. Le traitement (ii) a des effets plus légers et/ou nuls selon le critère analysé	Aksouh et al., 2001
Deux traitements : (i) stress modéré (28/23°C) appliqué entre 20-30 jours après la floraison; ou (ii) stress modéré (28/23°C), avec pic de 38°C pendant 5h entre 25-29 jours après la floraison	Composantes de rendement, lipides, composition d'AG, protéines	Le traitement (ii) est le plus pénalisant, avec 52% de réduction du rendement sur la tige principale, en diminuant le poids des grains, et réduction du rapport huile/protéines. Le traitement (i) a moins d'effet sur le rendement, a accru le rapport d'huile/protéinés, mais a eu un effet plus prononcé sur la proportion d'AG (augmentation de l'acide oléique et diminution de l'acide linoléique)	Aksouh-Harradj et al., 2006
Stress modéré (28/15°C) ou élevé (35/15°C) pendant 7 jours au début de la floraison et développement des siliques, puis récupération à 20/15°C	Composantes de rendement	Sur la tige principale, la réduction moyenne du rendement en graines est de 89%, mais la compensation partielle par les siliques des branches réduit la diminution moyenne du rendement en graines par plante à 52%	Angadi et al., 2000
Expérimentations au champs en Suisse entre 2004-2006, puis des régressions	Dynamique de synthèse de l'acide alpha-linolénique	La synthèse de l'acide alpha-linolénique s'est produite principalement entre 550 et 850 degrés-jours (base 0 °C) après le début de la floraison, période avec plus forte corrélation entre le teneur finale et la température minimale journalière	Baux et al., 2008
Expérimentations au champs en Suisse pendant 10 ans, puis des régressions	Variabilité de la teneur en acide alpha-linolénique entre les lieux, les années et les variétés	Possibilité de prédire la teneur en acide alpha-linolénique à la récolte, en se basant simplement sur la température minimale pendant la remplissage des graines	Baux et al., 2013
Stress (33/19°C) pendant le remplissage des graines du début de la formation des siliques jusqu'à la maturité	Composantes de rendement, teneurs en S et N, lipides, protéines, sucres, hormones	Augmentation des teneurs en S et en lipides et diminution du rapport C18:2/C18:3 et du rapport des protéines 12S/2S. Accélération de la germination, réduction de la capacité de stockage et de la tolérance à la dessiccation.	Brunel-Muguet et al., 2015b
Températures de 10, 16, 21 et 26,5 °C pendant la période de développement des graines	Quantité de lipides et composition d'AG	La teneur en huile diminue continuellement avec l'augmentation de la température. La quantité d'acides gras insaturés a diminué sous haute température, accompagnée d'une augmentation d'acide oléique	Canvin, 1965
Plusieurs traitements (3, 5 ou 7 jours) à différents périodes de la phase reproductrice, variant entre des niveaux modérés (32/22°C) et élevés (35/25°C) de stress	Composantes de rendement et indicateurs de la croissance végétative	Réduction du nombre de siliques et du rendement en graines sur la tige principale ou sur les branches selon la période d'exposition au stress. Les hautes températures n'ont pas réduit la croissance végétative des plantes	Chen et al., 2020
Traitement à haute température (30/25°C) pendant 40 jours durant le développement des graines	Quantité de lipides et composition d'AG	Les graines des plantes stressées ont des teneurs plus faibles en AG polyinsaturés (C18:3), et plus élevés de AG saturés (C16:0, C18:0) et monoinsaturés (C18:1)	Deng and Scarth, 1998

Stress modéré (29/18°C) à partir du 38ème jour après le semis	Photosynthèse, composantes de rendement, protéines et lipides	Le rendement en graines est réduit de 85% sous stress. La teneur en huile des graines diminue de 52%, tandis que la teneur en protéines a augmenté. De plus, la teneur en AG saturés a augmenté	Elferjani and Soolanayakanahally, 2018
Stress élevé (35/18°C) et modéré (28/18°C) pendant 10 jours durant la formation des bourgeons, la floraison et le développement des siliques	Composantes de rendement	Le rendement en graines par plante est réduit de 15% lorsque les plantes ont subi le stress intense (35/18°C) pendant la formation des bourgeons, de 58% lorsqu'elles ont subi le stress pendant la floraison et de 77% avec le stress pendant le développement des siliques	Gan et al., 2004
Expérimentations au champs en Suisse et plusieurs protocoles sous conditions contrôlées jusqu'à (25/15°C)	Quantité de lipides et composition d'AG	La température affecte la composition en AG, en augmentant la teneur en acide oléique (C18:1) et en diminuant la teneur en acide alpha-linolénique (C18:3)	Gauthier et al., 2017
Expérimentations au champs aux USA entre 2008 et 2013, puis analyse de données	Rendement, quantité de lipides, composition d'AG et protéines	Les acides gras insaturés, l'acide oléique, l'huile de grain, les protéines et le rendement maximal théorique étaient corrélés à la variabilité de l'eau et de la température	Hammac et al., 2017
Des siliques pré-incubées à trois stades de croissance (20, 30 et 40 DAP) ont été exposées au stress de 37 °C durant 6 heures par jour pendant 2 jours	Photosynthèse, composantes de rendement, lipides, sucres et aspects transcriptionnels	Le stress entraîne une réduction de l'huile dans les graines, alors que la teneur en sucre des graines a augmenté, ce qui indique que l'incorporation des hydrates de carbone dans les TAGs a été altérée	Huang et al., 2019
Trois différents régimes de température (21/18°C, 28/18°C, et 34/18°C) en début de floraison	Rendement, la qualité et la viabilité des graines, et le développement du embryon	La réduction du rendement en graines viables sous stress était le résultat d'un taux de fécondation réduit, un taux d'avortement accru, un développement embryonnaire défectueux et une germination avant la récolte	Mácová et al., 2022
Expérimentations au champs aux USA entre 1989-1991, puis des régressions	Composantes de rendement	Diminution du rendement en graines avec l'augmentation de la température pendant la floraison, étant le résultat de la réduction du nombre de fleurs ainsi que du nombre et de la taille des graines produites	Morrison and Stewart, 2002
Augmentation progressive de la température de 10 à 40 °C pendant le remplissage	Quantité de lipides et composition d'AG	Augmentation de la teneur d'acide oléique (C18:1) et diminution de la teneur d'acide linoléique (C18:2) et alpha-linolénique (C18:3)	Schulte et al., 2013
Stress (27/24°C) pendant la floraison	Traits racinaires, rendement et résistance à la verse	Changement des caractéristiques morphologiques des racines, réduction de la fertilité des siliques de 28%, et réduction du rendement de 34%	Wu et al., 2020
Stress (18 °C la nuit, aug. de 2 °C/h sur 6h, 35 °C pendant 4h, puis red. de 2 °C/h et retour à 23 °C pendant 6h) durant 1 ou 2 semaines après le début de la floraison	Développement des siliques et des graines, composantes de rendement	Les fleurs se sont développées en fruits parthénocarpiques sans graines ou ont avorté sur la tige. Les plantes ont compensé le manque de siliques en augmentant le nombre d'inflorescences latérales. La viabilité et la germination du pollen étaient réduites	Young et al., 2004
Augmentation de 10°C dans la température moyenne nocturne (entre 21h et 5h)	Quantité de lipides et composition d'AG	Réduction des lipides de l'ordre de 13-19%. Diminution des proportions relatives de C18:0 et C18:1, mais a augmentation les proportions de C18:2 et C18:3	Zhou et al., 2018

1.3.7. Réflexion : comment limiter les impacts des stress répétés ?

Les études sur les effets du stress thermique aux différents stades de la phase reproductrice montrent que pour qu'un protocole de stress soit thermo-sensibilisant pour le colza, il faut prendre en compte (i) des caractéristiques spécifiques des espèces à croissance indéterminée, étant donné que des organes d'âges différents sont présents sur la plante pendant le stress et qu'ils sont donc affectés différemment ; (ii) des effets différés du stress en raison d'une séquentialité des processus sous-jacents à l'élaboration des différents critères de qualité; et (iii) des caractéristiques intrinsèques du stress thermique, i.e. la période d'exposition, la fréquence, la durée et l'intensité.

Bien que les effets des températures élevées sur le colza sont largement documentés, les effets des stress thermiques répétés ne sont pas connus. En effet, **l'ampleur globale de la réponse de la plante à des stress répétés ne semble pas être égale à la somme des effets individuels** de chaque événement car (i) le premier stress suivi d'une phase de récupération entraîne des ajustements physiologiques et métaboliques qui amènent la plante à un état modifié lorsque le stress se reproduit, sa réponse aux stress successifs sera donc différente de sa réponse au premier stress ; et (ii) les stress répétés peuvent induire une mémoire bénéfique ou pénalisante du stress tout au long du cycle de culture, et même entre générations. Les travaux sur les effets bénéfiques de la mémoire sont donc à approfondir pour envisager des protocoles thermo-sensibilisants comme levier pour limiter les impacts des hautes températures sur le rendement et la qualité grainière du colza. La compréhension des effets des stress thermiques répétés est donc un enjeu pour les filières agro-alimentaire, semencières et de la chimie verte qui sont tributaires de la qualité grainière.

La qualité grainière du colza d'hiver : Points à retenir

- Le colza possède une croissance indéterminée, ce qui implique la mise en place séquentielle des ramifications, puis des siliques et des graines qui ont des âges différents selon leur position dans la plante. La floraison est la phase la plus sensible au stress thermique.

- Le colza est une culture exigeante en S. Une alimentation soufrée réduite aura un impact sur la croissance, le rendement et la qualité grainière, mais également sur la réponse aux stress du fait du rôle du S dans la synthèse et la signalisation de phytohormones qui contrôlent la tolérance aux stress.

- Les graines du colza sont principalement utilisées pour des débouchés destinés à l'alimentation humaine (huile alimentaire, industrie agroalimentaire) et animale (tourteaux), mais aussi pour des débouchés industriels non alimentaires (biocarburants, biolubrifiants, détergents, cosmétiques).

- Les critères de qualité grainière regroupe de nombreuses variables indicatrices de la qualité nutritionnelle (e.g. teneurs en huile et protéines, profils d'acides gras), de la qualité physiologique (e.g. vigueur germinative, aptitude à la conservation), de la qualité technologique (e.g. aptitude à la pressabilité) et de la qualité sanitaire (e.g. absence de pathogènes). L'importance de ces critères est dépendante du débouché.

- Les processus métaboliques conduisant à l'élaboration des composés de réserves lors du développement de la graine du colza sont séquentiels.

- En résumé, lorsque le stress thermique survient au moment de la floraison et la formation de la graine, il affecte principalement les composantes du rendement. Lorsque le stress thermique survient au cours du remplissage de la graine, il a un impact direct sur le contenu des composés de réserve (lipides, protéines, sucres).

1.4. La prédiction des effets du stress thermique

1.4.1. Concepts généraux de modélisation des cultures

La complexité des systèmes agricoles vient de la multitude des variables impliquées dans leur fonctionnement (e.g. climat, sol, espèce végétale ou animale, pathogènes, techniques culturales, déterminants sociétaux et économiques). L**a modélisation est un outil indispensable pour analyser ces systèmes complexes**, dont les applications visent à préconiser des actions de pilotage pour les acteurs des différentes filières (Bellon-Maurel et al., 2022). La modélisation repose ainsi sur la construction préalable d'un cadre d'analyse intégrant un ensemble d'équations mathématiques ou de formalismes décrivant de façon conceptuelle le fonctionnement d'un organisme ou d'un système complèxe. Ils doivent non seulement considérer des variables d'état intrinsèques à l'organisme ou le système d'intérêt, mais aussi des paramètres définissant les relations entre ces variables et des facteurs extérieurs qui les influencent (Asseng et al., 2013).

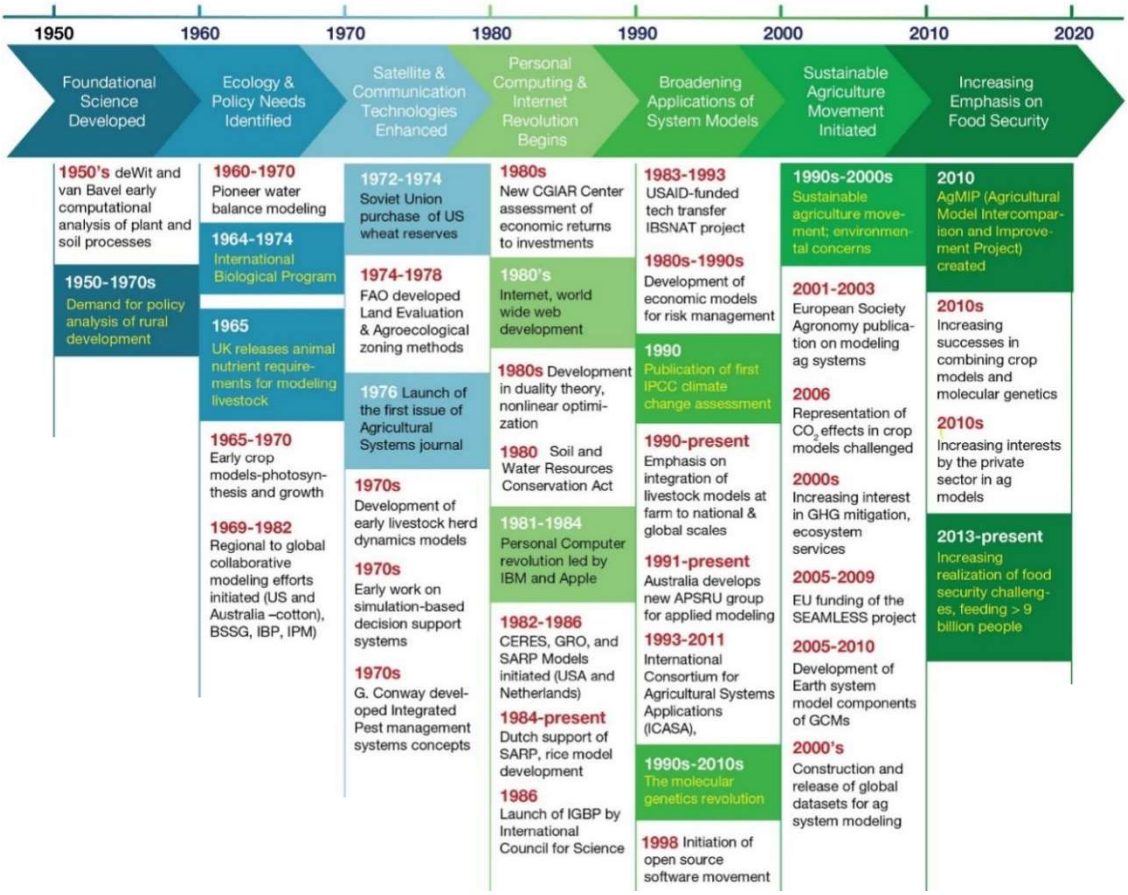


Figure 14 : Résumé chronologique des événements qui ont influencé le développement de modèles appliqués aux systèmes agricoles dans le XXème siècle (Jones et al., 2017).

Les premières approches de modélisation datent de l'Antiquité, notamment dans l'objectif de prédire le rendement des céréales. C'est durant le XXème siècle que l'utilisation des modèles à des fins agricoles a connu une croissance exponentielle qui a été marquée par plusieurs évènements (Figure 14, Jones et al., 2017). A l'origine, les modèles ont été développés pour optimiser les systèmes agricoles dans des contextes non-limitants en intrants, et enfin pour optimiser la sélection génétique. Puis des **enjeux environnementaux** se sont imposés aux objectifs productivistes et les modèles se sont tournés davantage vers la prise en considération des effets des limitations en intrants dans l'objectif de rationaliser leur utilisation. L'essor de l'informatique a permis **d'intégrer différentes échelles** décrivant l'exploitation, la canopée, la plante et les organes dans les modèles, en les rendant plus performants en termes de prédiction. Aujourd'hui, la modélisation appliquée à l'agriculture inclut plusieurs utilisations, et vise principalement quatre objectifs : **comprendre, communiquer, prédire et optimiser l'évolution** de diverses composantes d'un organisme ou d'un système agricole dans différents environnements pédoclimatiques (Bellon-Maurel et al., 2022). Il existe différents types de modèles allant de modèles mécanistes jusqu'à des modèles empiriques, en passant par des modèles intermédiaires semi-mécanistes ou semi-empiriques. Par la suite, je présente les trois grandes approches de modélisation que j'ai mises en œuvre pendant cette thèse.

1.4.2. Les trois approches de modélisation testées dans le cadre de la thèse

Trois grandes approches de modélisation sont présentées dans ce manuscrit, avec une attention particulière portée sur leur utilisation pour prédire les effets des stress répétés sur la croissance et la production des graines du colza. Jusqu'à présent, la quantification et prédiction des effets du changement climatique sur les cultures ont été faites en utilisant principalement deux approches de modélisation qui mettent en relation le comportement d'une variable d'intérêt et des variables explicatives à des fins de prédiction : (i) **modélisation statistique ou empirique**, basée particulièrement dans l'utilisation d'indicateurs (Ben-Ari et al., 2016; Caubel et al., 2015; Pullens et al., 2021; Wilcox and Makowski, 2014); et (ii) **modélisation mécaniste**, avec l'intégration de processus biologiques au sein d'un cadre conceptuel (Asseng et al., 2013, 2015b; Chenu et al., 2017; Kumar, 2016; Martre et al., 2015; Tao et al., 2018; Wang et al., 2017a; Zhai et al., 2017). Enfin, une troisième approche exploratoire de modélisation basée sur la **fouille de données** sera également présentée (Bazin et al., 2021, 2022; Couceiro and Napoli, 2019; Henriques and Madeira, 2014; Madeira and Oliveira, 2004).

Modèles statistiques incluant des indicateurs agroclimatiques

Parmi les modèles statistiques, ceux basés sur l'utilisation des indicateurs agroclimatiques se sont largement répandus en agronomie. De façon générale, ces indicateurs sont **dérivés directement des variables climatiques** (par exemple, le nombre de jours de chaleur ou de froid sur des périodes calendaires spécifiques), et fournissent des informations synthétiques sur les effets du climat sur le fonctionnement des cultures (Caubel et al., 2015). Ainsi, ces indicateurs peuvent être utilisés pour analyser divers effets de la variabilité du climat sur la croissance des cultures (Arnell and Freeman, 2021; Diodato and Bellocchi, 2008), tels que la sensibilité du maïs aux conditions météorologiques de différentes zones de production (Mathieu and Aires, 2018), ou encore l'occurrence de rendements de blé anormalement bas (Ben-Ari et al., 2016). L'utilisation d'indicateurs agroclimatiques liés à des contraintes associées au changement climatique i.e. la rayonnement, la température et la disponibilité d'eau a déjà été réalisée pour analyser les variations de rendement chez le colza (Pullens et al., 2019; Zhang et al., 2017).

La simplicité théorique de ces modèles permet une **multitude d'applications**, tels que le calcul des stades phénologiques, le couplage avec des données satellites, et le développement des outils d'aide à la décision. Néanmoins, ces modèles sont souvent couplés à d'autres approches de modélisation car ils ne peuvent représenter qu'un nombre limité de contraintes et/ou n'apportent pas d'explications sur les relations entre plusieurs facteurs. En effet, ils ne représentent généralement pas l'ensemble des contraintes agricoles (itinéraires techniques, fertilisation, irrigation, attaques biotiques). Bien que la plupart des données climatiques soit triée ou prétraitée en amont de la modélisation, le grand nombre et la répartition étendue des stations météorologiques et des sites expérimentaux peuvent aussi entraîner des incertitudes dans les résultats (Zhang et al., 2017). De plus, cette approche est généralement **basée sur des valeurs moyennes des variables climatiques**, ce qui ne permet pas de rendre compte de la variabilité à des échelles temporelles fines, ni d'événements extrêmes à des stades critiques du cycle de cultures (Luo et al., 2010; Wilcox and Makowski, 2014). Une alternative développée récemment dans le but de réduire certaines de ces incertitudes consiste à construire des indicateurs agroclimatiques pour chaque période de croissance de l'espèce d'intérêt. Comme le proposent Caubel et al. (2015), la précision des prédictions pourrait être améliorée à l'aide d'indicateurs qui sont calculés compte tenu des périodes phénologiques des cultures, appelés ainsi « **indicateurs écoclimatiques** ».

Modèles écophysiologiques (semi)-mécanistes

Les modèles des cultures ou modèles écophysiologiques (semi)-mécanistes sont des modèles relativement complexes utilisés en agronomie puisqu'ils sont capables de représenter une multitude des processus biologiques (e.g. photosynthèse, absorption racinaire, évapotranspiration, sénescence), pouvant prédire les effets des contraintes biotiques et abiotiques (e.g. sanitaires, hydriques, thermiques ou nutritionnelles) et des pratiques agricoles (e.g. caractéristiques du sol, dynamique de l'eau et des nutriments) sur des variables d'intérêt représentatives de la performance des plantes (e.g. rendement, qualité des produits récoltés) et des variables environnementales (e.g. les reliquats N, bilans hydriques, etc.). Ces modèles (semi)-mécanistes sont non seulement des **outils de compréhension des processus biologiques** impliqués dans la croissance des plantes, mais aussi des **outils de prédictions** pouvant simuler les réponses des cultures dans de larges gammes de scénarii environnementaux et aider à la prise de décision (Bellon-Maurel et al., 2022).

Pour le colza, plusieurs modèles dérivant d'adaptations de modèles de culture génériques ont été recensés. Parmi ceux-ci, les plus connus sont BRASNAP-PH (Habekotté, 1997b), CERES-Rape (Gabrielle et al., 1998a, 1998b), AZODYN-Colza (Jeuffroy et al., 2003), APSIM-Rape (Robertson and Lilley, 2016) et CROPGRO-Canola (Saseendran et al., 2010). Les variables d'entrée sont principalement la température, le rayonnement et la photopériode, mais aussi des variables liées à la conduite des cultures, telles que l'irrigation et la fertilisation azotée. Même si **la température est une variable d'entrée centrale** dans plusieurs modèles puisqu'elle contrôle la phénologie et de nombreux processus de croissance, la fréquence des épisodes des stress thermiques répétés induits par les vagues de chaleur n'est pas encore prise en compte dans les modèles de culture.

Méthodes de fouille de données

Les approches de modélisation basées sur la fouille de données (ou « data mining ») permettent de découvrir certaines structures, relations entre variables et/ou processus par l'extration des modèles intelligibles et réutilisables avec des jeux de données éventuellement volumineux et complexes (Couceiro and Napoli, 2019). **Les nombreuses applications en informatique et en intelligence artificielle se sont étendues désormais à d'autres domaines** (Bazin et al., 2021), notamment aux sciences de la vie comme la médecine et l'agronomie/l'écophysiologie végétale, en vue de mieux comprendre et/ou prédire l'effet de certaines variables. Les méthodes de fouille de données les plus utilisées en agronomie incluent les associations, les classifications, les arbres de décision, les regroupements avec le clustering et la recherche des motifs récurrents. Les motifs correspondent à des similitudes/régularités

implicites des données ou de sous-parties des données (Bellon-Maurel et al., 2022). Deux méthodes exploratoires de fouille de données ont été testées au cours de cette thèse en collaboration avec le Laboratoire Lorrain de Recherche en Informatique et Applications (LORIA, INRIA, Nancy) : le **biclustering** et la **Causal Formal Concept Analysis (CFCA)** multivariée.

D'après la thèse de Nyoman Juniarta (2019), **l'extraction de connaissances dans les bases de données est un processus composée de plusieurs étapes fondamentales** (Figure 15), à savoir (i) la compréhension du domaine d'étude et l'identification des questions à répondre ; (ii) la sélection d'un ensemble de données qui sera utilisé dans les analyses ; (iii) le prétraitement des données retenues, tels que l'enlèvement de bruit ou un traitement de valeurs manquantes ; (iv) la transformation, où on prépare les données en créant sa représentation ou transformant des variables ; (v) l'application d'une méthode spécifique de fouille de données, par exemple classification, regroupement, régression, agrégation, etc.; (vi) l'exécution d'un algorithme qui résulte à des motifs ; (vii) l'interprétation des motifs, par une représentation graphique par exemple ; et (viii) la communication des motifs retenus aux parties concernées, et enfin l'utilisation des connaissances extraites.

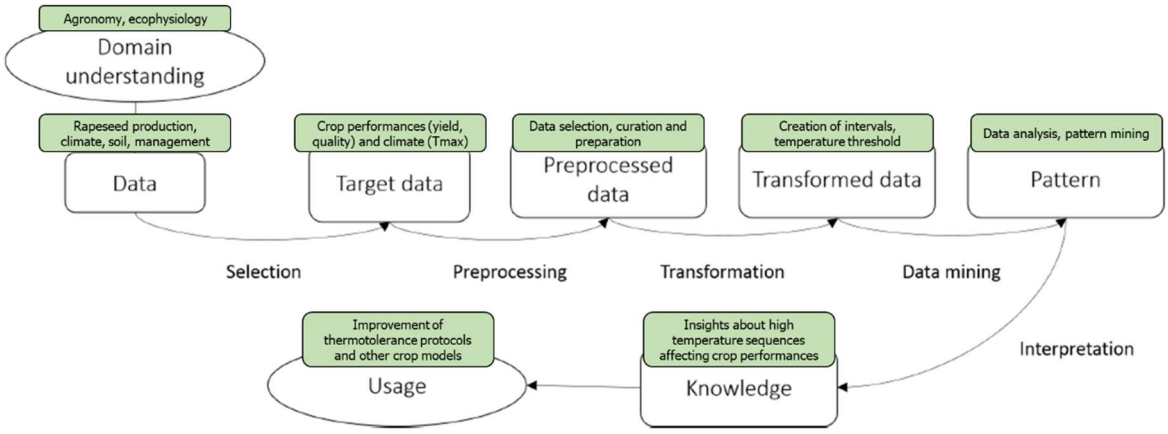


Figure 15 : Schéma illustratif des étapes impliquées dans les méthodes de fouille de données, avec un exemple d'application agronomique. Adapté de la thèse de Nyoman Juniarta (2019).

1.4.3. Réflexion : comment prédire les effets des stress thermiques répétés ?

La modélisation, indépendamment de la méthode choisie, est une approche efficace pour prévoir le comportement et le rendement des cultures dans une large gamme de pratiques et de conditions environnementales. Au cours des dernières décennies, un effort particulier a été fait pour **élargir l'utilisation des modèles de culture aux prévisions liées au**

changement climatique (Asseng et al., 2015b; Chenu et al., 2017; Martre et al., 2015; Tao et al., 2018; Wang et al., 2017a). Cependant, de nombreux éléments montrent qu'il est nécessaire d'améliorer les modèles des cultures, et en particulier les fonctions de réponse à la température, afin de réduire les incertitudes des simulations sous des climats futurs (Rötter et al., 2011; Wang et al., 2017a).

Le contexte climatique actuel est caractérisé notamment par une fréquence accrue d'événements extrêmes telles que les vagues de chaleur et, par conséquent, des stress thermiques répétés, ce qui soulève la question de l'acuité des modèles de culture. D'une part, **les réponses à la température sont calibrées sans considérer les températures extrêmes**, ce qui les rendent inexactes si la température dépasse les seuils critiques. Ce défaut de prise en compte des évènements extrêmes dans les approches de modélisation peut être en partie justifié par une **disponibilité limitée de jeux de données historiques** associant ces évènements à la performance des cultures dans une même localité géographique. D'autre part, comme détaillé précédemment, ces erreurs peuvent être la conséquence d'une **mauvaise considération de l'effet d'une séquence des stress répétés**, du fait d'une atténuation ou d'une amplification des effets des stress successifs (i.e. mémoire du stress bénéfique ou pénalisante). Ces constats incitent à requestionner les approches de modélisation prédictive des cultures. A notre connaissance, aucune étude de modélisation n'a tenté de décrypter les biais de simulation au regard des effets des stress répétés et de la mémoire du stress jusqu'à présent.

La prédiction des effets des stress thermiques : points à retenir

- La modélisation est une représentation conceptuelle d'un système ou d'un organisme plus ou moins complexe, qui permet à la fois de mieux le comprendre, mais aussi de simuler sa réponse à des variables indépendantes.

- Les indicateurs écoclimatiques sont définis sur chaque période de croissance de l'espèce d'intérêt, en considérant ainsi des spécificités liées aux stades phénologiques.

- La modélisation statistique se base sur des relations entre le comportement d'une variable d'intérêt et des variables explicatives sans hypothèse fonctionnelle.

- La modélisation mécaniste est fondée sur l'intégration de processus biologiques au sein d'un cadre conceptuel évoluant en un modèle de culture prédictif.

- La modélisation par fouille de données recherche des motifs (i.e. des similitudes/régularités ou des relations implicites) entre les objets et les attributs d'un jeu de données.

Chapitre 2 :

Plan de recherche

2.1. Problématique et objectifs

Cette thèse vise à analyser les performances du colza dans un contexte de réchauffement climatique caractérisé par une **fréquence accrue des vagues de chaleur, entraînant l'exposition à des stress thermiques répétés** au cours de la phase de remplissage des graines. La problématique de la thèse repose sur le postulat que la répétition d'événements stressants induirait un effet mémoire du stress qui atténuerait ou accentuerait la réponse des plantes aux stress ultérieurs. Par conséquent, une meilleure connaissance des effets des stress répétés (en termes de période, intensité, durée et fréquence du stress) pourrait (i) être explorée dans des **protocoles thermo-sensibilisants** et (ii) alimenter une réflexion autour des améliorations à apporter aux **approches de modélisation** dans un climat futur.

Ainsi, la problématique centrale de la thèse et les questions sous-jacentes sont les suivantes :

Quels sont les impacts de stress thermiques répétés sur le rendement et la qualité grainière du colza et comment les prendre en compte dans des approches de modélisation des cultures ?

- Quels sont les impacts intra- et intergénérationnels de protocoles thermiques constitués de séquences d'évènements chauds différant par leur intensité, durée, période et fréquence, sur le rendement et la qualité grainière du colza ?
- Existe-t-il des protocoles thermo-sensibilisants indiquant un effet bénéfique de la mémoire du stress, avec ou sans implication du statut soufré du colza ?
- Les modèles de cultures sont-ils capables de rendre compte de l'effet des stress thermiques répétés au cours d'un cycle de culture sur le rendement et la qualité grainière du colza ?
- Quelles sont les voies d'amélioration des modèles et/ou les approches de modélisation à privilégier pour prédire les effets des stress thermiques répétés ?

Dans un contexte de réchauffement climatique, l'effet mémoire du stress pourrait être un levier à exploiter pour la résistance des cultures à des stress récurrents au cours du cycle et sur plusieurs des générations. **Le premier objectif** de cette thèse vise donc à évaluer en conditions contrôlées les effets de stress thermiques répétés s'approchant des conditions climatiques réalistes, c'est-à-dire une séquence constituée d'un stress modéré et des pics thermiques répétés de courte durée (quelques heures/jours) et ce en interaction avec des apports en S contrastés susceptibles de moduler les effets mémoires (Axe I). **Le second objectif** consiste à explorer différentes approches de modélisation pour mieux comprendre et prédire les effets des stress répétés sur le rendement et la qualité grainière du colza (Axe II). La réalisation de ces deux objectifs devrait permettre une meilleure compréhension des effets de stress thermiques répétés.

2.2. Axes de recherche et démarches associées

Pour répondre à la problématique et aux questions sous-jacentes, deux axes de recherche associant des approches expérimentales différentes ont été développés (Figure 16) : une **caractérisation écophysiologique (Axe I),** qui repose sur trois expériences *in planta* en conditions contrôlées ; et une exploration de **trois approches de modélisation numérique (Axe II)**. Ce sous-chapitre présente les démarches générales inhérentes à chacun des deux axes. Les protocoles des expérimentations sont détaillés dans chaque chapitre associé.

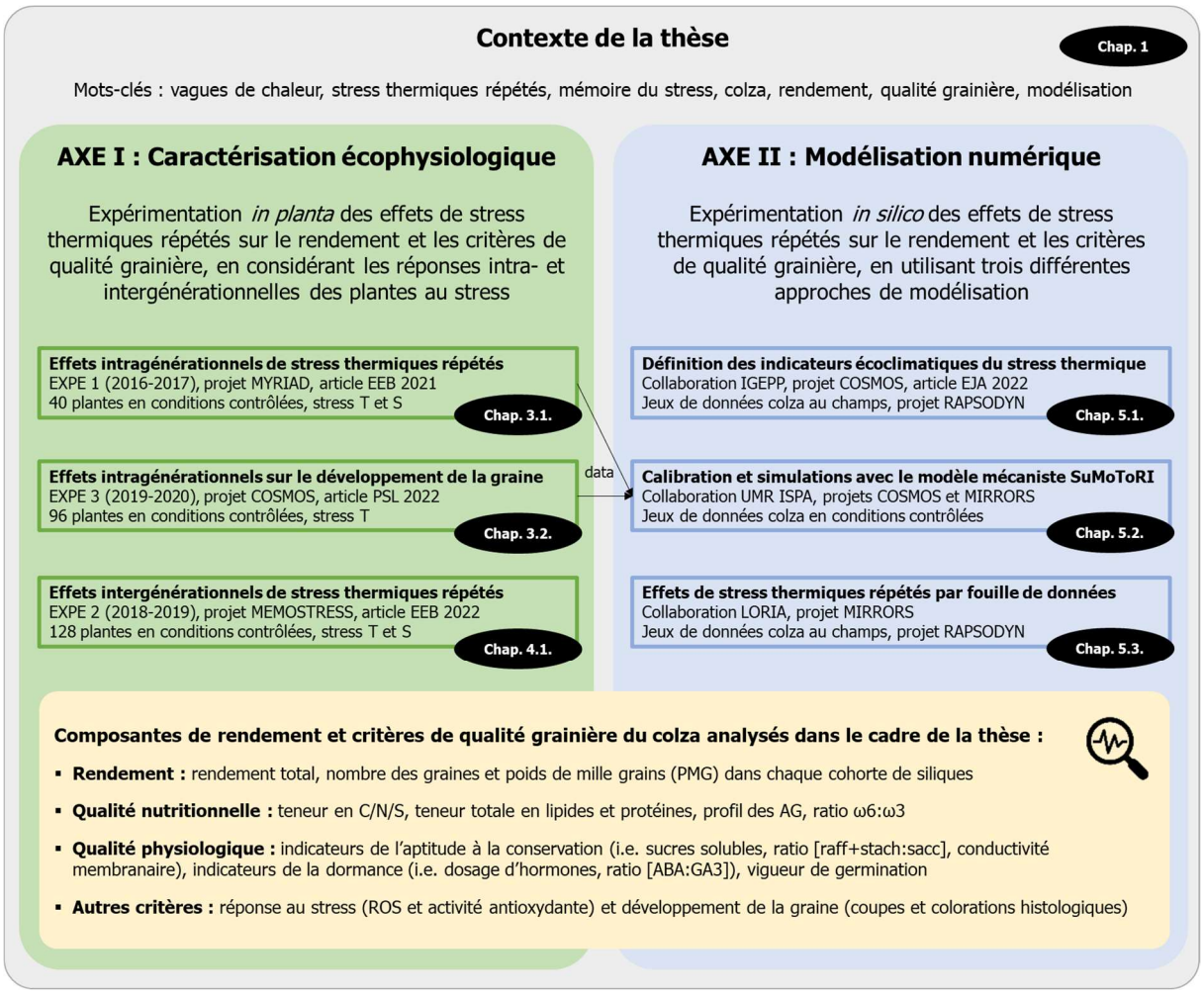


Figure 16 : Axes de recherche, démarches expérimentales et chapitres associées. Stress T : stress thermique ; stress S : stress soufre.

2.2.1. Axe I : Caractérisation écophysiologique

Cet axe de recherche vise à analyser l'effet mémoire des stress thermiques au cours du cycle de la culture (mémoire intragénérationnelle) et à la génération suivante de plantes stressées (mémoire intergénérationnelle). Pour cela, **trois cultures de colza en serre ont été réalisées selon des protocoles de stress thermique mimant des séquences des vagues de chaleur** réalistes dans un contexte de climat tempéré (Figure 16). Les mesures ont principalement concerné le rendement et la qualité des graines : nutritionnelle (teneurs en lipides, profils d'AG et teneurs en protéines) et physiologique (capacité de stockage, dormance et vigueur germinative).

Plusieurs **collaborations** ont été mises en place pour mener à bien les analyses, notamment avec le LEB Aquitaine Transfert (Bordeaux) pour les analyses de lipides, la Chonnam National University (Corée du Sud) pour les analyses d'hormones, le GEVES (Beaucouzé) pour les analyses de conductimétrie, le PUDC (Caen) pour des conseils sur la méthode d'analyses statistiques à deux facteurs et le CMABio3 (Caen) pour les coupes et colorations histologiques. Cet axe de recherche a été valorisé par la publication de trois articles dans les journaux internationaux (Magno et al., 2021, 2022a, 2022c), ainsi que plusieurs communications dans des congrès internationaux et nationaux (voir section « Liste des activités scientifiques »). Dans ce plan de recherche sont présentées des informations communes aux expérimentations *in planta*, les détails relatifs à chaque expérimentation sont donnés dans les Chapitres 3 et 4.

Protocole général de culture

Pour chacune des trois expériences *in planta*, des graines de *Brassica Napus* L. du cultivar Aviso ont été semées dans des terrines sur vermiculite en octobre de l'année correspondante, puis en novembre les plantules ont été repiquées dans des pots individuels de 2L contenant un mélange de perlite:vermiculite (2:1). Les plantules ont été alimentées par une solution de Hoagland ¼ classique pendant 7 semaines, avant d'être vernalisées pendant 12 semaines dans une chambre froide à 4-5 ºC avec une photopériode 16h/8h (jour/nuit) pendant lesquels les plantes ont reçu une solution de Hoagland ¼ sans N ni S. Cette étape de vernalisation est nécessaire pour les variétés d'hiver afin d'induire la floraison. Le protocole général de la culture du colza d'hiver, ainsi que la composition des solutions nutritives sont présentés dans les Annexes 2 et 3. À la fin de la vernalisation, les plantes ont été remises en serre en conditions de photopériode naturelle et ont reçu des apports manuels de N équivalents à 100 unités (U) sous forme de NH_4NO_3 et de S sous forme de $MgSO_4$ équivalents à 25U de SO_3 pour la condition limitante en S (Low Sulphur, LS) et à 75U de SO_3 pour la condition non limitante (High Sulphur, HS). Un second apport de 50U de N a eu lieu au stade boutons fermés (Annexe 4).

Distinction des cohortes de siliques

En raison de la croissance indéterminée du colza, la floraison et la formation des graines s'étalent sur plusieurs semaines et des siliques d'âges différents co-existent sur la plante (Diepenbrock and Geisler, 1979). Puisque l'objectif de la thèse était de cibler les impacts des stress thermiques répétés sur le rendement et la qualité grainière, il a été nécessaire de distinguer par étiquetage les siliques selon leur âge en amont de l'exposition aux protocoles de stress. Pour ceci, nous avons distingué **trois cohortes de siliques** : (i) les siliques dont la longueur était supérieure à 5 cm ($pods_{L>5cm}$) ; (ii) les siliques dont la longueur était inférieure à 5 cm ($pods_{L<5cm}$) ; et éventuellement (iii) les fleurs qui ont subi le stress thermique et sont devenues de jeunes siliques pendant ou après le stress thermique ($pods_{Flo}$, distingués uniquement dans la dernière expérience *in planta*). Cette distinction sur la longueur associée à une appréciation de l'aspect bosselé ont permis d'estimer l'état d'avancement dans la phase de maturation, tel que précisé dans les Chapitres 3 et 4. Pour ne pas mélanger les graines de différentes cohortes, dès le desséchement des siliques déhiscentes les ramifications ont été ensachées par des pochettes plastiques perforées, puis récoltées séparément.

Protocoles de stress thermique

L'exposition des plantes aux stress thermiques a débuté au stade GS72 (i.e. 20% des siliques ont atteint leur taille maximale, Lancashire et al., 1991) pour une durée maximale de 17 jours selon la modalité. En effet, selon la cohorte de siliques ciblée, cette période correspond au début du stade d'élongation des siliques au cours duquel l'embryon se développe et les composés de réserve des graines s'accumulent lors du remplissage et de la maturation des graines. La Figure 17 illustre les modalités thermiques appliquées lors des trois expérimentations. **Les modalités de stress thermique ont été retenues sur la base d'études précédentes** ayant utilisé des seuils de température similaires pour mimer un stress thermique modéré ou intense chez le colza en conditions contrôlées (Aksouh-Harradj et al., 2006; Aksouh et al., 2001; Huang et al., 2019; Mácová et al., 2022). Les combinaisons des stress thermiques (plus la condition contrôle) appliquées ont été les suivantes :

- CTL = **Control**, plantes exposées à des conditions naturelles pendant les 17 jours ;
- RSS = **Repeated Stress Sequence**, plantes exposées pendant 5 jours complets à un stress modéré, suivis de 5 jours en conditions naturelles puis de 7 jours à un stress modéré avec de pics de chaleur journaliers pendant 5 heures ;
- EMS = **Early Mild Stress**, plantes exposées pendant 5 jours complets à un stress modéré, suivis de 12 jours en conditions naturelles ;

- 4LHP = **4 Late Heat Peaks**, plantes exposées pendant 10 jours à des conditions naturelles, suivis de 7 jours sous stress modéré avec un pic de chaleur journalier appliqué pendant 5h durant 4 jours, comme pour la modalité RSS ; et
- 3LHP = **3 Late Heat Peaks**, plantes exposées pendant 14 jours à des conditions naturelles, suivis de 3 jours sous stress modéré avec un pic de chaleur pendant 5h.

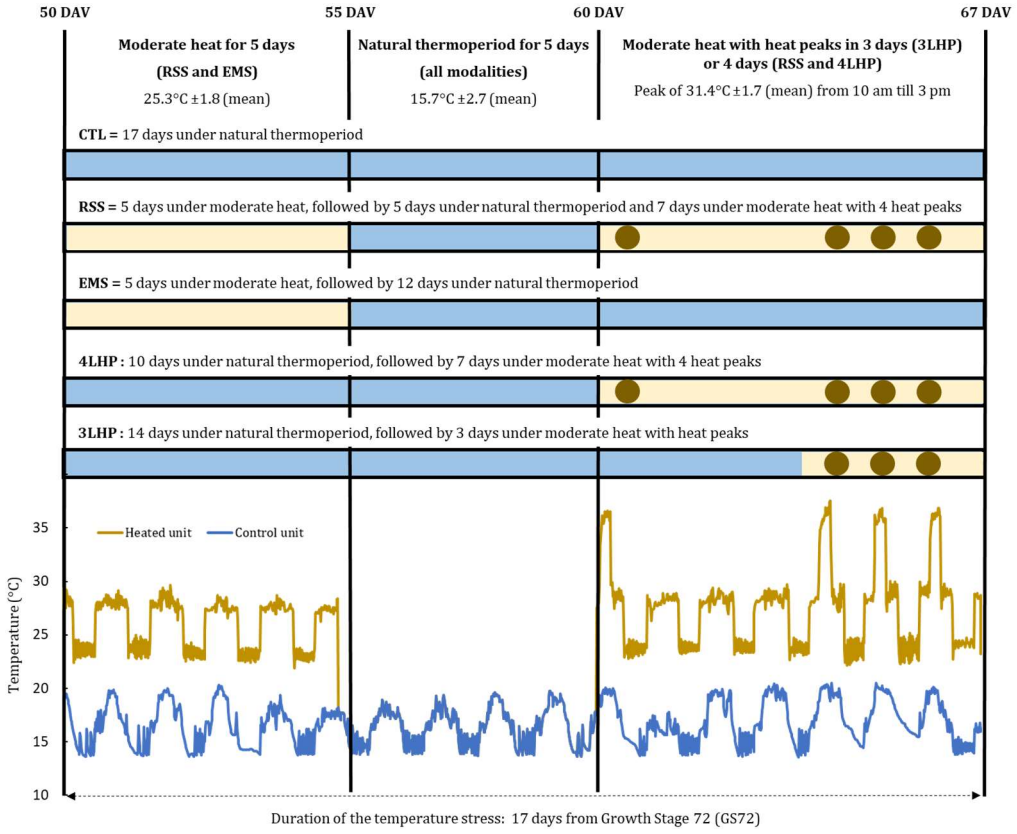


Figure 17 : Illustration des quatre modalités de stress thermique appliquées en conditions contrôlées. DAV: days after vernalization; CTL: control; RSS: repeated stress sequence; EMS: early mild stress; 4LHP: 4 late heat peaks; 3LHP: 3 late heat peaks.

Pour chaque modalité de stress thermique, quatre plantes (n=4) ont été cultivées dans la même chapelle de la serre sous conditions naturelles et transférée quand nécessaire dans une autre chapelle, où les conditions de température élevée (stress modéré ou pics de chaleur) ont été appliquées selon la modalité (Figure 17). La liste des différentes mesures et analyses réalisées dans les graines récoltées à maturité ou au cours de développement dans ces expérimentations sont présentées dans la Figure 16. Le protocole détaillé des analyses biochimiques est présenté sous forme d'articles publiés dans les Chapitres 3 et 4.

2.2.2. Axe II : Modélisation numérique

Cet axe de recherche vise à explorer différentes approches de modélisation pour améliorer les prédictions des performances des cultures, en considérant notamment les effets de la répétition des stress thermiques. L'objectif central des expérimentations numériques pendant la thèse a été de mieux prédire les performances du colza, qui englobent le rendement et les divers critères de qualité grainière, dans un contexte de réchauffement climatique qui se caractérise par une fréquence accrue des vagues de chaleur, exposant ainsi les plantes à des stress thermiques répétés. Sur la base des travaux ayant identifié des réponses spécifiques à des stress répétés, cet objectif suppose que les modèles de culture ont été conceptualisés jusqu'à présent pour suivre et prévoir la réponse des cultures à des contraintes climatiques qui ont évolué et qui évoluent. Par conséquent, **les approches de modélisation doivent s'adapter à ces nouveaux contextes climatiques pour prévoir avec fiabilité**.

Dans un premier temps, nous avons construit des **indicateurs écoclimatiques** basés sur des jeux de données du colza au champs (projet RAPSODYN), dans l'objectif de fournir des informations sur les interactions entre les stress arrivant à différentes périodes du cycle de culture, ceci pour mettre en évidence d'éventuels effets mémoire. En parallèle, **le modèle écophysiologique (semi-) mécaniste SuMoToRI** a été utilisé pour (i) étendre la phase de prédiction du modèle jusqu'au rendement en siliques et (ii) tester les différents scenarii de stress répétés des expérimentations *in planta* pour évaluer le comportement prédictif du modèle et identifier des pistes d'amélioration. Enfin, nous avons testé des **méthodes de fouille de données** sans *a priori*, dans l'optique de trouver des relations ou des motifs potentiellement utiles pour la compréhension des effets des stress répétés sur les végétaux. Dans ce plan de recherche sont présentés des informations générales sur la démarche expérimentale des approches de modélisation numérique. Les détails de chacune des trois approches de modélisation est présenté dans le Chapitre 5.

Plusieurs collaborations ont été mises en place dans cet axe de recherche, notamment avec l'UMR ISPA (Bordeaux) pour le développement du modèle SuMoToRI, l'UMR IGEPP (Le Rheu) pour l'acquisition des jeux de données et le LORIA (Nancy) pour l'exploration de méthodes de fouille de données (i.e. CFCA et biclustering). Cet axe de recherche a été valorisé par la publication d'un article scientifique dans un journal international à comité de lecture (Magno et al., 2022b), ainsi qu'une communication orale et deux posters dans des congrès internationaux et nationaux (voir section « Liste des activités scientifiques »).

Description du réseau expérimental du projet RAPSODYN

Les approches de modélisation empiriques et de fouille de données (i.e. Chapitres 5.1 et 5.3) ont reposé sur la **définition d'indicateurs écoclimatiques à partir des jeux de données acquis du projet RAPSODYN**. Ce projet a duré 7.5 ans (2012-2019) et avait pour ambition d'assurer la compétitivité à long terme de la production de colza en France, dans un contexte de réduction des intrants azotés. Ce projet a associé 16 partenaires français, regroupant des laboratoires de recherche publique, des entreprises privées de biotechnologie et de sélection, et un institut technique, afin de représenter les principaux acteurs majeurs de la filière colza en France (Rapsodyn, 2022). Le projet a été en partie financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) dans le cadre du programme français "Investissements d'Avenir".

A l'origine, ce réseau expérimental était constitué de 32 **« environnements », définis comme des combinaisons de type « lieu de culture × année de récolte »** (Corlouer et al., 2019). Les localisations des expérimentations ont été réparties sur l'ensemble du territoire français (Figure 18a) afin de représenter de différentes zones climatiques de production du colza en France (Figure 18b). Dans chaque « environnement », des expérimentations au champs ont été menées entre 2011 et 2018 en suivant un itinéraire technique commun et des conditions de fertilisation azotée variant selon les objectifs du projet. Dans le cadre de cette thèse, seulement les expérimentations conduites sous conditions optimales de nutrition azotée ont été considérées, dans l'objectif d'isoler au maximum les effets des stress thermiques répétés. Il est important de souligner que les génotypes Aviso et Montego sont communs à l'ensemble des expérimentations. Sachant que ces génotypes se situent dans la moyenne des génotypes de colza, ils ont été considérés comme « témoins » du comportement du colza au champ. En effet, ils sont contrastés principalement pour leur précocité de floraison (Montego étant le génotype le plus précoce), particularité qui a été prise en compte au moment de la définition des indicateurs écoclimatiques.

Des données climatiques journalières ont été nécessaires pour **définir ces indicateurs sur des périodes spécifiques de croissance exprimées en somme de temps thermique, appelées alors indicateurs écoclimatiques** (Caubel et al., 2015). La méthode utilisée pour définir ces indicateurs écoclimatiques, ainsi que la suite des analyses réalisées dans l'objectif de comprendre les relations entre ces indicateurs et les variables de performance de plantes (i.e. composantes de rendement, teneurs en lipides et protéines) sont expliquées sous forme d'un article publié dans le Chapitre 5.1.

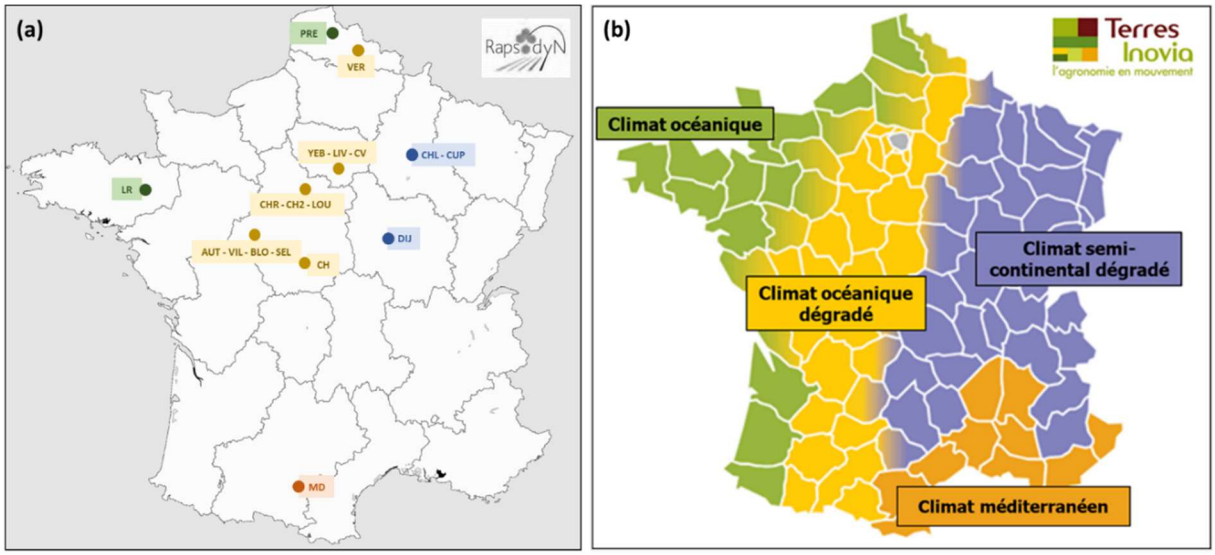
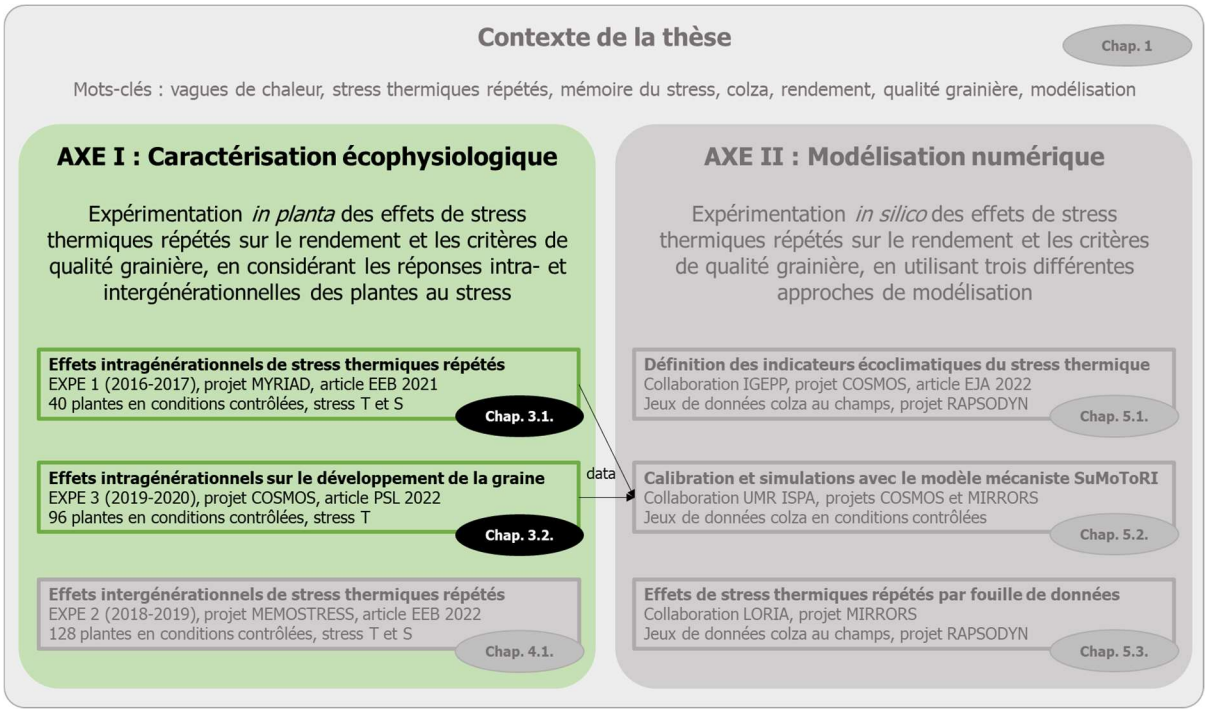


Figure 18 : Informations utilisées pour la définition des indicateurs écoclimatiques : (a) localisation géographique approximative des expérimentations au champs conduites dans le cadre du projet RAPSODYN (Corlouer et al., 2019) et (b) répartition de la France dans quatre zones climatiques majeures d'implantation du colza (Terres Inovia, 2019).

Chapitre 3 :
Effets des stress répétés au cours d'un cycle de culture



3.1. Effets des stress thermiques répétés sur le rendement et la qualité grainière du colza, dans des conditions contrastées d'apport en soufre

3.1.1. Préambule

Ce chapitre présente les résultats obtenus suite à l'Expérimentation 1 (EXPE 1, 2016-2017, projet MYRIAD). Une culture de plantes de colza d'hiver sous différentes modalités de stress thermique et deux apports contrastés en soufre (High Sulphur [HS] et Low Sulphur [LS]) a été réalisée en conditions contrôlées, pour l'analyse du rendement et de la qualité grainière à maturité. Les graines utilisées pour cette culture proviennent du centre de ressources biologiques BrACySol (Brassica-Allium-Cynara-Solanum), sous la supervision du centre INRAE de Rennes. Il s'agit donc de l'expérimentation dédiée à l'analyse de l'effet des stress thermiques répétés au cours d'un cycle de culture du colza (i.e. mémoire intragénérationnelle). Les analyses biochimiques et l'acquisition des données ont été réalisées lors de mon stage de fin d'études en 2018, tandis que le traitement statistique des résultats et la rédaction d'un article scientifique (Magno et al., 2021) ont été réalisés pendant la thèse. Les données supplémentaires de cet article (i.e. Supplemental Data) sont présentées dans l'Annexe 5.

Article Magno et al, 2021 EEB : principaux résultats

- La fréquence accrue des épisodes de stress thermique conduit à reconsidérer les effets de la température sur le rendement et la qualité des graines, au regard des effets des stress thermiques répétés.

- L'exposition aux stress thermiques pendant la floraison et/ou les phases précoces de développement des graines impacte le rendement (i.e. nombre et/ou poids des graines).

- Plus la durée de la période de stress thermique est longue, plus les critères de qualité sont affectés négativement avec une diminution de la teneur en acides gras, une augmentation du ratio ω6:ω3, une dégradation de l'intégrité membranaire et une augmentation de la dormance des graines présentes sur la plante lors de l'exposition au stress.

- Un stress modéré et précoce peut atténuer les effets négatifs des pics de chaleur tardifs sur la teneur en azote des graines, la tolérance à la dessiccation et les phytohormones impliquées dans la thermoinhibition. L'impact positif de la limitation en soufre sur le renforcement de la réponse oxydative a été annulé lors des pics de chaleur tardifs.

- Les protocoles de thermosensibilisation pour le colza doivent tenir compte à la fois des caractéristiques de l'événement thermique, mais aussi d'un apport adéquat en soufre, puisque les deux stress interagissent (atténuation ou amplification des effets).

Environmental and Experimental Botany 185 (2021) 104400

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental and Experimental Botany

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envexpbot

High temperature patterns at the onset of seed maturation determine seed yield and quality in oilseed rape (*Brassica napus* L.) in relation to sulphur nutrition

Lethicia Magno Massuia de Almeida [a,*], Jean-Christophe Avice [a], Annette Morvan-Bertrand [a], Marie-Hélène Wagner [b], María Reyes González-Centeno [c,d], Pierre-Louis Teissedre [c,d], Jean-Jacques Bessoule [e], Marina Le Guédard [e,f], Tae Hwan Kim [a,g], Alain Mollier [h], Sophie Brunel-Muguet [a]

[a] Normandie Université, UNICAEN, INRAE, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions N, C, S, SFR Normandie Végétal (FED 4277), Esplanade de la Paix, CS14032, 14032, Caen Cedex 5, France
[b] Station Nationale d'Essais de Semences, GEVES, 49071, Beaucouzé, France
[c] Université de Bordeaux, Unité de Recherche Œnologie, EA 4577, ISVV, 33882, Villenave d'Ornon, France
[d] INRAE, USC 1366 Œnologie, ISVV, 33882, Villenave d'Ornon, France
[e] Univ. Bordeaux, CNRS, Laboratoire de Biogenèse Membranaire (LBM), UMR 5200, 71, Avenue Edouard Bourlaux, 33883, Villenave d'Ornon Cedex, France
[f] LEB Aquitaine Transfert-ADERA, 71, Avenue Edouard Bourlaux, 33883, Villenave d'Ornon Cedex, France
[g] Division of Animal Science, Institute of Agricultural Science and Technology, College of Agriculture & Life Science, Chonnam National University, Gwangju, 61186, Korea
[h] ISPA, Bordeaux Sciences Agro, INRAE, F-33140, Villenave d'Ornon, France

High temperatures during the crop reproductive stage impact seed yield and quality. The changing climate will require consideration of the effects of high temperature events that differ from their intensity, their duration and their frequency over the seed quality-building stages. The impact of these features deserves to be investigated at the light of induced thermo-sensitization which can lead to alleviate expected negative impacts. In our work, maturing seeds of the sulphur-demanding crop, oilseed rape, were exposed to several temperature sequences that varied in intensity, duration and frequency at the onset of seed maturation. Results-measured in seeds that were at the onset of maturation when the temperature stress occurred-indicated that (i) the longer the cumulated duration of the temperature stress, the more negatively impacted the quality criteria with decreased fatty acids (FAs) concentration, increased ω6:ω3 ratio, lower seed membrane integrity and increased seed dormancy and (ii) a mild stress event prior to heat peaks had an alleviating effect on the negative impact of the later heat peaks (priming effect) on seed nitrogen, desiccation tolerance and the phytohormones involved in thermoinhibition. Sulphur restriction was positive on FAs, protein concentration and negative on breaking dormancy. In addition, sulphur supply interfered with temperature modality, features such that positive impact of sulphur limitation on boosting oxidative response were cancelled with intense late heat peaks. This work provides insights to define thermopriming protocols in relation to the timing of quality building processes, their respective optimal temperature and adequate sulphur supply.

Keywords: oilseed rape, seed quality, high temperature, sulphur, repeated stresses, priming, stress memory, thermotolerance.

3.1.2. Introduction

Evidence for increased frequency of stress events such as heat waves has been observed over recent decades. Based on the last Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) report (Hoegh-Guldberg et al., 2018), heat waves are expected to become more frequent, to last longer and to increase in intensity during the reproductive phase of economically important crops (Christidis et al., 2015; Trnka et al., 2014). These new climatic patterns have led to attempts to decipher crop behavior and final performance in the light of recurring stresses. While the effects of extreme/mild environmental stresses have been widely investigated from molecular to whole plant levels (Kotak et al., 2007; Ohama et al., 2016; Wahid et al., 2007), far fewer studies have tackled the issue of understanding the effects of their recurrence throughout the crop season. Indeed, the overall magnitude of the plant response to successive stresses might not match the effects induced by individual stressing events because (i) the first stress triggers physiological and metabolic adjustments that bring the plant to a modified status (including phenology) when the stress recurs, which leads to different responses to the second stress and (ii) a mild stress prior to further similar stresses can induce stress memory that lasts the duration of the crop season (i.e. intra-generational memory, Ding et al., 2012) and is sometimes transmitted to offspring (i.e. transgenerational memory, Bruce et al., 2007; Crisp et al., 2016; Hatzig et al., 2018; Kinoshita and Seki, 2014; Kumar, 2018; Molinier et al., 2006; Wang et al., 2016). Stress memory is defined as the process of storage and retrieval of information acquired during an initial exposure to stress (Crisp et al., 2016). This information acts as a priming process with beneficial effects when the stress recurs and it can lead to earlier, more rapid, intense, and sensitive responses that help plants to acclimate in changing environments (Kinoshita and Seki, 2014). Underlying mechanisms include epigenetic regulation, transcriptional priming, primed conformation of proteins, and/or specific hormonal or metabolic signatures (Groot et al., 2016; Hatzig et al., 2018; Molinier et al., 2006; Wang et al., 2016). This means that as the climate changes, the effects of repeated stresses should be harnessed as a crop improvement strategy because this approach has promise for inducing acclimation to heat stress (Wang et al., 2017b).

In winter oleaginous crops, the reproductive phase occurs during spring, which might expose flowering, grain filling and grain maturation to high temperature events. Due to its indeterminate growth, winter oilseed rape plants display flowers and growing pods in different proportions throughout the reproductive phase. Consequently, heat stress can impact reproductive organs by limiting number and size, which in turn leads modification to carbon (C) partitioning in favor of already developed organs that have passed the sensitive stage, and

this makes analysis of the direct effects of heat stress on the organs more complex (Guilioni et al., 1997). While heat stress at flowering limits pollination (Sage et al., 2015) and/or induces early pod abortion resulting in yield losses in oilseed rape (Morrison and Stewart, 2002; Young et al., 2004), heat stress that occurs during seed filling and maturation affects seed storage compounds quantitatively and qualitatively, leading to seed quality alteration. Few studies have reported the effects on seed quality in oilseed rape of repeated heat stress events that might be erratic and fluctuate as predicted in climate change models in field conditions (Deng & Scarth 1998; Baux et al. 2013).

Seed quality encompasses a range of criteria related to nutritional and physiological characteristics (i.e. germination behaviors and storage capacity). In winter oilseed rape, oil content, fatty acid (FA) profiles, and protein content are major nutritional criteria for edible oil and cakes used in human and animal consumption, respectively. Its oil contains higher unsaturated FA (UFA) content than other oil crops (sunflower, soybean), which makes it a healthy edible oil for human consumption (Aguirrezábal et al., 2015). Contrasting variations have been observed in oil content according to the temperature intensity, to the timing of stress exposure and to the pools of seeds analyzed (main stem vs. bulk) (e.g. increased in Brunel-Muguet et al., 2015b; decreased in Canvin, 1965; Aksouh et al., 2001; Aksouh-Harradj et al., 2006). High temperatures are known to induce decreases in poly-UFAs in favor of saturated FAs (SFA, mainly C16:0 and C18:0) and mono-UFAs, and increases in the ω6:ω3 ratio (i.e. C18:2/C18:3 ratio), as a result of temperature-triggered impairment of desaturase enzyme activity i.e. oleic and linoleic desaturases (Aksouh-Harradj et al., 2006; Baux et al., 2008, 2013; Brunel-Muguet et al., 2015b; Gauthier et al., 2017; Schulte et al., 2013). By contrast, seed nitrogen (N) and protein concentrations in the oil-free meal is usually negatively correlated with total oil content (Aksouh-Harradj et al., 2006; Aksouh et al., 2001) as observed in other oil crops (in soybean, N concentration Chebrolu et al., 2016); protein concentration, Dornbos & Mullen, 1992). Additionally, other seed characteristics related to physiological quality, i.e. seed storage capacity and germination behavior, were investigated but not to any great extent (Brunel-Muguet et al., 2015b). A drastic degradation of seed storage capacity has been observed using seed conductivity and the ratio of soluble sugars ([stachyose and raffinose]:sucrose), abscisic acid (ABA) and gibberellic acid (GA3) as proxies (Bailly et al., 2001; Brunel-Muguet et al., 2015b) in seeds from long-term heat-stressed mother plants. Other phytohormones were shown to be involved in the control of secondary dormancy, defined as failure in the germination process of mature and non-dormant seeds under adverse conditions (Pekrun et al., 1997). Recent studies have highlighted the role of indole-3-acetic acid (IAA), whose concentrations increase in dormancy-induced seeds (Liu et al., 2019b; Shu

et al., 2016; Tuan et al., 2019). Although several studies have reported that salicylic acid (SA) enhanced germination in *Arabidopsis* seeds by reducing oxidative damage (Chitnis et al., 2014; Lee and Park, 2010) and inhibited germination because of higher oxidative stress (Xie et al., 2007).

In Brassica species, sulphur (S) nutrition determines yield components and seed quality because of their high S requirements throughout the crop cycle (Brunel-Muguet et al., 2015b; D'Hooghe et al., 2014). In addition to its well-known implication in the synthesis and signaling of stress tolerance-controlling phytohormones (Hasanuzzaman et al., 2018), S might be involved in the acquisition of thermotolerance mediated by epigenetic regulation (Bokszczanin et al., 2013). This is based on evidence for sulphur involvement in DNA methylation (through the role of S-adenosylmethionine as a donor of methyl groups, Meng et al. 2018), one of the key epigenetic markers that supports stress memory, thus making the analysis of S supply relevant in the context of epigenetic memory.

In our study we focused on the effects of high spring temperatures on seeds at the onset of maturation to deepen our knowledge of this seed quality-determining stage in relation to sulpur nutrition. Our assumptions were that the effects of high temperature at advanced seed filling can greatly vary depending on whether plants are exposed to a mild heat stress event that primes them to withstand later heat peaks and that sulphur nutrition might impact the ability of the plants to endure heat stress. Overall, our experimental design addresses the following questions: (i) what are the quantitative effects of different high temperature sequences applied at advanced seed filling/onset of seed maturation on seed yield, quality criteria and stress response indicators? (ii) is there any beneficial effect from a mild stress event that occurs prior to later repeated intense heat peaks? (iii) to what extent do the effects of successive high temperature events applied to maturing pods differ from the effect of individual events? (iv) what are the underlying defense pathways triggered by temperature stress? and (v) how does sulphur nutrition impact heat stress responses through acquisition of thermotolerance?

3.1.3. Materials and methods

Experimental treatments and growth conditions

Seeds of Brassica napus L. (cv. Aviso) were germinated in vermiculite in October 2016 under greenhouse conditions. After five weeks the seedlings were transplanted into pots containing perlite and vermiculite (2:1, v/v) for seven weeks and seedlings were grown as described in

Poisson et al. (2019). Afterwards, seedlings were subjected to a 12-week period of vernalization in a cold chamber (standard model, Froid & Mesures, Beaucouzé, France) maintained at 4°C (night) and 8°C (day) with artificial light during the day (10h day/14h night) and supplied with a 25% Hoagland solution without sulphur, to prevent the plants from building substantial S reserves which would later impact their nutritional status when applying the contrasting sulphur supplies. Then, the plants were transferred into the greenhouse (Caen, France, 49°11'09 N, 0°21'32 W) and subjected to a thermoperiod of 20°C (day) and 15°C (night) without additional light. The plants were manually provided with two N applications with an NH4NO3 solution: 100 kg N/ha at the end of vernalization (Growing Stage 30 (GS30), stem elongation, Lancashire et al., 1991) and 50 kg N/ha at early flowering (GS60, bud formation) assuming a plant density of 40 plants.m-2. The two contrasting S supplies i.e. High Sulphur and Low Sulphur were manually applied at the end of vernalization (GS30) as usually provided in the field. Plants were supplied with a solution of MgSO4 containing 75 kg SO3/ha (High Sulphur) and 25 kg SO3/ha (Low Sulphur), which represent, respectively, 100 % and 33 % of the conventional supply.

Four temperature modalities (Temp-modalities) were applied to plants at stage GS72 (i.e. 20 % of the pods having reached their maximum size) for 17 days. The Temp-modalities were designed to assess the effects of a mild temperature event prior to a more intense temperature event including daily heat peaks (Figure 1 (Chap. 3.1.)). In our complete design, we tested five Temp-modalities which included a Temp-control modality that is natural thermoperiod conditions in the greenhouse (Figure 1a (Chap. 3.1.)). The other four Temp-modalities were the following: (i) the early mild stress modality (Figure 1b (Chap. 3.1.)) composed of 5 early full days under mild warming [i.e. 25.3°C ±1.8 (day, 16h) /21.7°C ± 0.7 (night, 8h)] and followed by 12 days under natural thermoperiod (mean, maximum and minimum temperatures over the natural thermoperiod being 15.7°C ±2.7, 28.4°C and 11.5°C, respectively), (ii) the 3 late heat peaks modality composed of 14 days under natural thermoperiod followed by 3 days under mild warming with a daily heat peak applied for 5 h (i.e. 31.4°C ±1.7 between 11 a.m. till 4 p.m., Figure 1c (Chap. 3.1.)), (iii) the 4 late heat peaks modality composed of 10 days under natural thermoperiod followed by 7 days under mild warming with daily heat peaks on 4 days (Figure 1d (Chap. 3.1.)), and (iv) the priming modality composed of 5 days under mild warming followed by 5 days under natural thermoperiod and eventually 7 days under mild warming with daily heat peaks on 4 days (Figure 1e (Chap. 3.1.)).

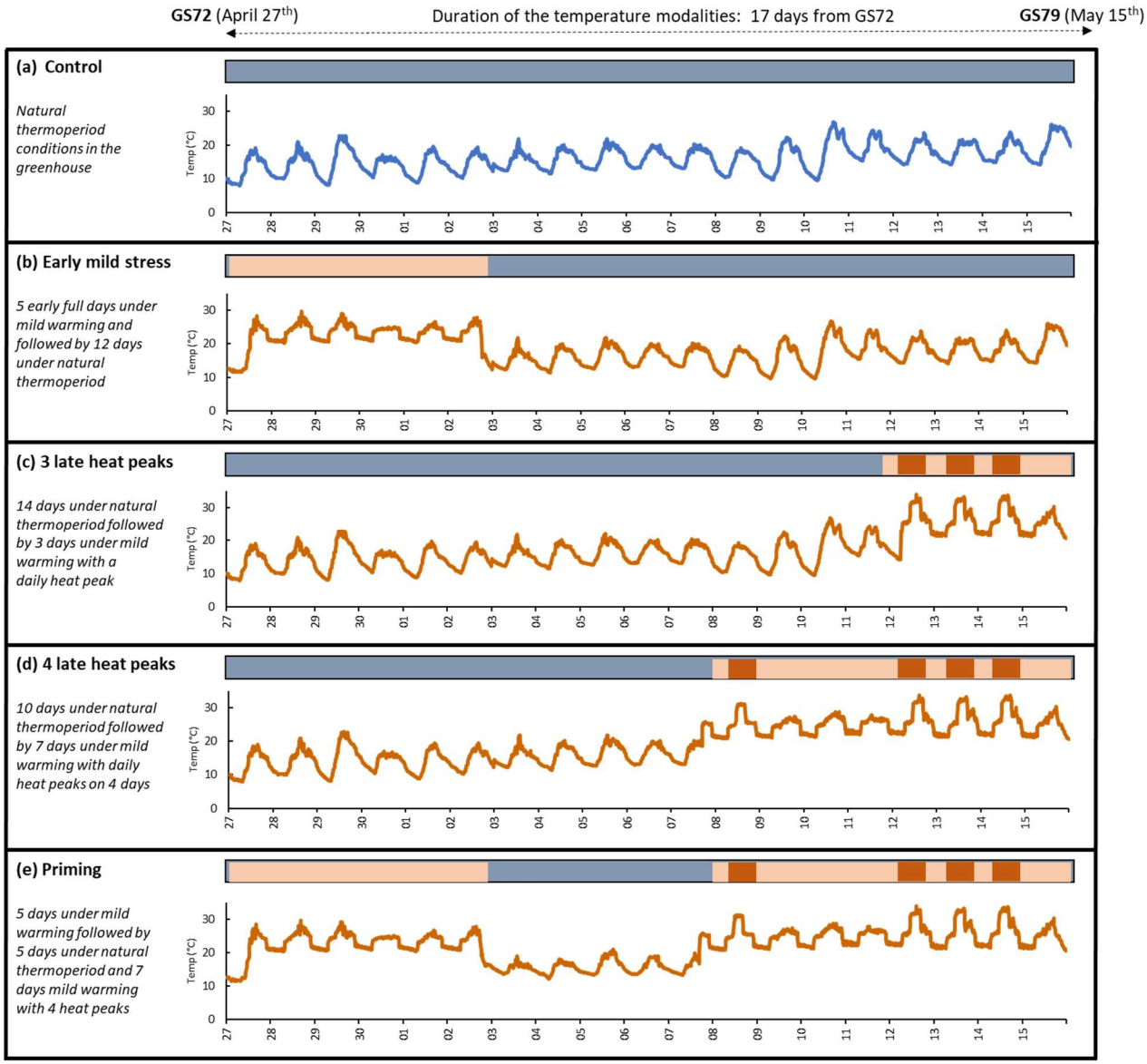


Figure 1 (Chap. 3.1.) : Schematic of the experimental design and recordings of hourly temperatures in the greenhouse for each temperature modality (Temp-modality). Four different temperature protocols and the Temp-control were applied under High Sulphur and Low Sulphur conditions (10 treatments in total). Graphics are organized by level of sequence complexity: (a) control modality, (b) early mild stress modality, (c) 3 late heat peaks, (d) 4 late heat peaks and (e) priming modality.

For each temperature modality and sulphur condition, four replicates were grown (i.e. 40 plants in total) in the greenhouse under natural thermoperiod and transferred when required in a separate greenhouse unit, where the higher temperature conditions (mild warming and heat peaks) were applied and monitored, according to the experimental design (Figure 1 (Chap. 3.1.)). The temperature intensities were chosen according to previous studies that used

similar ranges to mimic mild and intense temperature treatments under controlled conditions (Aksouh-Harradj et al., 2006). Temperatures were recorded hourly with temperature probes (105T Campbell, Campbell Scientific Ltd., Leicestershire, UK). Throughout the 17 days, the incident Photosynthetically Active Radiation (PARi) values was recorded (every 15 min) in the greenhouse and processed to calculate the daily PARi values (Supplemental Data, Table S1 (Chap. 3.1.)). No substantial difference in daily PARi were observed between the greenhouse units with the natural thermoperiod conditions and the higher temperature conditions (mild warming and heat peaks). Because mixed-age pods were present throughout the temperature sequences, on the day before the beginning of the temperature modalities exposure we have labeled each branch of the plants to identify the two categories of pods: (i) pods whose length was above 5 cm ($pods_{L\geq5cm}$) and (ii) pods whose length was shorter than 5 cm ($pods_{L<5cm}$). Indeed, preliminary experiments (Supplemental Data, Table S2 (Chap. 3.1.)) indicated that $pods_{L\geq5cm}$ (or longer) contain seeds that have reached at least half their final fresh weight (about 55%), which coincides with advanced seed-filling development and the onset of seed maturation (Borisjuk et al., 2013). When the pods started desiccating, they were carefully and individually wrapped with plastic pouches to avoid seed dispersal and the mixing of seeds between the pod categories.

Seed yield and components

At maturity, the seeds from the two categories of pods were weighed after freeze-drying for dry weight (DW) measurements. To determine the individual seed weight (Thousand Seed Weight, TSW), we weighed and photographed seeds from both pod categories so as to score their number using image analysis algorithms (ImageJ Software, Schindelin et al., 2012).

Biochemical characteristics of seeds from $pods_{L\geq5cm}$

In the following sections, biochemical characteristics of each individual plant (n=4, and n=3 only for hormones) were measured solely on seeds from $pods_{L\geq5cm}$.

- *Seed carbon, nitrogen and sulphur concentrations*

Seeds of each individual plant were pooled and dried for 48h at 50°C. The dried seeds were ground manually and the resulting powder (around 3 mg per sample) was placed into tin capsules for analysis. The percentage of total carbon, nitrogen, and sulphur per mg DW of the seeds were determined with a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy) linked to a continuous flow isotope mass spectrometer (IRMS, Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK).

- *Seed fatty acid concentration*

Oil and fatty acid profile contents (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C20:1 and C22:1) were determined as described in Marchand et al. (2016). Approximately 200 mg of seeds from each plant were suspended in 1 mL of methanol/toluene/H2SO4 solution (100:20:2.5; v/v) containing C17:0 as internal standard (5 µg mL−1), overnight at 85◦C for transmethylation. After cooling, 500 µL of hexane was added and the hexane phase containing the resulting fatty acid methyl esters (FAMES) was recovered for gas chromatography analysis combined with flame ionization detection (GC-FID). The FAMES (1 µL) were injected into an Agilent 7890 gas chromatograph equipped with a Carbowax column (15 m by 0.53 mm, 1.2 m) (Alltech Associates, Deerfield, IL) and FID system. FAMES were identified by comparing their retention times with those of commercial standards (Sigma, St. Louis, MO) and quantified using ChemStation (Agilent) to calculate the peak areas.

- *Seed storage protein concentration*

Approximately 20 g of ground seeds from plants of each treatment was previously stored at -20 ºC. Protein analysis was performed in two steps: (i) protein extraction and (ii) the Bradford assay. The Bradford assay is based on the use of a standard range with several dilutions of the reference protein (Bovine Serum Albumin, BSA). Thus, after dilution (by 10) the samples were placed in a microplate and the measure is made at 570 nm after addition of the Bradford reagent. The calibration straight line allowed the total protein concentrations to be calculated by considering the mass and volume of the sample. The detailed steps for extraction and the Bradford assays are described for leaves in Akmouche et al. (2019).

- *Seed soluble sugar concentrations*

Soluble sugars were extracted from 50 mg lyophilized and ground seeds, with 1 mL methanol/water (80:20, v/v) and 40 µL melicitose used as the internal sugar standard. Glucose, fructose, sucrose, raffinose, and stachyose contents were quantified using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) on a cation exchange column (Sugar-PAK, 300 x 6.5 mm, Millipore Waters, Milford, MA, USA) eluted at 0.5 mL min^{-1} and 85 °C with 0.1 mM Ca-EDTA in water and quantified using a refractive index detector (2410 Differential Refractometer, Millipore Waters, Waters Corporation, MA, USA), according to Brunel-Muguet et al. (2015b). The [raffinose+stachyose]:sucrose ratio was used as an indicator of seed drying tolerance i.e. the higher the value, the more tolerant the seed is to desiccation (Bailly et al., 2001).

- *Analysis of stress signaling and seed dormancy-related phytohormones*

For each treatment, 50 mg of ground seeds were used to quantify 2-cis, 4-trans-abscisic acid, gibberellic acid, indole-3-acetic acid and salicylic acid. Previously freeze-dried samples were mixed with 500 µL of extraction solvent [2-propanol/H2O/ concentrated HCl (2:1:0.002, v/v/v)] and then analyzed by HPLC-MS as described in (Pan et al., 2010). Because the dynamics of ABA and GA3 controls the balance between dormancy and germination, the ABA:GA3 ratio was used as a proxy for seed dormancy under stress condition (Debeaujon and Koornneef, 2000; Finkelstein, 2013).

- *Seed conductivity measurements*

Conductivity measurements were performed according to Brunel-Muguet et al. (2015b). For each treatment, measurements with the electrolytes were made with 20 pre-weighed seeds. At room temperature (20ºC), the seeds were placed in 5 mL of ultrapure water for 16 h. Conductivity was measured with a portable electrochemical analyzer (Consort C931, UK).

- *Determination of seed total phenolic content and antioxidant capacity*

Prior to the extraction, seeds from plants of each treatment were oven-dried at 60ºC for at least 48 hours and then ground. The extraction procedure was adapted from (Szydłowska-Czerniak et al. (2010) in terms of solvent, extraction time and sample:solvent ratio. Seeds were extracted with methanol:H2O (50:50, v/v) at a ratio of 20:1 (mg/mL) by using mechanical stirring for 1 h at 25 ºC. Total phenolic content was spectrophotometrically determined with a modified Folin-Ciocalteu method (González-Centeno et al., 2015) and was expressed as the mean of six determinations of sinapic acid in mg equivalents per DW g of seeds. To measure the antioxidant capacity, seed extracts were diluted at a ratio 1/4 with methanol:H2O (50:50, v/v) according to the methodology previously described by González-Centeno et al. (2012). ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] assay values were expressed as mg of Trolox equivalent antioxidant capacity per g of seeds DW.

Statistical analysis

Two-way ANOVAs to test temperature (Temp) stress and S nutrition effects, both considered as independent factors, were performed on the measured variables. The Temp-modalities, sulphur condition and Temp x Sulphur interaction effects were analyzed using R software (version 4.0.2, R Core Team, 2020). Prior to the ANOVAs, residues independency and normality, and homogeneity of variances were previously tested (Dubin-Watson, Shapiro-Wilk, Bartlett and Levene tests respectively). ANOVAs tables presented the means for each Temp-

modality (gathering the values of both sulphur supplies) and for each sulphur supplies (gathering the values of the five Temp-conditions including the Temp-control, Tables 1, 2 and 3 (Chap. 3.1.)). Mean comparison tests were performed differently according to whether interaction effects were detected or not. When no interaction effects were observed, Tukey tests were performed amongst the five temperature modalities (Tables 1, 2 and 3 (Chap. 3.1.)). Otherwise, when interaction effects were observed, comparison amongst the 10 treatments (crossing the five temperature modalities and the two sulphur conditions) were performed as one-way ANOVA and considering 10 independent treatments for the Tukey tests (Figures 2, 3 and 4 (Chap. 3.1.)). The last table in Supplemental Data (Table S3 (Chap. 3.1.)) summarizes the mean ± se of the all measured variables for each of the 10 treatments in order to provide reference values in a given combination "sulphur supply/temperature modality".

3.1.4. Results

Plant growth and yield components

Table 1 (Chap. 3.1.) displays yield and yield components i.e. seed number and TSW for the overall seeds (Total) and the two categories of seeds collected separately (from $pods_{L\geq5cm}$ and $pods_{L<5cm}$). No significant Temp x Sulphur interaction effect was observed for any of the yield related-measured variables. The total seed yield (including seeds from both categories of pods) ranged from 8.2 to 9.8 g $plant^{-1}$, with no significant sulphur effect. Decreases in the total seed yield were observed for all the four Temp-modalities, being significant only in the priming modality (-16.3 % relative to Temp-control). These decreases were due mostly to the seed yield from $pods_{L<5cm}$, (though not significant) since seed yield from $pods_{L\geq5cm}$ remained almost unchanged compared to the Temp-control plants. The total seed numbers were not impacted by the Temp-modality but a slight sulphur effect was observed ($p<0.05$), with Low Sulphur values being 5 % lower than High Sulphur values on average. The TSWs from $pods_{L<5cm}$ ranged from 3.0 g (3 late heat peaks modality) to 3.4 g (Temp-control), whereas the minimum and maximum values from $pods_{L\geq5cm}$ were 3.2 g (priming modality) and 3.7 g (3 late heat peaks modality). Under both sulphur supplies, no Temp-modality effects on the TSW were observed in either pod category. These results confirmed that (i) seeds from $pods_{L\geq5cm}$ had reached the onset of seed maturation and (ii) seeds developing in $pods_{L<5cm}$ or seeds from fertilized flowers that developed after the temperature sequences all benefited from increased sink strength, due to young pod abortion or reductions in late flowering.

Nutritional seed quality criteria

- *Seed C, N and S concentrations*

Table 2 (Chap. 3.1.) displays C, N and S seed concentrations. Similar to yield components, no Temp x Sulphur interaction effect was observed. The seed C concentration was impacted by Temp-modalities (*p<0.001*) but no sulphur effect was observed. The priming modality displayed the lowest value (-5.4 % from Temp-control) whereas the Temp-control displayed the highest value. Similar to C, the seed N concentration was only affected by Temp-modalities (*p<0.001*). Under both sulphur conditions, extreme N values were observed for the priming modality, which had the highest ranking (+21.9 % compared to Temp-control). These observations showed that the early mild stress had a positive effect over the late heat peaks, which suggested an alleviating effect. As expected, the seed sulphur concentration was significantly impacted by the sulphur supply (*p<0.001*), with Low Sulphur values being 32 % lower than High Sulphur values on average. While no significant differences were observed among the Temp-modalities, the sulphur in the priming modality was slightly higher than in Temp-control (+19.9 %).

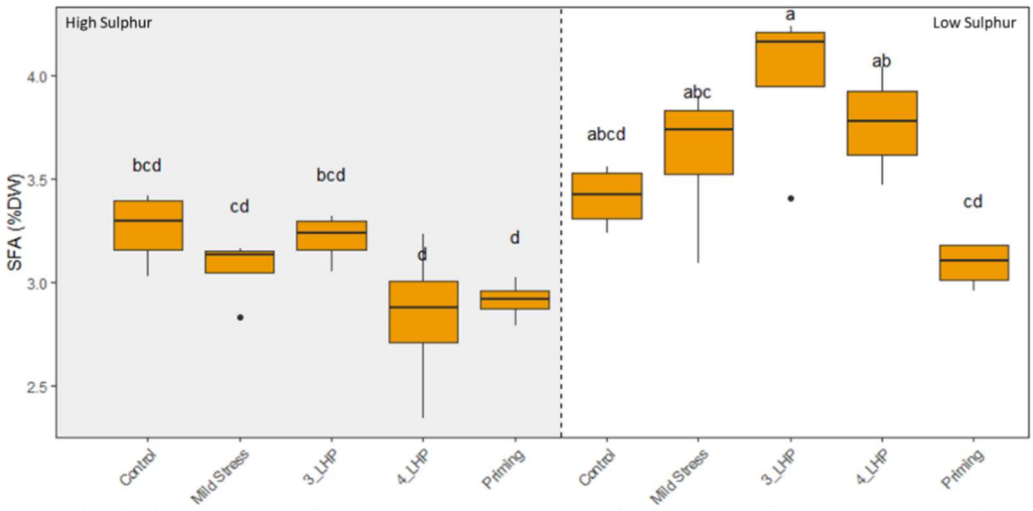
- *Fatty acids concentrations and profiles*

Total fatty acids, saturated FAs and unsaturated FAs concentrations and the ω6:ω3 ratios are displayed in Table 2 (Chap. 3.1.) and in Figure 2 (Chap. 3.1.). For total FAs concentration, no Temp x Sulphur interaction effect was observed on FAs concentration. Effects of Temp-modalities were observed (*p<0.01*) with values ranging from 33 % to 41 % of DW for priming and 3 late heat peaks modalities respectively (Table 2 (Chap. 3.1.)). Values under Low Sulphur were significantly higher (*p<0.001*) on average (41 %DW) than values under High Sulphur (35 %DW). Temp-modality effect was observed in both SFAs and UFAs concentrations, with a significant effect of Temp x Sulphur interaction only observed on SFAs (*p<0.01*) (Table 2 (Chap. 3.1.), Figure 2 (Chap. 3.1.)). The SFAs (including C16:0, C18:0, C20:0, C22:0) concentrations ranged from 3.0 % to 3.6 %DW and the UFAs (including C16:1, C18:1, C18:2, C18:3, C20:1) concentrations ranged from 30 % to 38 %DW. For both SFAs and UFAs concentrations, the priming modality and the 3 late heat peaks displayed the lowest and highest values respectively.

A highly significant sulphur effect was observed in both SFAs and UFAs concentrations, with values under Low Sulphur (3.6 %DW of SFAs and 38% DW of UFAs) being significantly higher on average than values under High Sulphur (3.1 %DW of SFAs and 32 % DW of UFAs) (*p<0.001*) (Table 2 and Figure 2 (Chap. 3.1.)). Overall, the priming modality had the greatest

impact on decreasing FAs concentrations, as a result of the lowest decreases in SFAs and UFAs concentrations, and the early mild stress event did not alleviate the negative effects of later heat peaks on total FAs concentration. In addition, the 4 late heat peaks sequence had a greater impact than the 3 late heat peaks sequence on total FAs, SFAs and UFAs meaning the more intense events, the more impacting.

The ω6:ω3 ratio (i.e. C18:2/C18:3 ratio) is commonly used as an indicator of the edible quality of vegetable oils. This ratio was significantly impacted by the Temp-modalities, but no significant Sulphur nor Temp x Sulphur interaction effects were observed (Table 2 (Chap. 3.1.)). The highest and lowest ratios were observed on the priming and early mild stress modalities respectively (+9.3 and -8.8 % compared to the Temp-control). In addition, the temperature effect on 3 late heat peaks modality was less negative than the early mild stress modality (Table 2 (Chap. 3.1.)). These results indicated that the number of desaturations decreased with greater duration of stress exposure (priming modality) and intensity and earliness of the heat stress event (4 late heat peaks modality) under both sulphur conditions.



Variable	Temp effect	Sulphur effect	Temp x Sulphur
SFAs	0.001 ***	0.000 **	0.009 **

Figure 2 (Chap. 3.1.) : Boxplot and ANOVA table for saturated FAs (SFAs) measured on seeds from pods$_{L\geq5cm}$ under the 10 treatments (crossing temperature modalities and sulphur conditions). SFAs displayed highly significant interaction (Temp x Sulphur) effects. Letters indicate the ranking amongst the 10 treatments. P-values and levels of significance are given for Temp, Sulphur and Temp x Sulphur interaction effects. Levels of significance: ns non-significant, *p<0.05**, *p<0.01***, *p<0.001****. SFAs: saturated fatty acids; 3_LHP: 3 late heat peaks modality; 4_LHP: 4 late heat peaks modality.

- *Seed storage protein concentrations*

The seed storage protein (SSP) concentration ranged from 123 mg/g DW to 168 mg/g DW, with values under High Sulphur condition being significantly lower on average (106 mg/g DW) than values under Low Sulphur condition (185 mg/g DW) (Table 2 (Chap. 3.1.), $p<0.001$). In contrast, no significant effects of Temp-modalities on SSP were observed although the lowest values were observed under the late heat peaks modalities (Table 2 (Chap. 3.1.)). The increase under the early mild stress modality might result from reductions in the number of growing sinks due to pod abortion, reduced seed filling and/or impaired pollination.

Physiological seed quality-related criteria

- *The soluble sugar composition as an indicator of desiccation tolerance acquisition*

Table 3 (Chap. 3.1.) presents the concentration of the main soluble sugar in seeds i.e. sucrose, raffinose and stachyose. For the three main soluble sugars, only temperature effects were observed ($p<0.001$). All the Temp-modalities led to decreased soluble sugar concentrations under both sulphur conditions. Sucrose, raffinose and stachyose concentrations were the highest in the Temp-control and the lowest in the priming and early mild stress modalities. Under the priming modality, sucrose, raffinose and stachyose concentrations were respectively 54 %, 55 % and 52% lower than the Temp-control. Similarly, under the early mild stress modality these concentrations were respectively 59 %, 55 % and 56 % lower than under the Temp-control. These results indicated that the early mild stress had a negative impact on the sugar soluble concentrations. The [raffinose+stachyose]:sucrose ratio, used as a proxy of seed desiccation tolerance, ranged from 0.35 (4 late heat peaks modality) to 0.46 (early mild stress modality) without significant Sulphur effect (Table 3 (Chap. 3.1.)). These results indicate that whatever the sulphur supply, the 4 late heat peaks modality was the most detrimental to acquisition of seed desiccation tolerance. However, these data also highlighted that the prior event of mild stress alleviated the negative effects of late heat peaks since the value under the priming modality was higher than under the early mild stress modality.

- *Seed conductivity as indicator of membrane permeability*

Seed conductivity values ranged from 0.8 µS/mg DW (Temp-control) to 2.9 µS/mg DW (priming modality), with a highly significant temperature effect ($p<0.001$, Table 3 (Chap. 3.1.)). No effect of Sulphur nor Temp x Sulphur interaction effects were observed. Extreme values were observed in Temp-control (the lowest) and in priming modality (the highest, +262 % compared to Temp-control). The other three Temp-modalities (early mild stress, 3 and 4

late heat peaks modalities) led to similar values than under the Temp-control. These results indicate that seed conductivity is highly responsive to the duration of the stressing period, because seeds from temperature modalities displaying the shortest numbers of days where temperature was higher than the control temperature, were the least negatively impacted.

- *Phytohormone changes as indicators of temperature-induced seed dormancy*

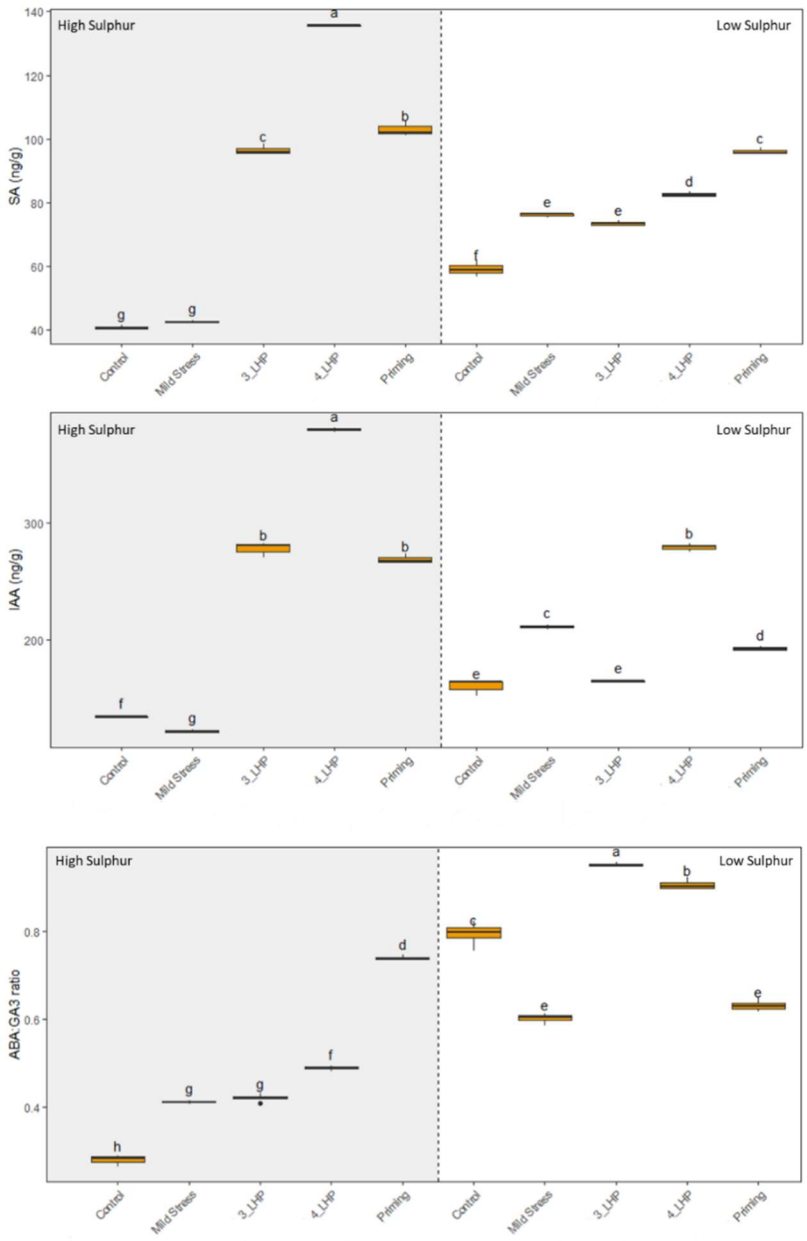
Figure 3 (Chap. 3.1.) displays the results of the main hormones involved with dormancy in seeds (i.e. IAA, SA and ABA:GA3 ratio). Temp-modality effects, as well as Sulphur and Temp x Sulphur interaction effects were observed for the three variables with highly significance ($p<0.001$). The ABA:GA3 ratio ranged from 0.51 (early mild stress modality) to 0.70 (4 late heat peaks modality), with significant lower values in High Sulphur (0.47 on average) than in Low Sulphur condition (0.78 on average, that is 66 % higher). The interaction effects pointed out that according to the sulphur condition, the Temp-modality effect was different i.e. while the early mild stress modality and the 3 late heat peaks modality under High Sulphur were ranked the same, these Temp-modalities under Low Sulphur were highly contrasting (with values being much higher under the 3 late heat peaks modality, Figure 3 (Chap. 3.1.)).

A high ABA:GA3 ratio indicates increased secondary seed dormancy, which is induced by thermoinhibition. As expected, under high temperature this ratio increased, but under High Sulphur condition, the modality that displayed the more days with temperature above the control temperature (priming modality) was the most negatively impacted (highest value), whereas under Low Sulphur condition, the late heat peaks events (4 or 3) induced the highest ratios. In addition, under Low Sulphur condition, the early mild stress tended to alleviate the negative effects of late heat peaks by lowering the ratio (lower values in priming and early mild stress modalities than in late heat peaks modalities).

Seed concentrations of IAA and SA were measured to investigate their variation under the different temperature sequences and sulphur supplies. Consistent with the ABA:GA3 ratio, high concentrations of IAA and SA were observed under high temperatures. IAA and SA ranged from 147 ng/g DW to 330 ng/g DW and 50 ng/g DW to 109 ng/g DW respectively, with Temp-control displaying the lowest values and 4 late heat peaks modality displaying the highest values for both measured variables (Figure 3 (Chap. 3.1.)). Both hormones concentrations were significantly lower in Low Sulphur than in High Sulphur condition, with High Sulphur values in IAA being 17 % higher than Low Sulphur and values in SA being 9 % higher than Low Sulphur. By contrast to the ABA:GA3 ratio, sulphur limitation decreased IAA concentrations except under Temp-control and under the early mild stress modalities with values being respectively 16 % and 73 % higher in Low Sulphur than in High Sulphur (Figure

3 (Chap. 3.1.)). Under High Sulphur condition, the early mild stress event prior to the 4 late heat peaks (priming modality) led to alleviate the strong increase in IAA concentration observed in the late heat peaks solely (4 late heat peaks modality), thus suggesting an effective priming effect. The interaction effects pointed out that according to the sulphur condition, the Temp-modality effect was different i.e. while the priming modality led to higher value than under the early mild stress modality under High Sulphur, it led to lower value than the early mild stress modality under Low Sulphur (Figure 3 (Chap. 3.1.)).

As observed for IAA concentrations, SA concentrations decreased under Low Sulphur except under the Temp-control and under the early mild stress modalities. Similar to IAA concentrations, the early mild stress event prior to the 4 late heat peaks (priming modality) led to alleviate the strong increase in SA concentration observed under the 4 late heat peaks solely (4 late heat peaks modality), although this was only observed under the High Sulphur condition.



Variable	Temp effect	Sulphur effect	Temp x Sulphur
SA	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***
IAA	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***
ABA:GA3	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***

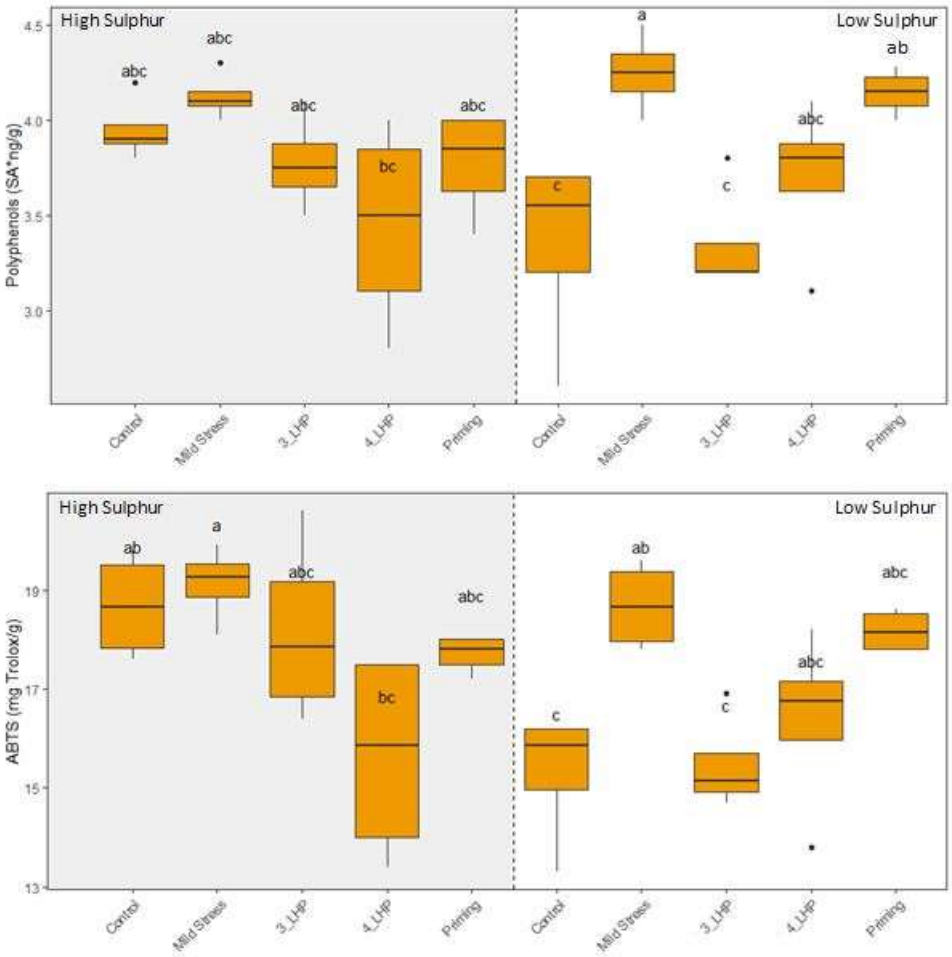
Figure 3 (Chap. 3.1.) : Boxplots and ANOVA table for seed physiological quality variables measured on seeds from pods$_{L \geq 5cm}$ under the 10 treatments (crossing temperature modalities and sulphur conditions). Hormones (SA, IAA) concentration and ABA:GA3 ratio displayed highly significant interaction (Temp x Sulphur) effects. For each variable, letters indicate the ranking amongst the 10 treatments. P-values and levels of significance are given for Temp, Sulphur and Temp x Sulphur interaction effects. Levels of significance: ns non-significant, *p<0.05**, *p<0.01***, *p<0.001****. 3_LHP: 3 late heat peaks modality; 4_LHP: 4 late heat peaks modality; SA: salicylic acid; IAA: indole-3-acetic acid; ABA: abscisic acid; GA3: gibberellic acid.

Total phenolic content and antioxidant capacity in seeds as stress response indicators

Figure 4 (Chap. 3.1.) displays phenolic concentrations and the antioxidant activity (ABST values) measured in mature seeds from pods$_{L \geq 5cm}$. Phenolic concentrations ranged from 3.6 to 4.2 mg SA/g seed DW with no significant effect of S supply. By contrast, significant Temp-modality (*p<0.01*) and Temp x Sulphur interaction (*p<0.05*) effects were observed (Figure 4 (Chap. 3.1.)). Under High Sulphur condition, extreme seed phenolic concentrations were observed under the early mild stress modality (+2 % compared to Temp-control) and under the 4 late heat peaks modality (-12 % compared to Temp-control); whereas under Low Sulphur, extreme values were observed under the early mild stress modality (+26 % compared to Temp-control) and 3 late heat peaks modality (similar value to the Temp-control). These results illustrate the Temp x Sulphur interactions and the benefits of Sulphur restriction in specific temperature modalities to boost phenolic concentrations. The antioxidant capacity measured with the ABTS assays revealed Temp-modality effects (*p<0.01*), Sulphur effects (*p<0.05*) and Temp x Sulphur interaction effects (*p<0.05*). Temp-modality rankings were similar to those observed for seed phenolic concentrations with extreme values being observed in the early mild stress modality (highest values) and late heat peaks modalities (3 or 4, lowest values). Overall, under both sulphur conditions, increased antioxidant capacities were observed in the early mild stress modality while decreased antioxidant capacities (or levels similar to the Temp-control) were observed when the stress occurred later, and despite the number of heat peaks. In addition, while lower oxidative response than the Temp-control were observed in the priming modality under High sulphur conditions, a higher response was observed under Low Sulphur (Figure 4 (Chap. 3.1.)).

The results also indicated that the early mild stress event prior to the 4 late heat peaks (priming modality) were beneficial to the sharp decrease in ABTS values observed under the 4 late heat peaks alone, both sulphur conditions. Regarding the effects of Sulphur conditions, limitation led to decreased antioxidant capacity in the seeds with mean values being 17.9 mg Trolox/g under High Sulphur and 16.8 mg Trolox/g under Low Sulphur (i.e. -6 %) which suggest a crucial role for the sulphur supply in favoring oxidative responses, not only under the Temp-control condition but also in the 3 late heat peaks modality (Figure 4 (Chap. 3.1.)). Eventually, the Temp x Sulphur interaction effects were observed because sulphur conditions modified the ranking of the temperature modalities compared the Temp-control, i.e. under High Sulphur ABTS values were lower in the priming and 4 late heat peaks modalities than the Temp-control but higher under Low Sulphur. Taking into account the values of all the treatments, antioxidant capacities of the seeds were positively correlated to both phenolic concentration (r=0.93,

p<0.001) and the [raffinose+stachyose]:sucrose ratio (r=0.64, *p<0.05*) (Supplemental Data, Figure S1 (Chap. 3.1.)).



Variable	Temp effect	Sulphur effect	Temp x Sulphur
Polyphenols	0.002 **	0.603	0.021 *
ABTS	0.002 **	0.016 *	0.010 *

Figure 4 (Chap. 3.1.) : Boxplots and ANOVA table for phenolic concentrations and ABTS values measured on seeds from $pods_{L\geq5cm}$ under the 10 treatments (crossing temperature modalities and sulphur conditions). Both variables displayed highly significant interaction (Temp x Sulphur) effects. For each variable, letters indicate the ranking amongst the 10 treatments. P-values and levels of significance are given for Temp, Sulphur and Temp x Sulphur interaction effects. Levels of significance: ns non-significant, *p<0.05**, *p<0.01***, *p<0.001****. SA*: synaptic acid, ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

Table 1 (Chap. 3.1.) : Yield components per plant distinguishing the two pools of pods (i.e. $pods_{L<5cm}$ and $pods_{L\geq5cm}$ at the beginning of the Temp-modality application). Results are presented by factor (Temp-modality, Sulphur condition). For a given variable, different letters (Tukey multiple comparisons test) indicate the ranking among Temp-modalities (including Temp-control) or between the two sulphur conditions. P-values and levels of significance are given for Temp, Sulphur and Temp x Sulphur interaction effects. Levels of significance: ns non-significant, *p<0.05**, *p<0.01***, *p<0.001****. SE: standard error, TSW: Thousand Seed Weight.

	Total			Pods L < 5cm			Pods L ≥ 5cm		
Factor\Variables	Yield (g)	Seed number	TSW (g)	Yield (g)	Seed number	TSW (g)	Yield (g)	Seed number	TSW (g)
Temp-modality									
Control	9.8 a	2784 ns	3.3 ns	3.2 ns	956 ns	3.4 ns	6.6 ns	1829 ns	3.6 ns
Early mild stress	8.8 ab	2565 ns	3.1 ns	1.9 ns	615 ns	3.1 ns	6.9 ns	1950 ns	3.6 ns
3 late heat peaks	9.2 ab	2723 ns	2.9 ns	2.7 ns	927 ns	3.0 ns	6.5 ns	1796 ns	3.7 ns
4 late heat peaks	9.3 ab	2724 ns	3.1 ns	2.5 ns	785 ns	3.1 ns	6.8 ns	1939 ns	3.5 ns
Priming	8.2 b	2497 ns	3.2 ns	1.9 ns	545 ns	3.2 ns	6.2 ns	1952 ns	3.2 ns
se	*0.4*	*80*	*0.3*	*0.5*	*0.5*	*0.3*	*0.6*	*158*	*0.2*
Sulphur									
High Sulphur	9.1 ns	2730 a	3.1 ns	2.6 ns	809 ns	3.1 ns	6.5 ns	1921 ns	3.4 ns
Low Sulphur	9.0 ns	2587 b	3.1 ns	2.3 ns	722 ns	3.2 ns	6.7 ns	1865 ns	3.6 ns
se	*0.3*	*52*	*0.2*	*0.3*	*0.3*	*0.2*	*0.4*	*97*	*0.1*
Temp effect	**0.047** *	0.068	0.874	0.309	0.082	0.886	0.944	0.912	0.393
Sulphur effect	0.769	**0.048** *	0.981	0.514	0.424	0.745	0.732	0.684	0.372
Temp x Sulphur	0.342	0.573	0.090	0.195	0.061	0.244	0.526	0.130	0.822

Table 2 (Chap. 3.1.) : Nutritional seed quality criteria measured on seeds from pods$_{L\geq5cm}$. Results are presented by factor (Temp-modality, Sulphur condition). For a given measured variable, different letters (Tukey multiple comparisons test) indicate the ranking among Temp-modalities (including Temp-control) or between the two sulphur conditions. As SFAs are variables with highly significant interaction (Temp x Sulphur) effects, results for each individual treatment are displayed in Figure 2 (Chap. 3.1.). P-values and levels of significance are given for Temp, Sulphur and Temp x Sulphur interaction effects. Levels of significance: ns non-significant, *p<0.05**, *p<0.01***, *p<0.001****. SE: standard error, DW: dry weight, SSP: Seed Storage Protein.

	Seed C, N and S concentrations (%DW)			Oil contents and fatty acids (%DW)				Protein (mg/g DW)
	Carbon	Nitrogen	Sulphur	Fatty acids	SFA	UFA	ω6:ω3 ratio	SSP
Temp-modality								
Control	59.2 a	3.2 b	0.311 ns	39 a	3.3 -	36 a	2.05 ab	150 ns
Early mild stress	58.2 ab	3.5 b	0.321 ns	40 a	3.3 -	37 a	1.87 b	168 ns
3 late heat peaks	58.2 ab	3.2 b	0.323 ns	41 a	3.6 -	38 a	2.08 ab	136 ns
4 late heat peaks	57.2 bc	3.4 b	0.316 ns	37 ab	3.3 -	34 ab	2.20 a	123 ns
Priming	56.0 c	3.9 a	0.373 ns	33 b	3.0 -	30 b	2.24 a	150 ns
se	*0.5*	*0.1*	*0.027*	*2*	*0.1*	*2*	*0.06*	*21*
Sulphur								
High Sulphur	57.7 ns	3.5 ns	0.392 a	35 b	3.1 -	32 b	2.05 ns	106 b
Low Sulphur	57.8 ns	3.4 ns	0.266 b	41 a	4.6 -	38 a	2.12 ns	185 a
se	*0,4*	*0,1*	*0,009*	*1*	*0.1*	*1*	*0,05*	*10*
Temp effect	**0.001** **	**0.000** ***	**0.013** *	**0.002** **	**0.001** **	**0.003** **	**0.001** **	0.278
Sulphur effect	0.829	0.550	**0.000** ***	**0.000** ***	**0.000** ***	**0.000** ***	0.225	**0.000** ***
Temp x Sulphur	0.613	0.574	0.296	0.112	**0.009** **	0.129	0.387	0.233

Table 3 (Chap. 3.1.) : Seed physiological quality values measured on seeds from pods$_{L \geq 5cm}$. Results are presented by factor (Temp-modality, Sulphur condition). For a given measured variable, different letters (Tukey multiple comparisons test) indicate the ranking among Temp-modalities (including Temp-control) or between the two sulphur conditions. P-values and levels of significance are given for Temp, Sulphur and Temp x Sulphur interaction effects. Levels of significance: ns non-significant, *p<0.05*, p<0.01**, p<0.001****. SE: standard error, DW: dry weight.

	Soluble sugar				Conductivity
Factor\Variables	Sucrose (%DW)	Raffinose (%DW)	Stachyose (%DW)	[Raffinose+stachyose] : sucrose	Seed conductivity (µS/mg)
Temp-modality					
Control	7.4 a	0.47 a	2.5 a	0.41 b	0.8 b
Early mild stress	3.0 c	0.21 c	1.1 b	0.46 ab	1.0 b
3 late heat peaks	6.1 ab	0.38 ab	2.1 a	0.41 b	1.0 b
4 late heat peaks	4.6 bc	0.26 bc	1.4 b	0.35 c	1.0 b
Priming	3.4 c	0.21 c	1.2 b	0.42 ab	2.9 a
se	*0.5*	*0.03*	*0.1*	*0.01*	*0.2*
Sulphur					
High Sulphur	4.9 ns	0.32 ns	1.7 ns	0.42 ns	1.4 ns
Low Sulphur	4.8 ns	0.29 ns	1.6 ns	0.40 ns	1.3 ns
se	*0.5*	*0.03*	*0.2*	*0.01*	*0.2*
Temp effect	**0.000** ***	**0.000** ***	**0.000** ***	**0.000** ***	**0.000** ***
Sulphur effect	0.850	0.850	0.620	0.054	0.336
Temp x Sulphur	0.247	0.383	0.431	0.058	0.658

3.1.5. Discussion

Yield components were only impacted in reproductive plant parts developed after the stress

Yield components were not drastically impacted by the high temperature sequences applied at GS72 (Table 1 (Chap. 3.1.)). No effect of temperature was observed on yield of $pods_{L\geq5cm}$, meaning that these seeds experienced a normal filling period. Therefore, the effect of the heat sequences on total seed yield ($p<0.05$) was the consequence of a yield reduction in seeds from $pods_{L<5cm}$, which resulted from reduced seed number and individual seed weight, even though neither component reduction was significant. Indeed, abortions of young pods during the Temp-modality exposure and/or failure of pollination in the flowers present during this period might have occurred (Young et al., 2004). The reproductive adaptation might also have reduced the incidence of late flowering (specific to indeterminate species) to the benefit of filling seeds in already developed pods. These observations are consistent with prior studies in pea (another indeterminate growth species) that demonstrated heat-stress modification of seed distribution along the main stem, which led to larger quantities of seeds on the basal parts than on the upper parts where reproductive organs are younger. These results explained the maintenance of seed yield from basal reproductive parts due to a higher allocation rate of carbohydrates and excluded the direct effects of heat stress on developing seeds (Guilioni et al., 2003). The non-significant effect of sulphur on seed yield components, other than in the total seed number, indicates that the Low Sulphur supply in our study satisfied growth rate and yield requirements.

Priming effects on quality criteria are dependent on the timing of the stress events

Our initial objective was to pinpoint any beneficial effect from a mild stress event that occurs prior to repeated later intense heat peaks. This could be accounted for by a beneficial heat stress memory generated by induced thermo-sensitization. Our work highlights that the alleviating effects of the early mild stress event prior to later heat peaks are not observed for all the measured quality variables. Our results pointed out that these alleviating effects are likely determined by (i) whether the expected priming event occurs concomitantly with biosynthesis of seed storage compounds, and (ii) whether the temperature is adequate to enhance the targeted process.

Figure 5 (Chap. 3.1.) presented the Temp-modality effects on yield components and nutritional and physiological quality criteria measured in maturing seeds, for the Temp-modalities (early mild stress, 3 or 4 late heat peaks and priming modality) and the sulphur limitation. The

priming modality significantly decreased seed C, total FAs, SFAs and UFAs concentrations under both sulphur conditions. These observations suggest that the more the duration of the heat stress sequence (i.e. sequence that records the more days with temperature higher than the control temperature), the most detrimental for maintaining C concentration and hence FAs synthesis, since the priming modality (that cumulated the highest number of days with temperature above the Temp-control modality) induced a greater decrease than the early mild stress or the late heat peaks alone. These results correlate with earlier studies (Aksouh-Harradj et al., 2006; Aksouh et al., 2001) of intense temperature exposure during seed maturation, but contrast with others that highlighted increased total FAs concentrations under a long mild stressing event (Brunel-Muguet et al., 2015b).

Disruption of FAs accumulation in oilseed rape was pointed out under intense heat stress across a range of temperatures similar to those imposed under our heat-peak conditions. This was shown to be the consequence of photosynthesis inhibition and downregulation of BnWRI1 gene expression, which is a key regulator of FA biosynthesis (Huang et al., 2019; Ruuska et al., 2002). Our results also revealed higher total FAs, saturated FAs and unsaturated FAs concentrations under Low Sulphur condition (Table 2 and Figure 2 (Chap. 3.1.)), which contrasted with prior results (Brunel-Muguet et al., 2015b). These differences can be explained in the current work by the lower sulphur supply and the different approaches to seed sampling and analysis (on maturing seeds exposed to the heat stress modalities). The negative effects of high temperature – mainly of duration of high temperature sequence (Figure 5 (Chap. 3.1.)) – on total FAs and unsaturated FAs also indicated that (i) FA biosynthesis was concomitant with the 17-days high-temperature treatment starting approximately 3 weeks after the onset of flowering (Figure 1 (Chap. 3.1.)), with FAs levels rising during the late storage stage (i.e. 20 after pollination (Borisjuk et al., 2013; Niu et al., 2009)) and (ii) the later the heat peaks, the lower the effects. The increased ω6:ω3 ratio under the priming and 4 late heat peaks modalities is also detrimental to oil quality, and is known to result from impaired functioning of the oleic and linoleic desaturases (Aksouh-Harradj et al., 2006).

As usually observed, the accumulation of lipids and proteins (herein linked to seed N concentration) are negatively correlated because they are competitive processes that have spatial and temporal overlaps (Borisjuk et al., 2013; Grami and Stefansson, 1977). Therefore, consistently, while the priming modality decreased the total FA concentration, the seed N concentration remained similar to Temp-control under both sulphur conditions (Table 2 (Chap. 3.1.)). A decrease in seed storage protein concentrations under the late heat peaks modalities were observed, although not significant, suggesting that the high concentrations observed in

the priming modality could be interpreted as a priming effect that helped to overcome further negative effects of the late heat peaks. This observation supports the hypothesis of compensatory effects between the pods that were maturing and the ones that were still developing during the 17-days temperature sequence. Indeed, seed N accumulation was likely to be impaired in filling seeds, and this resulted in N reallocation towards filled and maturing seeds. In contrast, while the seed storage protein concentrations were not significantly increased under high temperature, they increased under Low Sulphur condition as previously observed (Brunel-Muguet et al., 2015b).

Ultimately, seed physiological characteristics were also highly dependent on the features of the high temperature sequences (duration, intensity, frequency), which shapes the dynamics of biosynthesis of storage compounds involved in seed dormancy and stress tolerance. Seed storability and desiccation tolerance can be estimated by two proxies i.e. membrane conductivity and the [raffinose+stachyose]:sucrose ratio. Our results highlighted strong negative effects of high temperature on seed conductivity, indicating degradation of membrane permeability (Table 3 (Chap. 3.1.)). However, the [raffinose+stachyose]:sucrose ratio remained unchanged in the priming and in the early mild stress modalities, which suggests acquisition of desiccation tolerance irrespective of sulphur supply. The beneficial effects of the early mild stress on desiccation tolerance were maintained over the late heat peaks which points out its alleviating effect.

Several phytohormones control seed dormancy, as indicated by the ABA:GA3 ratio, which has been shown to vary according to stresses imposed on the parent plant during seed development (Brunel-Muguet et al., 2015b). A high ABA:GA3 ratio indicates higher seed dormancy, which is expected for efficient seed storage before favorable environmental conditions permit the seeds to germinate. The priming modality and the late heat peaks modalities had the greatest impact on the ABA:GA3 ratio (Figures 3 and 5 (Chap. 3.1.)). Along with the non-significant effect of the early mild stress modality, these observations indicate that the intensity and timing of the stress exposure are determining on the ABA:GA3 ratio. In this example, the temperature of the mild stress was not deleterious on the ABA:GA3 ratio, or this early sequence occurs before the hormone syntheses, thus leading to no observed effects. These observations also pointed out that the temperature of the late heat peaks was deleterious on the ABA:GA3 ratio and that these heat peaks occurred when these hormones were synthetized. Therefore, our results raised questions not only about the compound-specific biosynthesis/maturation temperatures but also the synchronization between these compound

specific-processes and the temperature event applied in the aim to induce an effective thermo-sensitization effects.

	Criteria	Temp-modality				S condition
		Early Mild Stress	3 Heat Peaks	4 Heat Peaks	Priming	Low Sulphur
YIELD COMPONENTS	Total Seed Yield	-10%	-6%	-5%	-16%	
	Total Seed number					-5%
	Seeds Yield from pods $_{L<5cm}$	-40%	-16%	-22%	-40%	
NUTRITIONAL QUALITY	Seed Carbon	-2%	-2%	-3%	-5%	
	Seed Nitrogen				+22%	
	Seed Sulphur	+3%	+4%	+2%	+20%	-32%
	Total Fatty Acids	+3%	+5%	-5%	-15%	+17%
	Satured FAs		+9%		-9%	+16%
	Unsatured FAs			-5%	-17%	+19%
	ω6:ω3 ratio	-9%	+1%	+7%	+9%	
	Protein concentration					+75%
PHYSIOLOGICAL QUALITY	[Raff+Stach]:Suc ratio	+12%		-15%	+2%	
	Seed conductivity				+262%	
	ABA:GA3 ratio	-5%	+28%	+30%	+28%	+66%

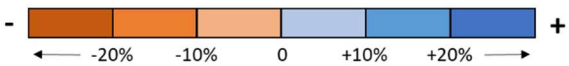


Figure 5 (Chap. 3.1.) : Summary of the effects of the four temperature sequences (early mild stress, 3 and 4 late heat peaks and priming modality) and the sulphur limitation on yield components, nutritional and physiological quality criteria. Indicators of quality were measured on seeds from podsL≥5cm at the beginning of stress exposure. The effects are given in reference to the ANOVAs in Tables 1, 2, 3 (Chap.3.1.) and Figures 2 and 3 (Chap.3.1.). As illustrated in the legend, colors indicate the trends by level of increase or decrease to the Temp-control modality. Numbers in boxes display the relative difference between the Temp-modality and the Temp-control (for temperature modalities) and between Low Sulphur and High Sulphur (for Sulphur conditions). FAs: fatty acids, Raff: raffinose, Stach: stachyose, Suc: sucrose, ABA: abscisic acid, GA3: gibberellic acid.

Modulation of antioxidant capacities and thermotolerance acquisition as stress defense strategy

Heat stress is known to trigger oxidative bursts that lead to a wide spectrum of responses including enzymatic and non-enzymatic components such as polyphenols, hormones and sugars, which have been shown to scavenge reactive oxygen species (ROS) (Nishizawa et al., 2008; Serrano et al., 2019; Soares et al., 2019a; Soengas et al., 2018). In our study, measurements of the antioxidant capacity indicated complex results that differed according to the sulphur supply (Figure 4 (Chap. 3.1.)). In the High Sulphur condition, the greatest increase was observed under the early mild stress modality and not under the priming nor the late heat peaks modalities, likely to phenolic concentrations. These observations contrasted with prior studies which indicated enhancement of subcellular antioxidant activities using other antioxidant systems as proxies (such as enzymes superoxide dismutase, glutathione reductase, and peroxidase in mitochondria and chloroplasts of wheat leaves) under multiple heat priming sequences prior to later high temperature events (Wang et al., 2014).

Our findings also pointed out that the measured concentrations of raffinose and stachyose, which have been reported to protect against oxidative damage (Nishizawa et al., 2008), were not increased under early mild stress modality (irrespective of the sulphur conditions), and so it was not possible to ascertain their role in the antioxidant defense pathways in our conditions. But as discussed above, this soluble sugar-related results should be interpreted carefully regarding their timing and optimal biosynthesis within the maturing seeds (Baud et al., 2002; Leprince et al., 2017). Indeed, our results might suggest that the temperature events (whether mild or intense) were above the temperature threshold of the stepwise transfer reactions involving raffinose synthase and stachyose synthase, leading to impairment of sugar biosynthesis and thus the sugar-mediated oxidative response (Gangl et al., 2015).

Phytohormones such as IAA and SA have been demonstrated to interact with ROS during stress tolerance as stress-signaling cues (Balfagón et al., 2019; Bielach et al., 2017; Clarke et al., 2004; Prerostova et al., 2020; Sharma and Laxmi, 2016) and have also been linked to stress thermotolerance (Bokszczanin et al., 2013; Clarke et al., 2009; Shu et al., 2016; Tuan et al., 2019) because increases in the levels of these compounds under high temperature are associated with greater stress-induced dormancy and thermoinhibition (Toh et al., 2012). SA was also reported to confer basal thermotolerance, which is defined as the ability to survive sub- or supra-optimal temperatures (Bokszczanin et al., 2013; Clarke et al., 2009).

In our study, we observed drastic increases in IAA and SA in mature seeds collected from pods exposed to the longest cumulated high temperature (priming modality) or late heat peaks at the onset of maturation under High Sulphur conditions and to a lesser extent under Low

sulphur conditions (Figure 3 (Chap. 3.1.)). The 4 late heat peaks modality induced the highest increase in IAA and SA, while the early mild stress modality remained similar to the control under both sulphur conditions. These observations pointed out that the early mild stress event prior to 4 late heat peaks allowed their negative effects on IAA and SA concentrations to be alleviated thus leading to lower thermoinhibition. Our results also highlighted that the 3 late heat peaks modality had less effect than the 4 late heat peaks on IAA and SA, which suggests that the shorter the period of intense stressing, the lower the impact on the seed hormones concentration.

Impact of S availability on thermotolerance acquisition

Firstly, the level of sulphur limitation used in our experiment was mild enough not to impact seed yield and components as only a slight negative effect on the total seed number was observed (Figure 5 (Chap. 3.1.)). The effects of sulphur restriction were observed on nutritional quality criteria i.e. FAs-related variables, seed storage proteins and physiological quality criteria i.e. ABA:GA3 ratio, which were all increased under sulphur limitation. Interactions effects were only observed for saturated FAs and the ABA:GA3 ratio. They highlighted that late heat peaks or early mild stress events led to increased unsaturated FAs concentrations under Low Sulphur but not under High Sulphur (Figure 2 (Chap. 3.1.)). The ABA:GA3 ratio was only increased under Low Sulphur with the late heat peaks (Figure 3 (Chap. 3.1.)).

The variables related to thermoinhibition (i.e. phytohormones IAA and SA) and oxidative responses were globally decreased by sulphur limitation (Figures 3 and 4 (Chap. 3.1.)). Nevertheless, the sense of variation or the extent of the decreases varied according to the temperature modality. Indeed, Temp x Sulphur interaction effects were observed for IAA, SA concentrations and the ABA:GA3 ratio, phenolic concentrations and ABTS values. Our results pinpointed increased antioxidant capacities with early mild stress event (observed for the priming modality and the mild stress modality) under Low Sulphur compared to the natural thermoperiod whereas similar or slightly lower values to the natural thermoperiod were observed with the early mild stress event under High Sulphur (Figure 4 (Chap. 3.1.)). For phytohormones IAA and SA, the temperature modalities globally increased the concentrations under the two sulphur conditions although this trend was more pronounced under High Sulphur than under Low Sulphur. Nevertheless, only under Low Sulphur, the early mild stress event alone trigger increased concentrations compared to Temp-control. Sulphur nutrition has been reported to improve antioxidant defenses due to S-containing antioxidant compounds such as the redox-active cysteine residues of glutathione and thioredoxin (Mukwevho et al., 2014) and also specific phytohormones (Bashir et al., 2015; Hasanuzzaman et al., 2018; Xia

et al., 2015). IAA biosynthesis relies on the effectiveness of S metabolism via adequate levels of glutathione (Kopriva et al., 2016) and is improved when S is limiting (Nikiforova et al., 2003). SA is also known to interact with sulphur during SA homeostasis regulation (Baek et al., 2010). When comparing both sulphur conditions under the natural thermoperiod, our results are in line with these findings as a slight increase was observed under Low Sulphur. Our study also highlighted how the intensity, the timing and the duration of heat stress can restrict the boosting effects of sulphur restriction.

3.1.6. Conclusion

Our study analyzed the effects of different high temperature protocols applied at the onset of seed maturation on yield components, seed nutritional and physiological quality under two sulphur supplies. The initial working hypothesis was to highlight inducing thermotolerance protocols based on stress memory acquisition. Our results pinpointed that the effects of duration, timing and intensity of the stressing events that designed the different temperature protocols were determining as they led to different impacts on the measured quality criteria. Our results showed that thermo-sensitization protocols must require: (i) the optimal temperature to promote a targeted process and (ii) the synchronization between the expected thermopriming event and the underlying biosynthesis and maturation processes specific to the targeted storage compound. Our experiments were also designed to observe whether sulphur nutrition (which is essential to Brassica species) interfered with expected thermo-sensitization effects. The level of sulphur limitation in our assay was mild enough to impact a few nutritional (fatty acids, seed storage protein concentration) and physiological (IAA, SA, ABA:GA3 ratio) quality criteria, as well as the antioxidant capacity. This raises the question of the direct role of sulphur in the cascade of events leading to the hormones biosynthesis and the indirect role of sulphur in stress memory mediated by epigenetic regulation. In contrast, sulphur restriction optimized seed oil concentrations in stress-exposed maturing seeds, especially when the stress was delayed, thus highlighting the need to satisfy sulphur requirements in certain climatic contexts. Overall, we foresee the need for trade-offs to optimize quality criteria that are dependent on features of temperature such as intensity, frequency and timing of application. High temperature acclimation strategies should also include sulphur supply which restricted levels can either improve seed quality criteria (e.g. total FAs, saturated and unsaturated FAs) in temperature-stressed maturing seed, lessen the positive effects of a thermopriming profile (e.g. indicators of desiccation tolerance) or amplify the oxidative responses to high temperature stress when applied at sensitive stages during the maturation process.

3.2. Effets des stress thermiques répétés sur le développement cinétique des composés de stockage dans la graine du colza

3.2.1. Préambule

Ce chapitre présente les résultats obtenus suite à l'Expérimentation 3 (EXPE 3, 2019-2020, projet COSMOS). Une culture de plantes de colza d'hiver soumise aux mêmes conditions de stress thermique que dans l'Expérimentation 1 (2016-2017) a été réalisée en conditions contrôlées, ici en condition non-limitante en soufre. Plusieurs récoltes ont été réalisées entre la sortie de vernalisation et la maturité des plantes. Les graines utilisées pour cette culture proviennent également du centre de ressources biologiques BrACySol. Il s'agit donc de l'expérimentation dédiée à l'analyse cinétique du développement de la graine jusqu'à leur maturité physiologique, dans l'objectif d'avoir une meilleure compréhension sur les effets des stress thermiques répétés sur le remplissage des graines. La culture en conditions contrôlées, les récoltes au cours du développement et de la maturation des graines, les analyses biochimiques, les analyses statistiques des résultats et la rédaction d'un article scientifique (Magno et al., 2022c, soumis dans Plant Science) ont été réalisées pendant la thèse. Les données issues de cette expérimentation ont également été utilisées pour l'évaluation du module rendement et pour les simulations avec le modèle (semi-)mécaniste SuMoToRI sous stress thermiques répétés (Axe II). Les données supplémentaires de cet article (i.e. Supplemental Data) sont présentées dans l'Annexe 6.

Article Magno et al, 2022 soumis dans PSL : principaux résultats

- Les stress thermiques répétés après la floraison ont un impact sur le rendement et la qualité des graines de colza.

- Les espèces à croissance indéterminée comme le colza sont capables de compenser les effets des stress thermiques testés, notamment pour maintenir le rendement des graines. Ces observations soulèvent la question du rôle des effets de compensation dans les mécanismes et processus associés à la mémoire du stress.

- Les hautes températures diminuent la teneur en huile et augmentent la teneur en protéines dans des proportions variables selon l'âge des graines et leur période d'exposition au stress.

- Les protocoles de thermosensibilisation doivent tenir compte des caractéristiques intrinsèques aux évènements thermiques stressants, tels que la fréquence, la durée, la période et l'intensité de la température.

Repeated heat stress events during the reproductive phase impact the dynamic development of seeds in *Brassica napus* L.

Lethicia Magno Massuia de Almeida[1], Maëlle Coquemont-Guyot[2], Nicolas Elie[2,3], Annette Morvan-Bertrand[1], Jean-Christophe Avice[1], Alain Mollier[4], Sophie Brunel-Muguet[1*]

1. Normandie Univ, UNICAEN, INRAE, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, SFR Normandie Végétal (FED 4277), Esplanade de la Paix, 14032, Caen, France
2. Normandie Univ, UNICAEN, Federative Structure 4207 "Normandie Oncologie", Service Unit PLATON, Virtual'His platform, Caen, France
3. Normandie Univ, UNICAEN, Service Unit EMERODE, Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie, CMABio³, Caen, France
4. ISPA, Bordeaux Sciences Agro, INRAE, F-33140, Villenave d'Ornon, France

Many studies point out the deleterious effect of high temperatures events during the crop reproductive phase on seed yield and quality. However, plant responses to repeated stressing events remain poorly understood, while the increased frequency of extreme abiotic constraints, such as spring and summer heat waves, has been proven as one feature of the on-going and future climate change. The responses of oilseed rape plants subjected to three heat stress sequences that differed in the intensity, the timing of application, the duration and the frequency of the high temperature events, were investigated throughout the seed development and maturation phases under controlled conditions. Seed yield and components were measured in three different harvest dates. Biochemical and histological analyses of seeds were carried out in order to monitor the evolution of the main storage compounds (fatty acids, proteins, sugars) involved in seed nutritional and physiological quality. Although the effects of heat stress were not significant on total yield, differences in seed number and weight highlighted the strong compensation capacity in indeterminate growth species. Heat stress induced significant decreases in oil content and increases in protein content in seeds to different extent according to the age of the pods. Soluble sugars concentrations were impacted by heat during seed development but not when the seeds reached physiological maturity, thus indicating compensatory mechanisms that set up after the stress exposure. Our results led to conclude that the effects of repeated heat stresses on seed yield and quality were tightly related to (i) the optimal temperature of a given compound biosynthesis process, and (ii) the synchrony between the temperature event and the period of biosynthesis of the targeted storage compound. These results highlight the complexity to design thermo-sensitizing protocols to maintain or even improve the various seed quality related criteria, especially in species with indeterminate growth.

Keywords: seed quality, seed development, seed maturation, heat stress, oilseed rape.

3.2.2. Introduction

Plant phenology, growth and development were affected by environmental conditions, which in turn impact yield and quality of harvested products. Increased frequency of extreme events has been pointed out by recent climate reports (IPCC, 2021), thus raising growing concerns regarding crop adaptation to face repeated stresses in agricultural systems. Heat waves are one of the most impacting stressful events which were shown to become more frequent, longer and intense during the reproductive phase of important crop species (Christidis et al., 2015; Trnka et al., 2014). Therefore, the challenge for the next decades is to maintain (or even increase) yields while guaranteeing the multi-criteria seed quality in this climatic context. With a sharply rising production over the past 30 years, winter oilseed rape is the leading oleoproteaginous crop in terms of cultivated area and grain production in Europe, ahead of sunflower and soybean (Terres Univia, 2021). Seeds are key products of the oilseed rape market due to their various uses and transformations into edible oil, biofuel, protein rich-cakes for cattle feeding and other industrial applications (Von Der Haar et al., 2014). Flowering, seed filling and seed maturation -as critical stages of development for seed yield and quality- are highly sensitive to spring-occurring high temperature events. Given the seed's complex internal structure that gathers the embryo and other storage organs (Schiebold et al., 2011), understanding the impact of heat stress events on these developmental stages is a pre-requisite to better estimate to what extent seed quality can be modified.

Due to its indeterminate growth, oilseed rape can be impacted by spring heat stresses to variable extents according to the age of pods when they occur. During the flowering stage, heat stress limits pollination (Sage et al., 2015) and/or induces early pod abortion, thus impacting seed number, size and/or weight, inducing yield losses (Morrison and Stewart, 2002; Young et al., 2004). Later heat stress exposure impacts nutrient allocation to the pods, synthesis and storage of seed reserves, embryo growth, and eventually yield components (Magno et al., 2022a; Magno et al., 2021). Seed quality of oilseed rape encompasses a range of nutritional (e.g. concentrations and composition in lipid and protein) and physiological (e.g. storage capacity, germination and seed dormancy) quality criteria. These characteristics might be quantitatively impacted by heat stresses that occur during seed filling and maturation, leading to seed quality default (Baux et al., 2013; Baux et al., 2008; Brunel-Muguet et al., 2015; Gauthier et al., 2017; Magno et al., 2021; Schulte et al., 2013; Zhou et al., 2018). In mature seeds, contrasting trends were observed in seed quality criteria according to the features of the heat stress sequence applied during seed development. Indeed, intensity, duration, timing and frequency of the stressful events are crucial components of the magnitude

of stress responses. In particular, repeated heat stresses can promote thermo-sensitization through the storage and retrieval of stress-induced information, namely beneficial stress memory, then potentially conferring more rapid, efficient and/or sensitive response to following stress exposures (Crisp et al., 2016). This so-called priming effect adds a layer of complexity in analyzing the dynamics of seed storage synthesis and accumulation under such stressing conditions.

While increased total fatty acids (FA) concentrations were observed under a long lasting mild stressing period (Brunel-Muguet et al., 2015b), high temperatures were mostly negative on FA concentration whether they were repeated or not (Aksouh-Harradj et al., 2006; Aksouh et al., 2001; Magno et al., 2021, 2022a). To some extent, the highest decrease in FA matched the longest stress duration, in contrast with the lowest decrease which matched the latest stressing event. These might be a result of the synchrony between the stressing events and the timing of FA synthesis. Nevertheless, thermopriming effects could be observed on seed protein concentration such that an early mild stress exposure at the onset of seed maturation (GS72, Lancashire et al., 1991) alleviated the negative effects of later heat stresses (Magno et al., 2021). Seed physiological quality was also drastically deteriorated under heat stress, as observed with the reduction of the soluble sugars ratio i.e. [raffinose+stachyose]:sucrose, representing a proxy of desiccation tolerance acquisition (Bailly et al., 2001; Brunel-Muguet et al., 2015b). Similar to protein concentration, thermopriming effects could be observed on soluble sugar concentration, thus highlighting the fine tuning by multiple stressing event-sequence (Magno et al., 2021). In line with these observations, Baud et al. (2002) highlighted the critical period for soluble sugar synthesis, and thus the acquisition of desiccation tolerance, as being the late maturation stage in *Arabidopsis thaliana*, with the storage compound synthesis ending concomitantly with sucrose, stachyose and raffinose accumulation. These observations underlie the tight interactions between stress effects and spatio-temporal dynamics of the seed storage compounds accumulation.

Several studies investigated the dynamics of the spatial distribution and accumulation of major compounds in oilseed rape and its close relative *Arabidopsis thaliana* (Baud et al., 2002; Borisjuk et al., 2013; Fait et al., 2006; Leprince et al., 2017). From early to mid-storage phases, starch is the main accumulated compound in the embryo. In contrast with starch, sucrose accumulation starts in the later phases which then allows metabolic pathway for the synthesis of raffinose and stachyose from sucrose to begin (Suarez et al., 1999). Starch and lipid concentrations follow the same temporal pattern until mid-storage, when starch starts degrading, while lipids keep following a sigmoidal curve pattern before reaching a plateau as

the seed approaches maturity (Woodfield et al., 2017). Studies using NMR-based imaging illustrated that the embryo bending (due to space limitation) leads to gradients of lipids within the cotyledons (Borisjuk et al., 2013), which tends to indicate that the regulation of lipids storage is driven by the seed architecture with different levels of lipid accumulation within the embryo components. Borisjuk et al. (2013) also pointed out the co-localization of lipid and protein storage, which implies competition for space, energy and substrate of both synthesis machineries. This is in line with several studies, protein concentration usually increases as being negatively correlated with total oil content, which is reduced in oilseed crops exposed to heat stress (Aksouh-Harradj et al., 2006; Aksouh et al., 2001; Diepenbrock and Geisler, 1979; Hammac et al., 2017).

In the present study, our assumptions were that the effects of multiple heat stress events applied to developing seeds of *Brassica napus* L. can greatly vary according to the timing, the duration, the intensity and the frequency of each event. For this purpose, spatiotemporal analyses were performed combining biochemical and histological analyses, to visualize and quantify the evolution of seed storage compounds that reflect seed quality under three heat stress sequences. Overall, our experimental design addresses the following questions: (i) what are the critical periods for seed storage compounds biosynthesis and maturation? and (ii) how the features of heat stress sequences in terms of intensity, duration, timing and frequency impact seed development and quality in oilseed rape?

3.2.3. Materials and methods

Growth conditions in the greenhouse

Plants were grown between 2019-2020 with seeds of *Brassica napus* L. (cv. Aviso) provided by the Center of Biological Resources BrACySol (Brassica-Allium-Cynara-Solanum, INRAE Center of Rennes, Brittany, France). Five weeks after sowing, the seedlings were transplanted into 96 pots of 2 L containing an inert substrate (perlite and vermiculite, 2:1, v/v) and grown under greenhouse conditions (Caen, France, 49°11'09 N, 0°21'32 W). Afterwards, seedlings were subjected to a 12-weeks period of vernalization in a cold chamber (standard model, Froid & Mesures, Beaucouzé, France) maintained at 5°C (day/night), with artificial light during the day (10h/14h, day/night). Then, plants were transferred into the greenhouse and subjected to a natural thermoperiod without additional light. The experiment was performed under adequate water and nutrient conditions. Nitrogen (N) was manually provided within two applications of a NH_4NO_3 solution: 100 kg N/ha at the end of vernalization (GS30, stem

elongation, Lancashire et al., 1991) and 50 kg N/ha at early flowering (GS60, bud formation), assuming a plant density of 40 plants.m^{-2}. As *Brassica* species were high sulphur (S) demanding crops, S was manually applied at the end of vernalization (GS30) with a solution of $MgSO_4$ containing 75 kg SO_3/ha, as usually provided in the field.

- *Identification of the three cohorts of pods*

Because of the indeterminate growth of oilseed rape, mixed-age pods were present in the plant throughout the temperature sequences, thus potentially affecting seed filling and maturation due to its location in the branch (Diepenbrock and Geisler, 1979). Therefore, on the day before the beginning of the stress exposure, three cohorts of pods were identified and then specifically labeled in plants, as illustrated in Figure 1a (Chap. 3.2.): (i) pods whose length was above 5 cm ($pods_{L\geq5cm}$); (ii) pods whose length was shorter than 5 cm ($pods_{L<5cm}$); and eventually (iii) flowers which will undergo heat stress and become young pods during or after the stress ($pods_{Flo}$). Indeed, preliminary experiments (Magno et al., 2021, 2022a) indicated that $pods_{L\geq5cm}$ or longer contain seeds that have reached at least half their final fresh weight (about 55%), which coincides with the onset of seed maturation stages (Borisjuk et al., 2013). When the pods started desiccating, the branches were individually wrapped with transparent plastic pouches to avoid seed dispersal and the mixing of seeds between the different cohorts of pods.

- *Heat stress sequences applied during the reproductive phase*

Following the stress sequences described in Magno et al. (2021), plants were submitted to four temperature modalities applied for 17 days from the stage GS72 (i.e. 20% of the pods having reached their maximum size), as illustrated in Figure 1b (Chap. 3.2.): (i) the Control (Ctrl) exposed to natural thermoperiod conditions in the greenhouse (with mean, maximum and minimum temperatures being 16.7°C ±1.9, 20.5°C and 13.5°C, respectively); (ii) the Repeated Stresses Sequence (RSS) composed of 5 early full days under mild warming (26°C ±2.2) followed by 5 days under natural thermoperiod, and exposed to 7 days under mild warming with daily heat peaks on 4 days (35.5°C ±1.6 from 10 am till 3 pm); (iii) the Early Mild Stress (EMS) composed of 5 early full days under mild warming, and followed by 12 days under natural thermoperiod; and (iv) the 4 Late Heat Peaks (4LHP) composed of 10 days under natural thermoperiod, followed by 7 days under mild warming with a daily heat peak applied for 5 hours on 4 days as for the RSS modality. For each temperature modality, four replicates (n=4) were grown in the greenhouse under natural thermoperiod and transferred when required in a separate greenhouse unit, where the high temperature conditions (mild warming or heat peaks) were applied and monitored, according to the experimental design (Figure 1c

(Chap. 3.2.)). The heat protocols were chosen according to previous studies that used similar ranges to mimic mild and intense temperature events under controlled conditions (Aksouh-Harradj et al., 2006; Magno et al., 2021). After the period of stress exposure (depending on the modality), plants grown in the greenhouse under natural conditions until the corresponding date of harvest. Air temperatures in the greenhouse were recorded hourly with a temperature probes (105T Campbell, Campbell Scientific Ltd., Leicestershire, UK).

- *Harvests throughout the reproductive phase*

Plants of each temperature modality (n=4) were harvested in several days throughout the end of vernalization (GS30, stem elongation) until the final harvest (GS99, whole plant senescence/mature grains), thus being differentiated by the number of days after vernalization (DAV). Five intermediate harvests (50, 55, 60, 67 and 76 DAV), and the final harvest (133 DAV) were made in different times representing key stages during the complete crop cycle. The main objective of these dynamic harvests was to monitor the evolution of plant growth and storage compounds biosynthesis in seeds (i.e. fatty acids, proteins and soluble sugars), which are representative of the nutritional and physiological quality of oilseed rape. For each harvest, the different plant compartments (i.e. roots, green leaves, fallen leaves, stems and pods) were separated and weighed after freeze-drying for dry weight (DW) measurements. Due to the complexity of the plant's stripping considering the three different cohorts of pods (i.e. $pods_{L\geq5cm}$, $pods_{L<5cm}$ and $pods_{Flo}$), seeds from plants of specific harvest times were chosen to perform each type of analyses, as follows : (i) seeds from plants collected at 60, 76 and 133 DAV were used to perform the seed yield components and the biochemical measurements, and (ii) seeds from plants collected at 50, 55, 60 and 67 DAV were used to perform microscopic sections in order to visualize seed development during the stress period.

Yield components measurements

For each harvest date (60, 76 and 133 DAV), seeds from each plant (n=4) separated in three cohorts of pods (i.e. $pods_{L\geq5cm}$, $pods_{L<5cm}$ and $pods_{Flo}$) were collected and weighed after freeze-drying for DW measurements. The seed number and thousand seed weight (TSW) were determined by image analyses, as detailed in Magno et al. (2022a).

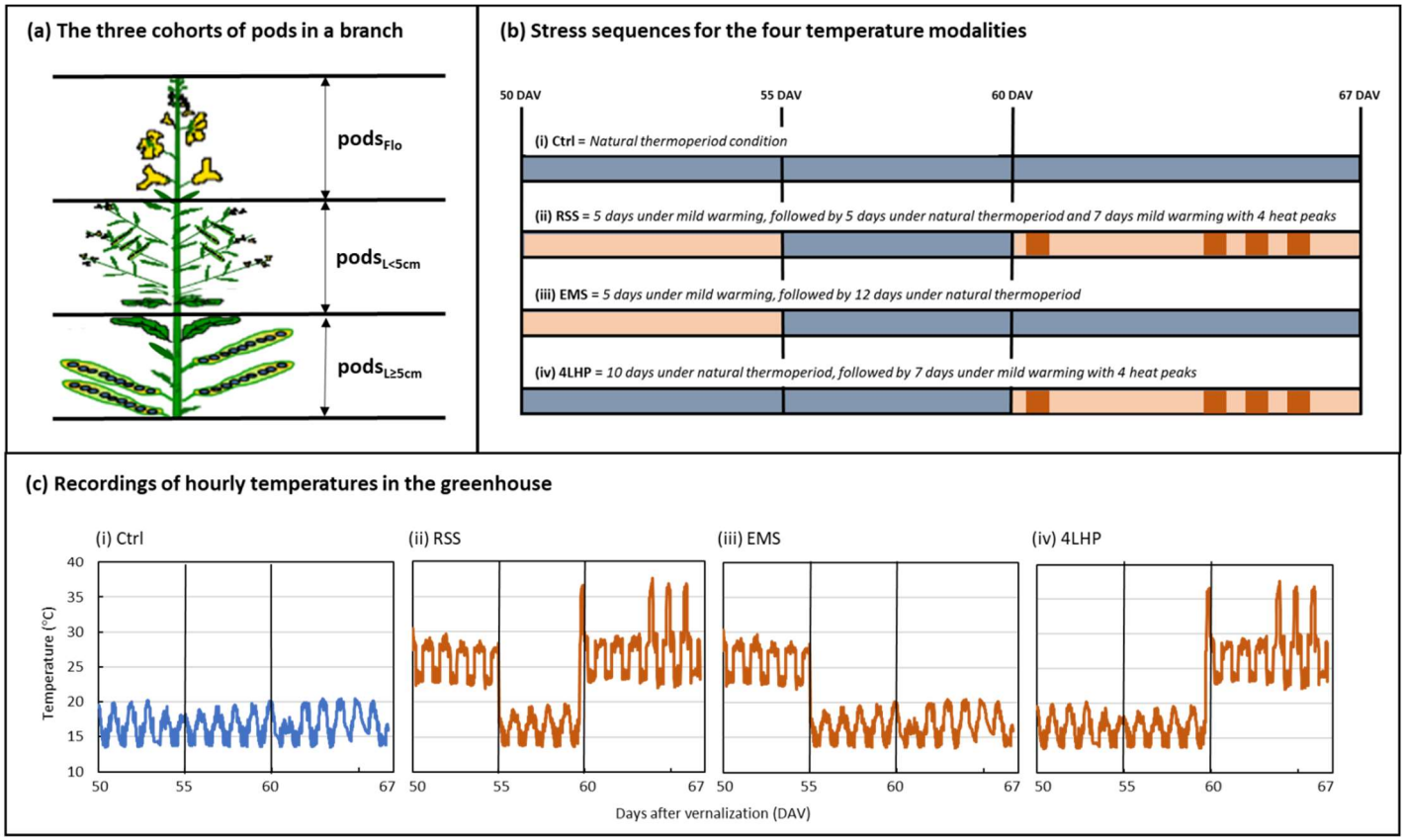


Figure 1 (Chap. 3.2.) : Simplified scheme of the temperature stress sequences and the intermediate harvests realized throughout the period of exposition to stress (i.e. 50, 55, 60 and 67 DAV). (a) illustrates a branch of oilseed rape with the three cohorts of pods identified in this study: (i) pods whose length was above 5 cm (pods$_{L\geq5cm}$); (ii) pods whose length was shorter than 5 cm (pods$_{L<5cm}$); and (iii) flowers which will undergo heat stress and become young pods during or after the stress (pods$_{Flo}$). (b) illustrates the different temperature protocols for the four temperature modalities: (i) Control (Ctrl); (ii) Repeated Stresses Sequence (RSS); (iii) Early Mild Stress (EMS); and (iv) 4 Late Heat Peaks (4LHP). (c) displays the recordings of hourly air temperatures in the greenhouse for each temperature modality. After the stress exposure, plants grown under natural conditions in the greenhouse until harvest. DAV: days after vernalization.

Biochemical characteristics of seeds

In the following sections, biochemical characteristics were performed on seeds from the three different cohorts of pods (i.e. $pods_{L\geq5cm}$, $pods_{L<5cm}$ and $pods_{Flo}$). Three homogeneous plants (n=3) out of the four replicates were used to perform the analyses in each harvest date (60, 76 and 133 DAV). Prior to the biochemical analyses, seeds were freeze-dried for 48h and were manually ground.

- *Oil content and fatty acids composition in seeds*

Oil content and fatty acids profiles were determined as described in Marchand et al. (2016). Seeds powder (about 30 mg per plant) was suspended in 1 mL of methanol/toluene/H_2SO_4 solution (100:20:2.5; v/v) containing C17:0 (heptadecanoic acid) as internal standard (25 µg mL^{-1}), remaining 1h at 80°C for transmethylation. After cooling, 750 µL of hexane and 1.5 mL of water were added. The hexane phase containing the resulting Fatty Acid Methyl Esters (FAMES) was analyzed as detailed in Magno et al. (2022a). FAMES were identified by comparing their retention times with those of commercial standards (Sigma, St. Louis, MO), and quantified using a ChemStation (Agilent). Results were presented by seed total FA, the Saturated FA (SFA, including C16:0, C18:0, C20:0, C22:0) and the Unsaturated FA (UFA, including C16:1, C18:1, C18:2, C18:3, C20:1).

- *Seed carbon, nitrogen and sulphur concentrations*

Seeds powder (about 3 mg per plant) was placed into tin capsules for elemental analysis. The percentage of total C, N and S were determined with a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy) linked to a continuous flow isotope mass spectrometer (IRMS, Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK). The N content was used as indicator of the total protein content, as the nitrogen-to-protein conversion factor of 5.5 can be used to estimate protein in seeds (Ezeagu et al., 2002).

- *Seed soluble sugars concentration*

Soluble sugars were extracted from 50 mg of seeds powder under 1 mL of water, with three stages of water bath and centrifugation. Sucrose, raffinose and stachyose contents were quantified using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), as described in Magno et al. (2022a). A solution with 40 µL melicitose was used as the internal sugar standard. The higher the [raffinose+stachyose]:sucrose ratio, the more tolerant to desiccation the seed is (Bailly et al., 2001).

Histological sections and staining protocols of seeds from pods$_{L\geq5cm}$

Histological sections and staining techniques were performed solely on maturing seeds (i.e. from pods$_{L\geq5cm}$) of each individual plant (n=3) at 50, 55, 60 and 67 DAV. After each harvest, pods were weighted before being frozen and stored at -80°C. Cutting sections were performed on frozen seeds carefully separated from pods under liquid nitrogen environment. Previous tests of cutting and staining were made based in the available literature (Borisjuk et al., 2013; Schiebold et al., 2011; Villegente et al., 2017), and sections with 11 µm of thickness proved to be the most appropriate for our approach. The sections were made by cutting passing transversely to the visible bulge in the seed of oilseed rape (which corresponds to the radicle). Each section measured about 2.0-2.5 mm, corresponding to the maximum central diameter of the seed depending on the development stage. Three blades containing 5 slices of seeds from each plant were prepared using a cryostat (6250 Dakewe, VWR, 2020). Sections were dried at room temperature and stored at 4°C until staining. The three histological stains used in this study are detailed below. After staining, the blades containing seed cross-sections were digitized with an Olympus VS120 scanner (Olympus France, Rungis, France) equipped with a 20x objective (N.A 0.80). Seed sections were visualized using the open source software Qupath (Bankhead et al., 2017).

- *Staining seed tissues with Hematoxylin and Eosin*

Blades were immersed in Harris Haematoxylin (RAL Diagnostics, 361070) and Erythrosin B CI45430 (Merck, 1.15936), respectively. Then, blades were dehydrated and mounted in DePeX (BDH, 361254D). Hematoxylin and eosin (HE) have been used for a long time as a recognized stain methods to visualize various tissue types and cell sections (Fischer et al., 2008).

- *Staining lipids with Oil Red O*

Oil Red O (ORO) is a lysochrome that stains neutral lipids and lipid droplet morphology in sections from frozen tissues (Mehlem et al., 2013), having already been tested on microalgal cells for both microscopy assay and lipid quantification (Marquez and Beccaria, 2020). Sections were fixed with formaldehyde and stained in Oil Red O solution (Sigma, 00625). Mounting was made in aqueous phase using Hydromount (Electron microscopy Sciences, 17966).

- *Detection of polysaccharides with Periodic Acid–Schiff*

The Periodic acid–Schiff (PAS) stain allows the visualization of polysaccharide networks (Puchtler et al., 1975). Blades were immersed in Periodic Acid (Sigma, 8.22288), Schiff's reagent (Merck, 1.09034) and Harris Hematoxylin (RAL diagnostic, 361070) baths, respectively. Then, blades were dehydrated and mounted in DePeX (BDH, 361254D).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed for each cohort of pods separately (STATGRAPHICS Centurion XVI.II Software). Prior to the ANOVAs, residues independency and normality, and homogeneity of variances were previously tested (Dubin-Watson, Shapiro-Wilk, Bartlett and Levene tests respectively). The mean ± se of all measured variables for each temperature modality were indicated by pod cohort and harvest date in Table 1 and Figure 2 (Chap. 3.2.), as well as in Supplemental Data (Tables SD1 and SD2 (Chap. 3.2.)). First, one-way ANOVAs were performed amongst the temperature modalities, to test the effects of temperature on seed yield and quality criteria. Then, mean comparison tests (Tukey tests) were performed amongst the four temperature modalities, by considering each performance-related variable in each harvest date. Finally, t-tests between two successive dates of harvest were performed to identify the dynamics (increase, decrease or stable) of each seed storage compound (Figure 3 (Chap. 3.2.)).

3.2.4. Results

Impacts of heat stress in the final plant performance-related variables

Table 1 (Chap. 3.2.) displays yield components and quality criteria for seeds collected from the three cohorts of pods (i.e. $pods_{L\geq5cm}$, $pods_{L<5cm}$ and $pods_{Flo}$) at the final harvest (133 days after vernalization, DAV). The main performance-related variables at 133 DAV were also presented in a graphic illustration in Figure 2 (Chap. 3.2.).

- *High temperatures slightly impacted yield components*

Seed yield was differently affected by temperature stress according to the pod cohort. For $pods_{L\geq5cm}$ (Table 1 (Chap. 3.2.)), both the seed yield and the seed number did not display significant differences amongst the temperature modalities, whereas TSW was modulated by temperature with all of the stressing modalities leading to higher value than the Control. The early mild stress (EMS) modality led to the highest values at 133 DAV (+20% than the Control). By contrast, for $pods_{L<5cm}$ the temperature significantly affected seed yield and seed number at 133 DAV, but not TSW (Table 1 (Chap. 3.2.)). All the stressing modalities displayed a reduction in seed yield compared to the Control, with RSS and EMS being the most penalizing modalities (-35% and -55% compared to Control, respectively). This trend was mainly a result of the reduction in seed number in $pods_{L<5cm}$, with the EMS being also the most negative treatment (-58% than the Control). No difference in seed yield, seed number and TSW for $pods_{Flo}$ was observed (Table 1 (Chap. 3.2.)), thus indicating that both criteria were set up after

the stress period in this cohort of youth pods. By comparing the three cohorts of pods, seeds from $pods_{L<5cm}$ contributed the most to the final total seed yield, followed by $pods_{Flo}$ and $pods_{L\geq5cm}$ (Table 1 and Figure 2a (Chap. 3.2.)). Consistently, at 133 DAV seeds from $pods_{L\geq5cm}$ represented about 22% of the total seed number (considering the mean of the total seed number as being 2452 seeds, resulting from 544 seeds from $pods_{L\geq5cm}$, 1073 seeds from $pods_{L<5cm}$ and 835 seeds from $pods_{Flo}$). This proportion was expected because the different cohorts of pods were labeled at GS72, that is when 20% of the whole plant pods have reached final size (i.e. $pods_{L\geq5cm}$).

- *Exposition to high temperatures significantly reduced fatty acids*

Different trends were observed for the effects of high temperatures on total FA, UFA and SFA at 133 DAV. Although all the stressing modalities displayed lowest values on FA, UFA and SFA than the Control for seed from $pods_{L\geq5cm}$ (Table 1 (Chap. 3.2.)), these effects were not statistically significant. By contrast, differences amongst temperature modalities were significant to FA, UFA and SFA for $pods_{L<5cm}$ (Table 1 (Chap. 3.2.)), with similar rankings amongst the stressing modalities for the three oil-related variables i.e. Control and 4LHP displaying the highest values, followed by EMS, and finally RSS that led to the lowest values (-22%, -23% and -14% for FA, UFA and SFA compared to Control, respectively). As observed for seeds from $pods_{L\geq5cm}$, no significant temperature effect was observed on the FA and UFA concentrations of seeds from $pods_{Flo}$ (Table 1 (Chap. 3.2.)). By contrast, SFA was modulated by temperature in this cohort of pods, with RSS being the most penalizing treatment (-18% than the Control). By comparing the three cohorts of pods (Figure 2b (Chap. 3.2.)), at 133 DAV the oil content was on average higher for $pods_{Flo}$, followed by $pods_{L<5cm}$ and then $pods_{L\geq5cm}$. Similarly, for the three cohorts of pods the RSS and 4LHP were respectively the most and the least penalizing heat stress sequences to seed oil content. In addition, rankings amongst temperature modalities were observed for the ω6:ω3 ratio, and the most penalizing modalities (i.e. highest ratio values) were different over the three cohorts of pods (i.e. RSS and 4LHP for $pods_{L\geq5cm}$; Ctrl, RSS and 4LHP for $pods_{L<5cm}$; Ctrl, EMS and 4LHP for $pods_{Flo}$). Interestingly, at 133 DAV the ω6:ω3 ratio was on average almost equivalent within the three cohorts of pods (Figure 2c (Chap. 3.2.)).

- *Contrasting trends were observed on seed C, N and S concentrations*

Temperature did not impact C concentration in seeds at 133 DAV, but differences were observed amongst the three cohorts as C concentration was on average higher for $pods_{Flo}$, followed by $pods_{L\geq5cm}$ and $pods_{L<5cm}$ (with means being 54.0, 43.3 and 41.4 %DW respectively; Table 1 (Chap. 3.2.)). By contrast, temperature significantly impacted N concentration in seeds

from $pods_{L\geq5cm}$ and $pods_{L<5cm}$, with RSS and EMS leading to the highest increase in concentration (+31% and +31% for $pods_{L\geq5cm}$, and +28% and +18% for $pods_{L<5cm}$ compared to the Control, respectively; Table 1 (Chap. 3.2.)). The effects of heat stress on S concentration were only significant in seeds from $pods_{L<5cm}$, with the RSS leading to the highest increase (+35% than the Control). Seeds from $pods_{Flo}$ were not affected by temperature in terms of C, N and S concentrations at 133 DAV (Table 1 (Chap. 3.2.)).

- *High temperatures impacted soluble sugars in seeds from youth pods*

At 133 DAV, the significant effects of the temperature sequences were not observed for any soluble sugars in seeds from $pods_{L<5cm}$ and $pods_{L\geq5cm}$. Different rankings for raffinose, and consequently on the [raffinose+stachyose]:sucrose ratio, were observed for the seeds from $pods_{Flo}$ (Table 1 (Chap. 3.2.)). Indeed, raffinose was modulated by high temperatures with all the stressing modalities displaying higher values than the Control, and the RSS treatment being the highest one (+91% compared to Control). The soluble sugars ratio (i.e. [raffinose+stachyose]:sucrose, Figure 2d (Chap. 3.2.)) displayed the lowest value in $pods_{Flo}$ under the EMS treatment (-11% compared to Control), which thus turned to be the most penalizing treatment for the acquisition of the desiccation tolerance. Although no different ranking was observed on stachyose concentration for all of the cohorts of pods, the RSS and 4LHP modalities led to the greatest values (Table 1 (Chap. 3.2.)), thus indicating downstream positive impacts of the late heat peaks on the stachyose synthesis.

Dynamics of the performance-related variables over the intermediate harvests

Figure 2 (Chap. 3.2.) and Supplemental Data (Tables SD1 and SD2 (Chap. 3.2.)) display the yield components and quality criteria for seeds collected from the three cohorts of pods (i.e. $pods_{L\geq5cm}$, $pods_{L<5cm}$ and $pods_{Flo}$) at the intermediate harvests (60 and 76 DAV). Figure 3 (Chap. 3.2.) illustrates the dynamic development of seed storage compounds between two successive dates of harvest (i.e. 60-76 DAV and 76-133 DAV). Figure 4 (Chap. 3.2.) display the seed histological sections of $pods_{L\geq5cm}$ made throughout the stress period for the four temperature modalities. Finally, Figure 5 (Chap. 3.2.) displays the lipids and polysaccharides localization in seed tissues under the control conditions collected at 50, 55, 60 and 67 DAV.

- *High temperatures mostly impacted seed weight over time*

Seed production was not significantly impacted by high temperatures at 60 nor at 76 DAV, whatever the cohort of pods (Figure 2a (Chap. 3.2.)). Significant increases in seed production over time were observed between 60-76 DAV and 76-133 DAV for $pods_{Flo}$, and between 76-

133 DAV for $pods_{L\geq5cm}$ and $pods_{L<5cm}$. By comparing seed numbers amongst harvests for a given cohort of pods, the number of seeds increased significantly between 76-133 DAV for $pods_{Flo}$ only (Figure 3 (Chap. 3.2.)), but not for $pods_{L\geq5cm}$ and $pods_{L<5cm}$ as the number of seeds in these cohorts were almost set up at the stress application (i.e. onset of the seed maturation stage). At 60 DAV (Supplemental Data, Table SD1 (Chap. 3.2.)), the only significant effects of temperature on TSW were observed for seeds from $pods_{L\geq5cm}$ (-16% than the Control) and $pods_{Flo}$ (+39% than the Control), although different rankings were observed for seeds from $pods_{L\geq5cm}$ at later harvests (Table 1 (Chap. 3.2.)). At 76 DAV (Supplemental Data, Table SD2 (Chap. 3.2.)), all of the stressing modalities resulted in reducing TSW of seeds from $pods_{L\geq5cm}$, with the RSS and EMS being the most penalizing modalities (-28% and -31% than the Control, respectively). As observed in histological sections given in Figure 4 (Chap. 3.2.), these declines of TSW in response to heat stress applied after 60 DAV were concomitant with the limitation of embryo growth and filling process.

- *High temperatures impacted oil-related criteria at 76 DAV*

As observed in Figure 5a (Chap. 3.2.), the period between 60-67 DAV was critical to the FA synthesis under Control conditions, in both the embryo and the seed coat. However, its extent and duration were impacted by temperature effects. At 60 DAV (Supplemental Data, Table SD1 (Chap. 3.2.)), temperature effects were not significant on any oil-related criteria (i.e. FA, UFA, SFA and the ω6:ω3 ratio) for all the cohorts of pods, thus indicating that the critical period for oil content establishment in seeds occurred afterwards. As expected, FA content was on average higher for $pods_{L\geq5cm}$, followed by $pods_{L<5cm}$ and $pods_{Flo}$ at 60 DAV (Figure 2b (Chap. 3.2.)). Significant increases in FA were observed for all of the cohorts of pods between 60-76 DAV, while only for $pods_{L<5cm}$ and $pods_{Flo}$ between 76-133 DAV (Figures 2 and 3 (Chap. 3.2.)). At 76 DAV (Supplemental Data, Table SD2 (Chap. 3.2.)), opposite rankings amongst temperature modalities were observed for FA, UFA and SFA in seeds from $pods_{L\geq5cm}$ and $pods_{Flo}$. Indeed, for seeds from $pods_{L\geq5cm}$, the 4LHP treatment presented the greatest values, with FA, UFA and SFA being almost equivalent to the Control, while RSS and EMS were the most penalizing modalities. By contrast, for seeds from $pods_{Flo}$ all of the stressing modalities led to greater values in FA, UFA and SFA than the Control. In addition, the UFA concentration increased over time following the same trends observed to the FA concentration. This was not observed for SFA, which increased between 60-76 DAV for the three cohorts, but decreased between 76-133 DAV for $pods_{L<5cm}$. In line with these observations, the ω6:ω3 ratio was impacted by temperatures in the three cohorts of pods at 76 DAV (Figure 2c (Chap. 3.2.)). For $pods_{L\geq5cm}$, 4LHP was the most impacting treatment by increasing the ratio (+20% than the

Control). By contrast, the ω6:ω3 ratio was significantly reduced by RSS and EMS events for $pods_{L<5cm}$, and by RSS and 4LHP modalities for $pods_{Flo}$ when compared to the Control (Figure 2c (Chap. 3.2.)). By comparing the three cohorts of pods, at 60 and 76 DAV the ω6:ω3 ratio was on average higher for seeds of $pods_{Flo}$, followed by $pods_{L<5cm}$ and $pods_{L\geq5cm}$.

- *Nitrogen and Sulphur were impacted by high temperatures at 76 DAV, but not Carbon*

From 60 DAV until the final harvest, the concentrations in C, N and S almost barely changed (Figure 3 (Chap. 3.2.)). A significant increase in C concentration over time was observed between 60-76 DAV for seeds from $pods_{L<5cm}$ only, but temperatures also did not impacted C in any cohorts of pods at 60, 76 nor 133 DAV. Prior to 60 DAV (Supplemental Data, Table SD1 (Chap. 3.2.)), no temperature effects were observed on N concentrations whereas contrasting rankings were observed on seeds from $pods_{L\geq5cm}$ and $pods_{L<5cm}$ at 76 DAV, with all of the stressed plants displaying a higher N than the Control (Supplemental Data, Table SD2 (Chap. 3.2.)). N concentration increased between 60 and 76 DAV only on seeds from $pods_{Flo}$ under RSS; and between 76 and 133 DAV on seeds from $pods_{L\geq5cm}$ under EMS, and from $pods_{L<5cm}$ under RSS. For S concentration, the only significant increases were observed for seeds from $pods_{Flo}$ between 60-76 DAV under RSS, and between 76-133 DAV under EMS. In addition, temperature effects were only significant in seeds from this cohort at 76 DAV (Supplemental Data, Table SD2 (Chap. 3.2.)), with RSS and EMS displaying the greater values of S concentration (+40% and +50% than the Control, respectively).

- *Contrasting trends were observed to sugar-related variables over time*

Impacts of heat stress in sugar-related variables were highly dependent on the cohort of pods and the heat stress sequences. For $pods_{L\geq5cm}$, high temperatures increased the raffinose and sucrose concentrations at 60 DAV only (+60% and +87% than the Control, respectively, Supplemental Data, Table SD1 (Chap. 3.2.)). At 76 DAV (Supplemental Data, Table SD2 (Chap. 3.2.)), heat stress impacted stachyose and the soluble sugars ratio (i.e. [raffinose+stachyose]: sucrose, Figure 2d (Chap. 3.2.)) in this cohort of pods, with RSS and 4LHP displaying the greatest values for both variables. For $pods_{L<5cm}$, high temperatures did not impact any sugar-related criteria, whatever the harvest time (Supplemental Data, Tables SD1, SD2 (Chap. 3.2.)). For $pods_{Flo}$, raffinose concentration was impacted at 60 and 76 DAV, with all of the stressed modalities displaying lower values than the Control. Interestingly, a significant reduction in raffinose between 76-133 DAV was observed in seeds from plants grown under natural thermoperiod (Control). For sucrose concentration, differences were observed only at 76 DAV (Supplemental Data, Table SD2 (Chap. 3.2.)), with the 4LHP treatment displaying the lower values (-68% compared to the Control). The biosynthesis of stachyose started later in the crop

cycle, as its value was zero for the three cohorts of pods at 60 DAV, and remained almost inexistent for $pods_{Flo}$ and $pods_{L<5cm}$ until 76 DAV whereas it started increasing for $pods_{L\geq5cm}$, with a pronounced effect under the conditions with heat peaks (RSS and 4LHP). These observations altogether indicate that the older the pods, the earlier the stachyose biosynthesis during the filling stage and that high temperature tends to accelerate its occurrence. In contrast to the effect of temperature on the [raffinose+stachyose]:sucrose ratio in seeds from $pods_{L\geq5cm}$, seeds from $pods_{Flo}$ displayed a lower [raffinose+stachyose]:sucrose ratio than the Control under all of the stressed modalities (Figure 2d (Chap. 3.2.)). Regarding the histological analyses, Figure 5b (Chap. 3.2.) showed that the period between 60-67 DAV was critical to polysaccharide accumulation in seeds, with glycopolymers being present not only in the embryo and the seed coat, but also in the other seed tissues (i.e. endosperm, endothelium).

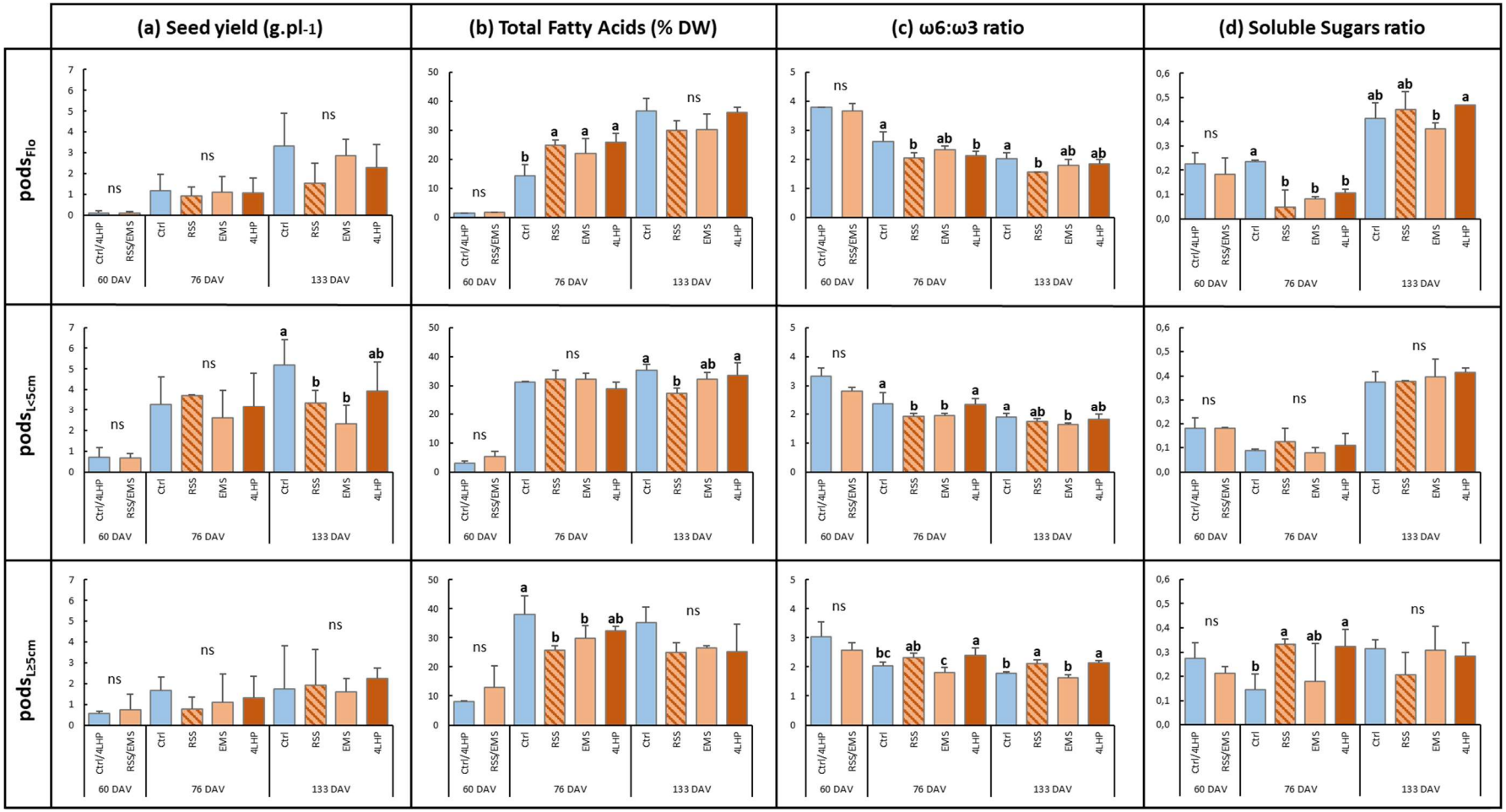


Figure 2 (Chap. 3.2.) : Matrix of results by crossing the main seed performance-related variables (a, b, c, d) measured at three different harvest dates (i.e. 60, 76 and 133 DAV) in the three different pod cohorts in oilseed rape (i.e. $pods_{L\geq5cm}$, $pods_{L<5cm}$ and $pods_{Flo}$). Colored bars represent each temperature modality at a given harvest date, and the associated standard error. Letters indicate the ranking amongst the temperature modalities when the Tukey tests were significant for a given harvest date. DAV: days after vernalization; ns: non-significant; Ctrl: Control; RSS: Repeated Stresses Sequence; EMS: Early Mild Stress; 4LHP: 4 Late Heat Peaks.

Quality criteria	Temperature Modality	Seeds from pods L≥5cm			Seeds from pods L<5cm			Seeds from pods Flo		
		60 DAV	76 DAV	133 DAV	60 DAV	76 DAV	133 DAV	60 DAV	76 DAV	133 DAV
Total FA	Ctrl	+	=		+	+		+	+	
	RSS	+	=		+	=		+	=	
	EMS	+	=		+	=		+	=	
	4LHP	+	=		+	=		+	+	
UFA	Ctrl	+	=		+	+		+	+	
	RSS	+	=		+	=		+	=	
	EMS	+	=		+	=		+	=	
	4LHP	+	=		+	=		+	+	
SFA	Ctrl	+	=		+	-		+	=	
	RSS	=	=		+	-		+	=	
	EMS	=	-		+	-		+	=	
	4LHP	+	=		+	=		+	=	
Carbon	Ctrl	=	=		+	=		=	=	
	RSS	=	=		+	=		=	=	
	EMS	=	=		+	=		=	=	
	4LHP	=	=		+	=		=	=	
Nitrogen	Ctrl	=	=		=	=		=	=	
	RSS	=	=		=	+		+	=	
	EMS	=	+		=	=		=	=	
	4LHP	=	=		=	=		=	=	
Sulphur	Ctrl	=	=		=	=		=	=	
	RSS	=	=		=	=		+	=	
	EMS	=	=		=	=		+	=	
	4LHP	=	=		=	=		=	=	
Raffinose	Ctrl	=	=		=	=		=	-	
	RSS	=	=		-	=		=	=	
	EMS	=	=		=	=		=	=	
	4LHP	+	=		=	=		=	+	
Stachyose	Ctrl	=	=		=	+		na	+	
	RSS	+	=		na	+		na	+	
	EMS	=	+		na	+		na	+	
	4LHP	+	=		=	+		na	+	
Sucrose	Ctrl	=	=		=	=		=	=	
	RSS	+	=		=	+		=	=	
	EMS	=	=		=	=		=	=	
	4LHP	+	=		=	=		-	=	

Figure 3 (Chap. 3.2.) : Illustration of the dynamic development of seed storage compounds in the three different cohorts of pods (i.e. $pods_{L\geq5cm}$, $pods_{L<5cm}$ and $pods_{Flo}$), and over the three harvest dates (i.e. 60, 76, and 133 DAV). T-tests between two successive dates of harvest (i.e. 60 *vs* 76 DAV, and 76 *vs* 133 DAV) were analyzed to determine periods over which the concentration of a given seed compound remained stable, meaning that its synthesis was achieved. Tendencies were illustrated by symbols i.e. (+) for increase, (=) for stable, (-) for reduction, and (na) when not applicable due to the lack of replicates at 60 DAV. DAV: days after vernalization; FA: fatty acids; UFA: unsaturated FA; SFA: saturated FA; Ctrl: Control; RSS: Repeated Stresses Sequence; EMS: Early Mild Stress; 4LHP: 4 Late Heat Peaks.

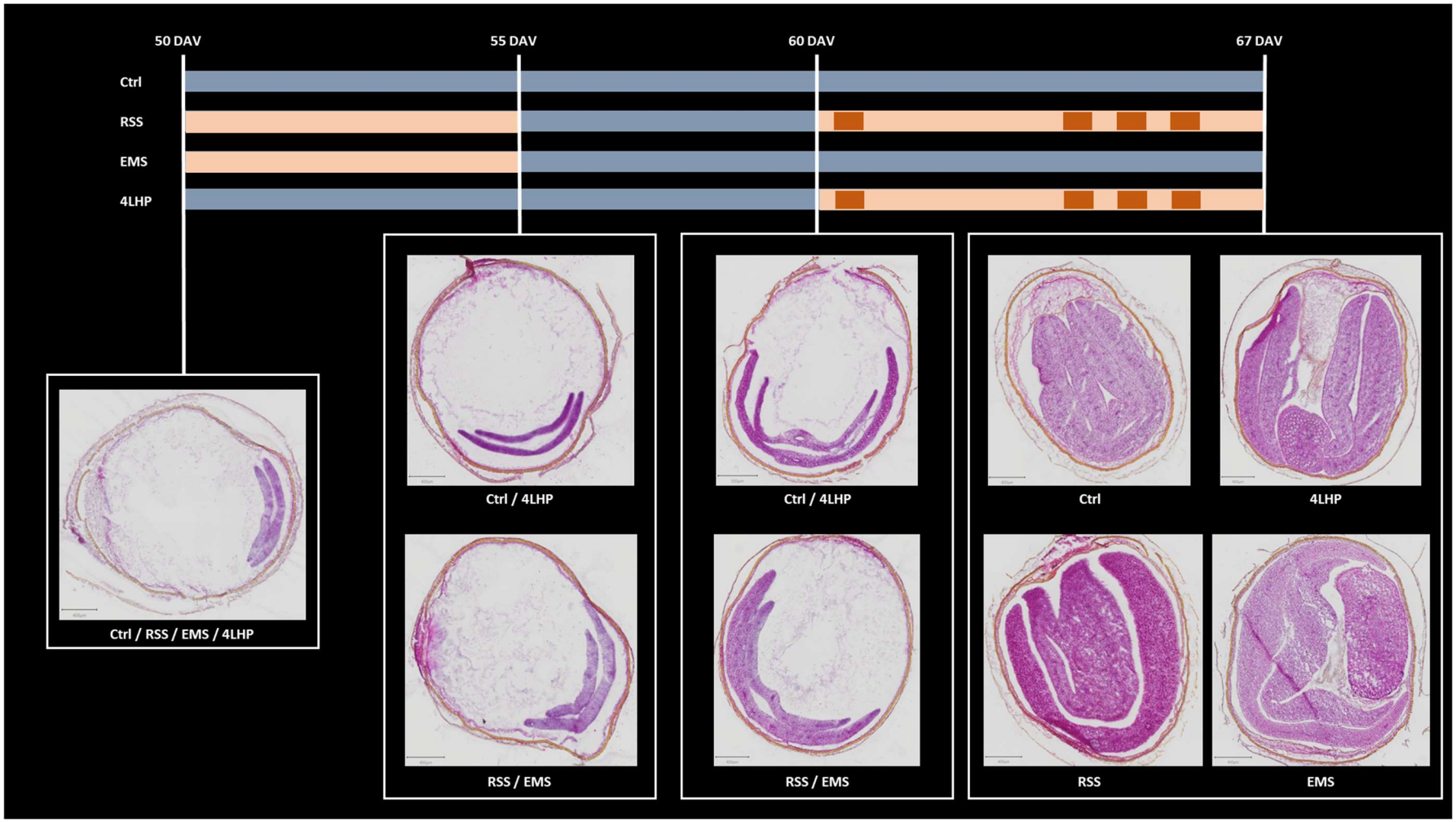


Figure 4 (Chap. 3.2.) : Histological sections of seeds from pods$_{L \geq 5cm}$ stained with Hematoxylin and Eosin (HE) for visualization of the internal development of seeds exposed to different temperature modalities, collected in four different harvest dates (i.e. 50, 55, 60, and 67 DAV). DAV: days after vernalization; Ctrl: Control; RSS: Repeated Stresses Sequence; EMS: Early Mild Stress; 4LHP: 4 Late Heat Peaks.

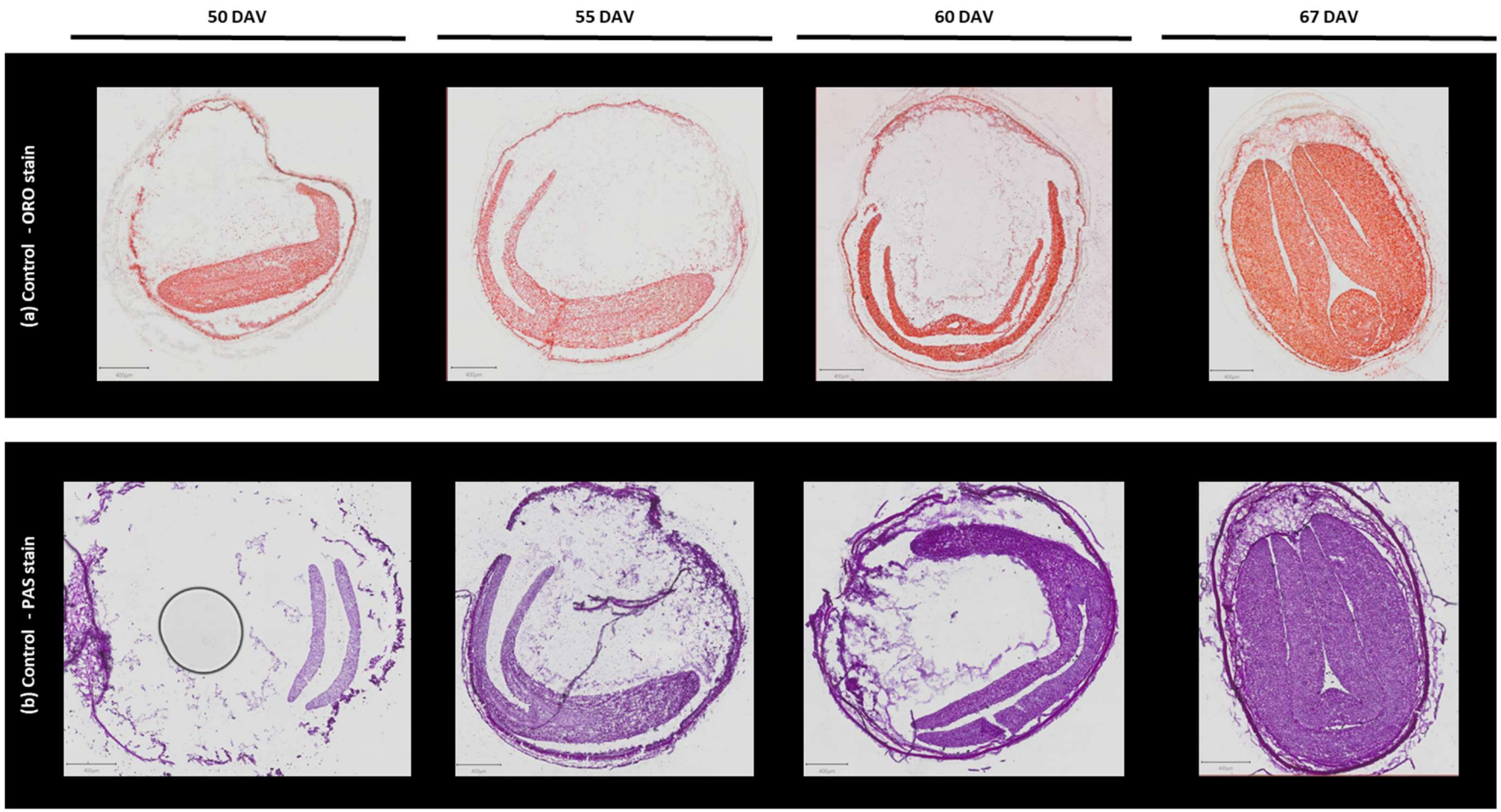


Figure 5 (Chap. 3.2.) : Histological sections of seeds from pods$_{L \geq 5cm}$ exposed to natural thermoperiod in the greenhouse (i.e. the Control) collected in four different harvest dates (i.e. 50, 55, 60, and 67 DAV). Blades were stained with (a) Oil Red O (ORO) and (b) Periodic acid-Schiff (PAS) for lipid and polysaccharide visualization, respectively. DAV: days after vernalization.

Table 1 (Chap. 3.2.) : Yield components and quality related variables measured in **seeds from pods$_{L\geq5cm}$, pods$_{L<5cm}$** and **pods$_{Flo}$** (i.e. inflorescences at the beginning of stress exposure or that appeared after the whole stress sequence), at the final harvest (133 days after vernalization (DAV)). Temperature modalities were Ctrl: Control, RSS: Repeated Stresses Sequence, EMS: Early Mild Stress, and 4LHP: 4 Late Heat Peaks. Letters indicate the ranking among the temperature modalities when the Tukey tests were significant for a given date of harvest. The p-values indicate the level of significance of the temperature effect, i.e. *ns: non-significant, p < 0.05*, p < 0.01**, p < 0.001****. se: standard error; nb: number; TSW: thousand seed weight; DW: dry weight; FA: fatty acids; UFA: unsaturated FA; SFA: saturated FA.

	Yield components			Oil content and fatty acids				Seed C, N and S concentrations			Soluble sugars			
133 DAV	**Seed yield** (g.plant^{-1})	**Seed nb** (per plant)	**TSW** (g)	**Total FA** (%DW)	**UFA** (%DW)	**SFA** (%DW)	**ω6:ω3 ratio**	**Carbon** (%DW)	**Nitrogen** (%DW)	**Sulphur** (%DW)	**Raffinose** (%DW)	**Stachyose** (%DW)	**Sucrose** (%DW)	**Sugars ratio**
Seeds from pods$_{Flo}$														
Ctrl	3.31	1039	3.15	36.80	33.96	2.84 ab	2.02 a	50.17	2.72	0.26	0.11 b	0.54	1.59	0.41 ab
RSS	1.54	565	2.67	29.95	27.61	2.33 c	1.56 b	56.41	3.69	0.41	0.21 a	0.82	2.35	0.45 ab
EMS	2.84	921	3.10	30.26	27.79	2.47 bc	1.81 ab	44.30	2.86	0.33	0.14 ab	0.52	1.91	0.37 b
4LHP	2.27	816	2.77	36.20	33.32	2.88 a	1.84 ab	65.57	2.83	0.23	0.13 ab	0.74	1.88	0.47 a
se	*1.11*	*363*	*0.30*	*3.67*	*3.50*	*0.19*	*0.14*	*12.00*	*0.43*	*0.07*	*0.04*	*0.23*	*0.80*	*0.04*
p-value	*0.25 ns*	*0.30 ns*	*0.21 ns*	*0.11 ns*	*0.12 ns*	*0.03 **	*0.05 **	*0.28 ns*	*0.20 ns*	*0.18 ns*	*0.13 ns*	*0.38 ns*	*0.74 ns*	*0.15 ns*
Seeds from pods L$_{<5cm}$														
Ctrl	5.20 a	1429 a	3.79	35.33 a	32.48 a	2.85 a	1 .88 a	42.08	2.56 c	0.26 c	0.16	0.72	2.43	0.37
RSS	3.38 b	1072 ab	3.17	27.39 b	24.94 b	2.45 b	1.75 ab	39.71	3.29 a	0.35 a	0.23	1.06	3.41	0.38
EMS	2.32 b	605 b	3.79	32.32 ab	29.68 ab	2.63 ab	1.64 b	40.82	3.01 ab	0.31 b	0.14	0.62	2.06	0.40
4LHP	3.95 ab	1187 a	3.37	36.46 a	30.68 a	2.79 a	1.82 ab	43.01	2.88 bc	0.25 c	0.16	0.82	2.41	0.41
se	*1.03*	*347*	*0.41*	*2.58*	*2.48*	*0.13*	*0.11*	*1.92*	*0.15*	*0.02*	*0.06*	*0.26*	*0.99*	*0.03*
p-value	*0.02 **	*0.05 **	*0.14 ns*	*0.04 **	*0.04 **	*0.04 **	*0.15 ns*	*0.35 ns*	*0.00 ****	*0.00 ****	*0.61 ns*	*0.52 ns*	*0.69 ns*	*0.45 ns*
Seeds from pods L$_{\geq5cm}$														
Ctrl	1.76	497	3.15 b	35.14	32.18	2.96	1.79 b	43.78	2.90 b	0.28	0.10	0.63	2.26	0.31
RSS	1.93	615	3.38 ab	25.07	22.68	2.39	2.12 a	43.31	3.82 a	0.40	0.10	0.34	2.47	0.21
EMS	1.59	418	3.79 a	26.50	24.27	2.22	1.62 b	44.69	3.77 a	0.38	0.06	0.30	1.11	0.31
4LHP	2.24	647	3.46 ab	25.36	22.85	2.51	2.14 a	41.47	3.43 ab	0.35	0.14	0.53	2.38	0.28
se	*1.24*	*355*	*0.36*	*4.66*	*4.27*	*0.40*	*0.09*	*3.06*	*0.27*	*0.07*	*0.08*	*0.21*	*1.17*	*0.07*
p-value	*0.92 ns*	*0.84 ns*	*0.17 ns*	*0.17 ns*	*0.15 ns*	*0.34 ns*	*0.00 ****	*0.67 ns*	*0.02 **	*0.59 ns*	*0.71 ns*	*0.37 ns*	*0.57 ns*	*0.34 ns*
Seeds from the whole plant														
Ctrl	7.66 ab	2153	3.70	35.81 a	32.97 a	2.84 a	1.95 a	45.57 ab	2.62 c	0.26 b	0.15	0.69	2.27	0.38
RSS	6.03 ab	1942	3.10	28.14 b	25.75 b	2.39 b	1.71 b	46.47 ab	3.49 a	0.38 a	0.17	0.71	2.23	0.33
EMS	4.77 b	1386	3.55	39.81 b	27.34 b	2.47 b	1.75 ab	39.84 b	3.16 ab	0.35 a	0.12	0.49	1.72	0.37
4LHP	7.73 a	2333	3.31	33.21 ab	20.41 ab	2.80 a	1.91 ab	48.99 a	2.94 bc	0.26 b	0.13	0.66	1.96	0.42
se	*1.83*	*620*	*0.39*	*3.90*	*3.66*	*0.25*	*0.15*	*4.92*	*0.40*	*0.06*	*0.04*	*0.19*	*0.66*	*0.07*
p-value	*0.13 ns*	*0.29 ns*	*0.26 ns*	*0.03 **	*0.04 **	*0.02 **	*0.10 ns*	*0.11 ns*	*0.02 **	*0.00 ***	*0.51 ns*	*0.54 ns*	*0.77 ns*	*0.63 ns*

3.2.5. Discussion

The discussion aims to address both central questions of this study: (i) what are the critical periods for seed storage compounds biosynthesis and maturation? and (ii) how the features of heat stress sequences in terms of intensity, duration, timing and frequency impact seed development in oilseed rape?

The major role of the embryo in seed yield and quality acquisition

Oilseed rape shares many similarities with *Arabidopsis thaliana*, a Brassica model species for which embryo development from the early embryogenesis to late seed maturation have been widely documented (Baud et al., 2002; Borisjuk et al., 2013; Fait et al., 2006). As observed in the histological sections (Figures 4 and 5 (Chap. 3.2.)), the cotyledons keep growing and filling the volume of the seed during the torpedo stage until the end of embryonic development (Bewley et al., 2013), and the embryo develops at the expense of the endosperm which is mostly digested by the two cotyledons. The embryo growth is limited by the available internal volume in the seed, and at maturity the outer cotyledon can represent more than half of the fresh weight of the embryo (Borisjuk et al., 2013). Indeed, the period after 60 DAV, which matched the period of the plant exposure to mild stress and/or heat peaks depending on the stress sequences, seems to be critical for the embryo growth and the filling process (Figure 4 (Chap. 3.2.)), thus potentially reducing the yield components. Moreover, this spatial occupancy also underlies the key role of embryo in the deposit of dry matter and seed storage compounds which are determining for quality-related variables. While flowering is a critical period for seed set, seed maturation which includes seed reserve accumulation, along with desiccation and dormancy induction, is determining for seed fresh and dry weights, thus potentially impacting the total yield (Angadi et al., 2000; Habekotté, 1997b; Leprince et al., 2017). During the seed filling stage, which is concomitant with late maturation in Brassica species (Leprince et al., 2017; Righetti et al., 2015), the photosynthetic embryo actively accumulates reserves (Rolletschek et al., 2003; Tschiersch et al., 2011). Seed filling in Brassica lasts until final maturation and overlaps the acquisition of physiological quality-related criteria (i.e. longevity, germinative vigor, storage capacity and dormancy). Therefore, successive stress exposure at the seed development stages can potentially impacts fatty acids profiles, proteins, soluble sugars and hormones.

Specificities of heat stress-triggered yield changes in indeterminate growth species

Due to the indeterminate growth of oilseed rape, the flowering and seed development stages overlap and spread over several weeks in the crop cycle. More specifically, this means that pods, and thus seeds, of different ages are present at the same time on the plant which implies that when a stressful event occurs, its magnitude effect may differ according to the age of the pods. Observed results on seed yield and seed components highlighted the age-dependent features of plant's critical periods. Seed yield at the final harvest (i.e. 133 DAV) was impacted by heat stress only for the cohort of $pods_{L<5cm}$ (Table 1 and Figure 2 (Chap. 3.2.)). This was partially accounted for by a reduction of the seed number in $pods_{L<5cm}$, as the seed number is promptly set up over the first 300-400 growing degree days from the onset of flowering (Angadi et al., 2000; Corlouer et al., 2019; Habekotté, 1997b; Jullien et al., 2011). Indeed, the most important period for seed set was shown to be concomitant to the flowering period (Habekotté, 1993), which was also pointed as being a critical period to heat stress for final yield (Weymann et al., 2015). Consistently, the number of seeds from $pods_{L\geq5cm}$ was not impacted by heat stress, as these older pods contained late maturing seeds during the stress exposure.

Therefore, stressful events occurring during the embryo growth can potentially impair its development and the filling of the seed, thus leading to the reduction in individual seed weight as observed in the other cohorts of pods. Finally, no stress effects were observed on yield components in seeds from $pods_{Flo}$, corresponding to the last cohort of pods that developed from flowers present during or that appeared after the stress sequence. Indeed, the prior heat stress events might have increased pollen infertility and/or pods abortion in this cohort (Young et al., 2004), but these effects were eventually not statistically significant in the final seed production when compared to the Control. Overall, the absence of temperature effects in total seed yield observed for several harvest dates and specific cohorts of pods highlights compensatory mechanisms that raise the question of phenotypic plasticity in indeterminate growth species. As observed in other studies (Aksouh-Harradj et al., 2006; Labra et al., 2017; Magno et al., 2021; Zheng et al., 2022b), yield losses in oilseed rape caused by environmental factors can be partially compensated by later-formed pods in terms of seed number and/or seed weight, thus resulting in a non-significant stress effect on the final seed yield at the plant scale.

Physiological processes involved in the acquisition of seed quality

In oilseed rape, the flowering stage is followed by an increase in leaf senescence, thus reducing the amount of CO_2 fixed by the leaves. From this stage until the end of crop cycle, the pods ensure most of of the photosynthetic activity, and consequently the production of carbohydrate reserves to sustain seed development. Seed storage compounds in developing seeds are mostly synthesized from C and N molecules supplied by the mother plant through the pods, transferred into the seed mainly in the form of carbohydrates and free amino acids. The amounts of assimilates imported into the seeds that were synthesized by the pods during their development can account for 60% of the total assimilate for seed filling (Bennett et al., 2011; Bewley et al., 2013; Diepenbrock, 2000), whereas only 12–17.5% of reserve carbohydrates come from the remobilization by the vegetative organs (Habekotté, 1993).

Results in Table 1 (Chap. 3.2.) and Supplemental Data (Tables SD1 and SD2 (Chap. 3.2.)) showed that heat stress did not impact seed C concentration in any cohort of pods. Usually there is a strong relationship between seed C and FA concentrations, but this was not always observed in our data (133 DAV, $pods_{Flo}$ vs $pods_{<5cm}$), probably because heat stress induced changes in the balance between C used for the synthesis of FA or proteins (Kambhampati et al., 2020). In addition, translocation of N compounds seems to be a key driver of pods and seeds ontogenesis (Diepenbrock, 2000). During the filling phase, free amino acids from the mother plant are metabolized to synthesize the precursors of reserve proteins (Fait et al., 2006). In contrast to C, which is mostly synthesized by the pods during development, the N supplied by the mother plant is usually derived from the degradation and the remobilization of proteins synthesized in vegetative tissues before seed development which represents about 70% of the supplied N at mid-flowering (Diepenbrock, 2000). Our results showed that heat stress increased N concentration in seeds from $pods_{L\geq5cm}$ and $pods_{L<5cm}$ at 76 and 133 DAV (respectively 9 and 66 days after the end of the heat stress sequence, Table 1 (Chap. 3.2.) and Supplemental Data, Table SD2 (Chap. 3.2.)), which highlighted that high temperatures might have favored the degradation of proteins in the plant, the translocation of N compounds into the seed and, eventually, the metabolism of precursors of reserve proteins, suggesting an improvement of N remobilization efficiency in oilseed rape. In addition, it is well-known that the responses of plants to heat stress include the synthesis of heat shock proteins (HSPs) and other stress-related proteins (Ali et al., 2020; Hassan et al., 2021; Wahid et al., 2007), that might also contribute to the observed higher protein contents in the present study. As N concentration in seed is a proxy of total seed protein content (Ezeagu et al., 2002), our results led to conclude that heat stress can induce a higher protein content in seeds from advanced

and intermediate-aged pods exposed to high temperature at the filling stage, as observed in previous studies (Magno et al., 2021, 2022a). In addition, S concentration increased in seeds from $pods_{L<5cm}$, in response to EMS and RSS modalities (up to +35% than the Control; Table 1 (Chap. 3.2.)), thus confirming that protein synthesis is well supported. Moreover, the synthesis of seed reserve proteins (e.g. mainly napins, rich in S-amino acids, and cruciferins in oilseed rape) occurs in parallel with the synthesis of lipids (as observed in *Arabidopsis thaliana*, Baud et al., 2002). This concomitance results in spatial and energy resources competition (Borisjuk et al., 2013), which leads to seed negative correlation between protein and oil concentrations, as highlighted in several previous studies (Kambhampati et al., 2020; Magno et al., 2021, 2022a; Si et al., 2003). This trade-off between lipids and proteins was also observed in the present study under heat stress conditions, especially within the EMS and RSS modalities for which the fatty acid contents decreased while the protein contents increased (using N content as an indicator) for all of the cohorts at the final harvest (i.e. 133 DAV, Table 1 (Chap. 3.2.)).

Fatty acids metabolism in seeds is also tightly related to starch and oxygen availability. In seeds of *Arabidopsis thaliana*, starch is accumulated from the end of embryogenesis and almost completely degraded during the seed filling phase (Baud et al., 2002), during which starch represents the first pool of reserves. Oil accumulation is completed when the embryo reaches its final size and occupies the entire volume of the seed (Borisjuk et al., 2013). The biosynthesis of FA and its profiles in seeds are determined by the levels of oxygen concentration. It has been showed that the temperature intensity modifies the unsaturation degree of FA through its effect on dissolved oxygen levels in the developing seed, which negatively impacts the desaturases activity and eventually favors linoleic acid content at the expense of poly-UFAs (Baux et al., 2008; Gauthier et al., 2017; Schulte et al., 2013). Indeed, Oleoyl-phosphatidylcholine desaturase (FAD2) is a key enzyme involved in fatty acid desaturation in oilseeds, which was demonstrated to be regulated *in vivo* via temperature-dependent endogenous oxygen concentrations in developing seeds of sunflower (Rolletschek et al., 2007). As this phenomenon seems to be instantaneous, and the effect of temperature on endogenous oxygen is fully reversible when the temperature intensity returns to non-stressing levels, it can potentially explain the delayed effect of heat stress in oil concentration observed in seeds from $pods_{L<5cm}$ (Figure 2b (Chap. 3.2.)). The increase in the ω6:ω3 ratio, especially in seeds from $pods_{L\geq5cm}$ (Figure 2c (Chap. 3.2.)), also highlighted that the proportions of UFA were reduced under high temperatures. Interestingly, the total oil content in seeds from $pods_{L\geq5cm}$ was reduced from 76 to 133 DAV, in contrast to seeds from $pods_{Flo}$, for which oil content continuously increased until the end of the crop cycle. These results

highlighted the importance of considering the three cohorts of different age, as they faced heat stress at different stages of the seed development. As documented in *Arabidopsis thaliana*, this decrease in oil content at the end of seed maturation is due to a remobilization of energy sources at the end of seed development, so as to ensure the final maturation of the seed independently of the other plant parts (Baud et al., 2002).

As described previously, photo-assimilates are mainly transferred into the seeds in the form of carbohydrates (i.e. sucrose). During the early embryonic stages, the sucrose is hydrolyzed into hexoses (i.e. glucose and fructose) by invertases, and it is the main energy supplier (Angeles-Núñez and Tiessen, 2011). These dynamics were observed in Control seeds from $pods_{L<5cm}$, for which the seed sucrose content decreased from 60 to 76 DAV (Supplemental Data, Tables SD1 and SD2 (Chap. 3.2.)), and then increased at 133 DAV (Table 1 (Chap. 3.2.)) likely due to a reduction of invertases activity that occurred at the end of the crop cycle. At this stage, sucrose was directly transferred into the embryo and actively used for the synthesis of storage compounds as described before. Heat stress increased the sucrose between 60 and 76 DAV under EMS and 4LHP in seeds from $pods_{<5cm}$, thus suggesting a heat-induced impairment of invertase activity (Supplemental Data, Tables SD1 and SD2 (Chap. 3.2.)). In seeds, carbohydrates can also be present as oligosaccharides, such as the galacto-oligosaccharides raffinose (trisaccharides composed of fructosyl glucosyl and galatosyl residues) and stachyose (tetrasaccharide composed of fructosyl, glucosyl and two galactosyl residues). These soluble sugars were shown to be involved in seed desiccation tolerance and the [raffinose+stachyose]:sucrose ratio was demonstrated to be a proxy of desiccation tolerance acquisition (Bailly et al., 2001). Our results highlighted that stachyose was synthetized later in the developing seeds, such that its presence was detected before the final harvest in seeds from the oldest cohort of pods only (i.e. $pods_{L\geq5cm}$). Previous results performed in advance-aged pods showed a decrease in the [raffinose+stachyose]:sucrose ratio under heat stress compared to control conditions, consistent with the alteration of the integrity of cell membranes evidenced by a higher seed conductivity measured for this cohort of pods (Brunel-Muguet et al., 2015b; Magno et al., 2021, 2022a). These observations indicate again the importance of considering the specific growth patterns of indeterminate growth species.

The effects of heat stress depend on their intrinsic features over time

As expected in long-cycle species, the duration of seed development in oilseed rape is longer than other economically important crops, which consequently subjects the seed filing and maturation stages to potential spring heat stresses. Heat events before 60 DAV (Supplemental

Data, Table SD1 (Chap. 3.2.)) only impacted TSW, raffinose and sucrose in seeds from old pods (i.e. $pods_{L\geq5cm}$), and TSW and raffinose in youth pods (i.e. $pods_{Flo}$). These results indicate that either there was a direct negative impact of early heat stress on seed development in $pods_{L\geq5cm}$ or indirect delayed effects on seed development in $pods_{Flo}$. These hypotheses could be verified when analyzing the effects of the heat stress modalities at 76 DAV (i.e. 9 days after the end of the stress sequence, Supplemental Data, Table SD2 (Chap. 3.2.)). Indeed, the EMS and RSS treatments were the most impacting for several performance-related variables, such as TSW, Total FA, UFA and SFA on seeds from $pods_{L\geq5cm}$, thus highlighting that the early mild stress probably induced a negative impact on seed development. Finally, the results at the final harvest (i.e. 133 DAV, Table 1 (Chap. 3.2.)) highlighted the differences between the three cohorts of pods. Indeed, seeds from the oldest pods (i.e. $pods_{L\geq5cm}$) displayed the lowest oil content and the highest N content, thus indicating that heat stress impacted seed development during the filling stage and that these advanced-aged seeds did not compensate the effects of heat stress after the exposure to the stressing sequences. Seeds from mid-aged pods (i.e. $pods_{L<5cm}$) were the most impacted by the heat stress sequences at the final harvest as seed yield, seed number, all the oil-related variables and nitrogen were penalized. This cohort was affected by heat stress during the seed set phase, but also at the onset of the filling stage, thus impacting both yield and quality-related criteria. On the opposite, for youth pods which underwent heat stress at the flowering stage (i.e. $pods_{Flo}$), the impacts of heat stress were observed only on SFA, ω6:ω3 ratio, raffinose and on the soluble sugars ratio. Seed development for this youth cohort of pods was probably accelerated by heat stress, especially by the early mild stress event (i.e. in both EMS and RSS protocols). As observed in previous results (Magno et al., 2021, 2022a), the 4LHP modality was the least penalizing stress sequence, as seeds from 4LHP had similar characteristics to seeds from Control in several combinations of cohort of pods and harvest date.

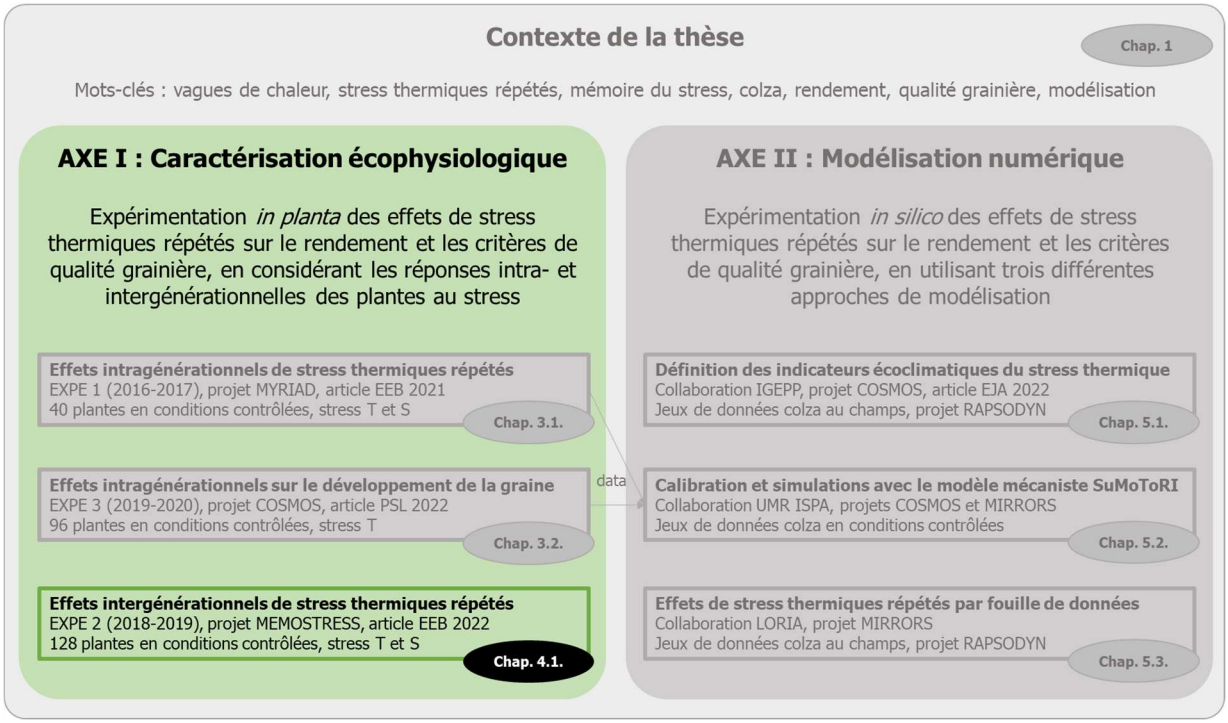
3.2.6. Conclusion

Overcoming heat stress remains a major challenge for sustainable crop production under warm climate. In general, the survival of plants exposed to heat stress depends on their ability to perceive the heat stimulus, to generate and transmit signals, and to respond appropriately. Dynamic harvests combining biochemical and histological analyses were performed under three heat stress sequences in order to better understand the dynamics of seed development which are determining for yield components and seed storage compounds signature that reflects seed quality. The main objective was to demonstrate that the effects of multiple heat

stress events applied to developing seeds of *Brassica napus* L. can greatly vary according to the timing, the duration, the intensity and the frequency of each event. Our results pointed out (i) the importance of taking into account the specific features of indeterminate growth species, as the mixed-aged reproductive organs present in the plant during stress exposition were not affected within the same range; (ii) possible delayed effects of stressful events as specific crop performance-related variables were not impacted immediately after the stress exposure but later in the seed development, as a consequence of downstream events that involved enzymes, hormones and/or their precursors ; and (iii) intrinsic features of heat waves i.e. timing, frequency, duration and intensity which impact seed development to varying extents according to age of pods.

Moreover, this work combines biochemical and histological approaches, which has never been done before in oilseed rape under repeated heat stress conditions. Indeed, when heat stress occurs upon seed set - even though its intensity is mild - it affects mostly yield components; whereas when heat stress occurs later during seed filling, it impacts directly the contents of primary metabolites (amino acids, organic acids and soluble sugars) and their mobilization for the synthesis of energy reserves. Interestingly, the heat stress modalities tested in the present study also induced a re-orchestration of seed metabolism that leads to an accumulation of proteins at the expense of lipids (RSS and EMS modalities), confirming their strong impact on seed nutritional quality. Changes in temperature involves a wide range of metabolic processes, thus suggesting that metabolomics approaches may help to explore the complexity of delayed effects of successive heat stress on crop performances and seed quality in oilseed rape.

Chapitre 4 :
Effets des stress répétés sur deux générations successives



4.1. Effets des stress thermiques répétés sur le rendement et la qualité grainière du colza sur deux générations de plantes stressées

4.1.1. Préambule

Ce chapitre présente les résultats obtenus suite à l'Expérimentation 2 (EXPE 2, 2018-2019, projet MEMOSTRESS). Une culture du colza d'hiver sous différentes modalités de stress thermique et deux apports contrastés en soufre (High Sulphur [HS] et Low Sulphur [LS]) a été réalisée en conditions contrôlées, pour l'analyse du rendement et de la qualité grainière à maturité, ainsi que de la vigueur de germination des graines issues de deux générations des plantes stressées. Les graines utilisées pour cette culture proviennent de plantes soumises aux stress thermiques lors de l'Expérimentation 1 (EXPE 1, 2016-2017). Il s'agit donc de la culture dédiée à l'analyse de l'effet des stress thermiques répétés au cours de deux générations consécutives de plantes stressées (i.e. mémoire intergénérationnelle). La culture en serre a été réalisée avant mon arrivée au laboratoire pour la thèse, tandis que la récolte à maturité, les analyses biochimiques, l'acquisition des données, les analyses statistiques des résultats et la rédaction d'un article scientifique (Magno et al., 2022a) ont été réalisées pendant la thèse. Puisque les données issues de cette expérimentation concernent des observations au niveau intergénérationnel, ces données n'ont pas été utilisées à des fins de modélisation. Les données supplémentaires de cet article (i.e. Supplemental Data) sont présentées dans l'Annexe 7.

Article Magno et al, 2022 EEB : principaux résultats

- L'exposition au stress thermique sur deux générations successives modifient le rendement et la qualité des graines issues de la seconde génération de plantes stressées.

- Les effets du stress sur la descendance (n+1) sont prédominants par rapport aux effets du stress sur la plante mère (n) pour la plupart des variables mesurées, indiquant ainsi l'absence d'effets intergénérationnels associés à nos protocoles de stress. Cependant, l'ampleur des effets du stress sur la descendance a été modulée par les effets du stress sur la plante mère.

- Les séquences des stress thermiques les plus négatives correspondent à la durée de stress la plus longue cumulée sur les deux générations. Les variables les plus négativement affectées sont le poids des graines, la teneur en huile, la capacité de conservation et la dormance des graines, tandis que la concentration en azote des graines augmente.

- L'application de protocoles de thermo-sensibilisation s'avère une stratégie complexe en raison de leurs caractéristiques (durée, période, intensité et fréquence de l'événement stressant), qui sont déterminantes pour induire l'effet sensibilisant sur la variable de performance ciblée.

Environmental and Experimental Botany 195 (2022) 104788

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental and Experimental Botany

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envexpbot

Effects of two-generational heat stress exposure at the onset of seed maturation on seed yield and quality in *Brassica napus* L.

Lethicia Magno Massuia de Almeida [a], Mathias Coulon [a], Jean-Christophe Avice [a], Annette Morvan-Bertrand [a], Jean-Jacques Bessoule [b], Marina Le Guédard [b,c], Tae Hwan Kim [a,d], Alseny Niare [e], Alain Mollier [f], Nadia Bertin [g], Sophie Brunel-Muguet [a,*]

[a] Normandie Université, UNICAEN, INRAE, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, SFR Normandie Végétal (FED 4277), Esplanade de la Paix, 14032 Caen, France
[b] Univ. Bordeaux, CNRS, Laboratoire de Biogenèse Membranaire (LBM), UMR 5200, 71, avenue Edouard Bourlaux, 33883 Cedex Villenave d'Ornon, France
[c] LEB Aquitaine Transfert-ADERA, 71, avenue Edouard Bourlaux, 33883 Villenave d'Ornon, France
[d] Division of Animal Science, Institute of Agricultural Science and Technology, College of Agriculture & Life Science, Chonnam National University, Gwangju 61186, Republic of Korea
[e] Plateforme Universitaire de Données de Caen (PUDC), Université de Caen Normandie, Esplanade de la Paix, 14032 Caen, France
[f] INRAE, Bordeaux Sciences Agro, UMR1391 ISPA, F-33882 Cedex Villenave d'Ornon, France
[g] INRAE-Centre d'Avignon, UR1115 Plantes et Systèmes de Culture Horticoles, 84000 Avignon, France

Many studies point out the deleterious effect of high temperatures during the crop reproductive stages on seed yield and quality. However, the response of plants to repeated stressing events across plant generations remains poorly investigated, especially in a context of climate change characterized by increased interseasonal variability frequency in terms of spring and summer heat waves. In our study, we attempted to gain a better insight on the effects of repeated heat stresses over two plant generations (i.e. Mother and Progeny plants) on yield components, seed nutritional and physiological quality criteria, under two contrasting sulphur supplies. Results measured in seeds that were at the onset of maturation when the temperature stress was applied indicated that (i) Progeny effects were predominant over Mother effects on most measured variables, thus indicating no intergenerational effects, (ii) the extent of the Progeny effects was modulated by the Mother effects e.g. amplified or attenuated differences on the desiccation tolerance proxy, according to the Mother plant origin, and (iii) the longer the cumulated duration of the temperature stress over the two plant cycles, the more negatively impacted the quality criteria with decreased fatty acids concentration, increased ω6:ω3 ratio, lower desiccation tolerance and increased seed dormancy. Sulphur limitation had little effect on the Progeny responses to heat stress, thus maintaining similar trends to those observed under well-supplied plants. This work provides insights to define thermopriming protocols over multiple plant generations to stabilize or even improve yield and seed quality in a context of stress exposure fluctuations.

Keywords: intergenerational effect, oilseed rape, seed quality, high temperature, repeated stresses, priming, stress memory, thermotolerance, sulphur.

4.1.2. Introduction

Crop adaptation to ever-changing environment has become one of the major issues for agriculture to ensure food safety and maintain or improve the quality of harvested products. The Intergovernmental Panel on Climate Change report (Hoegh-Guldberg et al., 2018) indicates that extreme events, such as heat waves, are expected to become more frequent, to last longer and to increase in intensity (Christidis et al., 2015; Trnka et al., 2014). Therefore the ability to acclimate to repeated and fluctuating environmental stressful conditions has become a challenging objective in crop breeding, not only at the crop cycle but also across generations (Delgado et al., 2011; Henry, 2020; Janni et al., 2020; Kakoulidou et al., 2021; Wang et al., 2017b). Nevertheless, in contrast to single-long lasting or single-short extreme/mild environmental stresses (Hassan et al., 2021; Janni et al., 2020; Kotak et al., 2007; Ohama et al., 2016; Wahid et al., 2007; Zhao et al., 2021), repeated stresses remained much less documented from molecular to the whole plant levels.

Within reasonable limits, the ability to resist to a lethal temperature stress can be conferred by exposure to a previous mild temperature stress, which induce the ability to survive. This response is known as acquired thermotolerance in the case of temperature stress (Saidi et al., 2011; Sung et al., 2003). It underlies that plants are able to store and retrieve information that they have acquired upon an initial exposure to the stress, which defines stress memory (Crisp et al., 2016; Hilker and Schmülling, 2019). This information acts as a priming process with beneficial effects when the stress recurs and it can lead to earlier, more rapid, intense and sensitive responses that help plants to acclimate in changing environments (Kinoshita and Seki, 2014). This concept was originally developed to describe plant defence mechanisms against biotic stresses (Dowen et al., 2012; Frost et al., 2008; Pastor et al., 2013), such that plants undergoing a second attack by pathogens or herbivores have faster and more robust responses than upon the first exposure. Then, this concept has been extended to abiotic stresses in view of other studies which pointed out that repeated mild stressing events, such as drought, cold, heat or salt stresses, could help stimulating stress memory and alleviating negative effects of a stressing event alone. A large body of literature described the mechanisms that contribute to stress memory, which act at different levels of regulation e.g. epigenetic marks, transcriptional priming, primed conformation of proteins, and/or specific hormonal or metabolic signatures that are maintained after the stress exposure (Bokszczanin et al., 2013; Crisp et al., 2017; Groot et al., 2016; Hatzig et al., 2018; Wang et al., 2016). In the case of heat, it has been found that plants exposed to short periods of mild heat early in their

development can later tolerate normally-lethal high temperatures, which is likely to be explained by epigenetic based regulatory mechanism (Sung et al., 2003).

At the plant cycle level, heat stress memory (i.e. intra-generational or somatic memory) has been observed in several crops. In bread wheat, pre-anthesis high temperatures improved carbohydrates remobilization and grain starch accumulation when they faced post-anthesis intense heat stress (Wang et al., 2014) or heat shock pre-treatment during germination reduced seed yield losses in post-anthesis heat stressed plants (Zhang et al., 2016). In maize, exposure to high temperature at the seedling stage was demonstrated to prevent from permanent damage on plants later subjected to a short heat shock (Sinsawat et al., 2004). In winter oilseed rape, effects of heat priming applied at the onset of seed maturation led to higher seed nitrogen content and seed desiccation tolerance for plants later exposed to heat peaks (Magno et al., 2021).

Beneficial effects of priming have also been investigated across generations to assess whether positive effects of a pre-acclimation treatment applied on plants could pass on to the offspring (i.e. inter-generational memory when the memory effect is observed only in the first stress-free generation, or transgenerational memory when observed in at least two stress-free generations, Lämke and Bäurle, 2017). To date, few studies have demonstrated the effects of abiotic stresses across several generations and how stress memory can be transmitted to offspring (Crisp et al., 2016; Hatzig et al., 2018; Kinoshita and Seki, 2014; Kumar, 2018b; Molinier et al., 2006; Wang et al., 2016). Most of them characterized responses of Arabidopsis thaliana as in Whittle et al. (2009), where high temperature on parental and F1 generations resulted in accelerated flowering and in increased seed yield for plants exposed to heat in the F3 generation. Likewise, accelerated flowering was also observed in F5 Arabidopsis plants after two stress-free generations (Suter and Widmer, 2013) and transgenerational effects of mild heat stress were observed over two generations of heat-stressed Arabidopsis plants on seed yield (Groot et al., 2017). However, studies of multi-generational heat stress exposure were much less investigated in valuable crops. In bread wheat, heat priming applied at the pre and post-anthesis stages to the first generation of plants resulted in greater grain yield and photosynthesis related parameters in the next generation of plants challenged with post-anthesis stress (Wang et al., 2016). More transgenerational studies on crops were designed to assess the effects of other abiotic stresses, such as heavy metals in rice (enhanced tolerance to mercury of Progenies from stressed Mother plants, Ou et al., 2012) and drought in oilseed rape (positive effects on seedling vigor of seeds from stressed Mother plants, Hatzig et al., 2018), or biotic stresses such as herbivory attacks in tomato plants (decreased caterpillars

growth on the subsequent generations from parents subjected to caterpillar feeding, Rasmann et al., 2012).

Because oilseed rape plants display indeterminate growth, different processes will be impacted by heat stress according to its earliness of occurrence during the reproductive stage. While heat stress at flowering limits pollination (Sage et al., 2015) and/or induces early pod abortion resulting in yield losses (Morrison and Stewart, 2002; Young et al., 2004), heat stress that occurs during seed filling and maturation affects seed storage compounds qualitatively and quantitatively , leading to seed quality alteration (Aksouh-Harradj et al., 2006; Aksouh et al., 2001; Baux et al., 2013; Brunel-Muguet et al., 2015b; Magno et al., 2021). In addition, sulphur (S) nutrition impacts yield components and seed quality in Brassica species because of their high S requirements (Scherer, 2001; Postma et al., 1999). Sulphur not only contributes to the synthesis and the signalling of stress tolerance-controlling phytohormones (Hasanuzzaman et al., 2018), but it might also be associated to epigenetic regulatory mechanisms of thermotolerance (Bokszczanin et al., 2013), such as DNA methylation which implies S-adenosylmethionine as a donor of methyl groups (Meng et al., 2018).

In the present study, we analysed the effects of heat stress on the quality of seeds collected from the second generation of stressed plants (F2, Progeny), also exposed to the same stressing events as the ones applied to the first generation (F1, Mother). The underlying hypothesis is that the history of stressful events experienced by the Mother plants would determine the performances of future generations. Consequently, the monitoring of temperature sequences in terms of stress intensity, duration and frequency, could be a promising strategy to design transmissible thermotolerance protocols, along with adequate S supply in Brassica species.

4.1.3. Materials and methods

Experimental treatments and growth conditions

Mother plants (cv. Aviso) were grown under greenhouse conditions in 2016-2017 as described in Magno et al. (2021). They were subjected to five different temperature modalities (Mother-modalities) for 17 days from stage GS72. F1 seeds were provided by the Center of Biological Resources BrACySol (Brassica-Allium-Cynara-Solanum), supervised by the INRAE Center of Rennes (Brittany, France). For the purpose of our intergenerational study, Progeny plants (from F1 seeds) were grown under similar conditions as the ones applied to the Mother plants from October 2018 until July 2019, which included two N applications at the end of

vernalization and flowering (100 kg N/ha and 50 kg N/ha respectively) and a single S application at the end of vernalization (75 kg SO_3/ha for the High Sulphur treatment and 25 kg SO_3/ha for the Low Sulphur treatment). In the same way as for the Mother plants (F1), Progeny plants (F2) were subjected to five different temperature modalities (Progeny-modalities) as illustrated in Figure 1a (Chap. 4.1.). The complete design resulted in 16 Mother x Progeny stress combinations (Figure 1b (Chap. 4.1.)), that is, 64 plants for each Sulphur treatment. Because the F1 seeds from the 4LHP Mother-modality were the most negatively impacted, they were not used as a Mother-modality in the Mother x Progeny combinations.

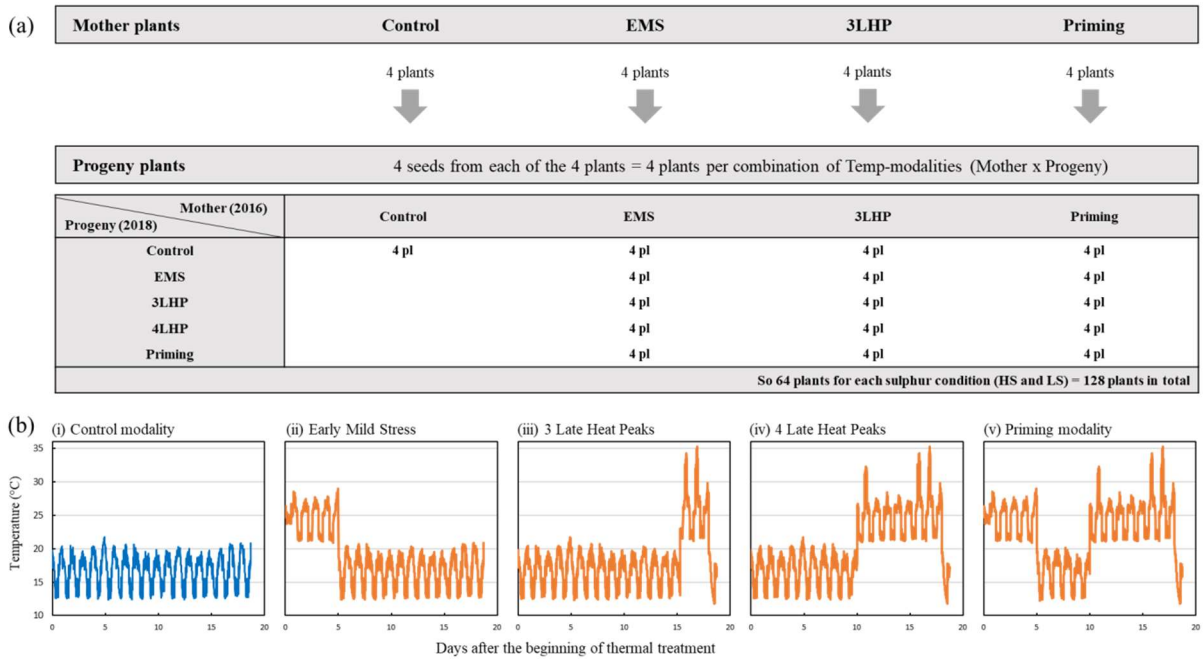


Figure 1 (Chap. 4.1.) : Experimental design which illustrates the 16 Mother x Progeny stress combinations from Mother plants grown in 2016-2017 to the Progeny plants grown in 2018-2019 (a). (b) shows the recordings of hourly temperatures in the greenhouse for each temperature sequence applied in 2018-2019. As applied on the Mother plants, two contrasting S conditions (High Sulphur and Low Sulphur) were applied on the Progeny plants (128 plants). Graphs are displayed by level of sequence complexity: (i) Control modality, (ii) Early Mild Stress modality (EMS), (iii) 3 Late Heat Peaks (3LHP), (iv) 4 Late Heat Peaks (4LHP) and (v) Priming modality.

Briefly the different temperature modalities aimed at highlighting any beneficial priming effect of an early mild stress prior to later heat peaks over the crop cycle (Magno et al., 2021). Therefore, we applied similar modalities on the Progeny plants as follows: (i) the Control

modality with natural thermoperiod conditions, (ii) the Early Mild Stress (EMS) modality that included 5 mild stress days [i.e. 25.8°C ±1.4 (day, 16h)/22.2°C ± 1.2 (night, 8h)] followed by 12 days under natural thermoperiod (mean, maximum and minimum temperatures being 16.6°C ±2.4, 20.8°C and 12.4°C, respectively), (iii) the 3 Late Heat Peaks (3LHP) modality that included 14 days under natural thermoperiod followed by 3 mild stress days with one daily heat peak applied for 5 hours (i.e. 31.1°C ±2.6 between 10 am until 3 pm), (iv) the 4 Late Heat Peaks (4LHP) modality that included 10 days under natural thermoperiod followed by 7 mild stress days with one daily heat peak on the last 4 days, and (v) the Priming modality which is the combination of the EMS and the 4LHP modalities.

As described in Magno et al. (2021), we distinguished two categories of pods according to their developmental stage at the beginning of the temperature modalities exposure. Indeed, due to their indeterminate growth, oilseed rape plants displayed mixed-aged pods over the 17 day-temperature treatments. Therefore, to avoid any age effect over temperature effect, we collected two categories of pods separately: pods whose length was greater than 5 cm ($pods_{L\geq5cm}$), and pods whose length was shorter than 5 cm ($pods_{L<5cm}$) following the protocol set up in Magno et al. (2021). When the pods started desiccating, each branch was wrapped with plastic pouches to avoid the mixing of seeds between the different pod categories.

Seed yield and components

After freeze-drying, the seeds from the two categories of pods were weighed for dry weight (DW) measurements. To determine the Thousand Seed Weight (TSW), we photographed the seeds so as to score their number using image analysis algorithms (ImageJ Software, Schindelin et al., 2012).

Biochemical characteristics of seeds from $pods_{L\geq5cm}$

In the following sections, biochemical characteristics of each individual plant were measured solely on seeds from $pods_{L\geq5cm}$. Three homogeneous plants out of the four replicates were harvested and used to perform the analyses (n=3). After harvest, seeds from $pods_{L\geq5cm}$ of each individual plant were pooled and lyophilized for 48h. Then, seeds were manually ground and the resulting powder was used to perform the biochemical analyses, in different amounts as indicated in the following detailed protocols.

- *Seed C/N/S concentrations and protein content*

Seed powder (around 3 mg per plant) was placed into tin capsules for elemental analysis. The percentage of carbon, nitrogen and sulphur was determined with a C/N/S analyser (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy) linked to a continuous flow isotope mass spectrometer (IRMS, Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK). Protein content was calculated using the nitrogen-to-protein conversion factor of 5.5 (Ezeagu et al., 2002).

- *Seed fatty acid concentrations and profiles*

Oil content and fatty acids profiles were determined as described in Marchand et al. (2016). Approximately 30 mg of seeds powder from each plant were suspended in 1 mL of methanol/toluene/H2SO4 solution (100:20:2.5; v/v) containing C17:0 as internal standard (25 µg mL−1), remaining 1h at 80°C for transmethylation. After cooling, 750 µL of hexane and 1.5 mL of water were added, and the hexane phase containing the resulting Fatty Acid Methyl Esters (FAMES) was recovered for gas chromatography analysis combined with flame ionization detection (GC-FID). The FAMES (1 µL) were injected into an Agilent 7890A gas chromatograph equipped with a DB-WAX column (15m x 1µm, 0.53 mm, Agilent) and FID system. FAMES were identified by comparing their retention times with those of commercial standards (Sigma, St. Louis, MO) and quantified using ChemStation (Agilent) to calculate the peak areas.

- *Seed soluble sugar concentrations*

Soluble sugars were extracted from 50 mg of seeds powder under water, with three stages of water bath and centrifugation. A solution with 40 µL melicitose was used as the internal standard. Sucrose, raffinose and stachyose contents were identified using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), and quantified using a refractive index detector (2410 Differential Refractometer, Millipore Waters, Waters Corporation, MA, USA) as described in Magno et al. (2021).

- *Seed dormancy-related phytohormones*

For each treatment, 50 mg of seeds powder were mixed with 500 µL of extraction solvent [2-propanol/H2O/ concentrated HCl (2:1:0.002, v/v/v)], and then analyzed by HPLC-MS as described in Pan et al. (2010).

Germination time courses at sub (5°C) and optimal (25°C) temperatures

Because the requirements for the germination tests (2 temperatures x 50 seeds per replicate) were substantial, we used the seeds from $pods_{L<5cm}$ which could provide enough material. Their developmental stage during the 17 day-stress period (younger stage compared to seeds from $pods_{L\geq5cm}$) has been considered for the results interpretation. For each tested temperature, 3 replicates of 50 seeds of each Progeny plants were disposed homogeneously in a Petri dish, on a double layer of blotting paper and with 10 mL of osmotic water (Ling et al., 2015). The Petri dishes were sealed with parafilm to maintain constant moisture. They were put in a growth chamber (Binder KBWF 720, BINDER GmbH, Tuttlingen, Allemagne), monitored at 5 or 25°C and 80% of humidity. Both temperatures were chosen to track the germination time courses under a sub-optimal temperature (i.e. 5°C) and an optimal temperature (i.e. 25°C). Observations and scoring of germinated seeds were regularly carried out in the light, as prior tests were performed to ensure that the seeds were not photosensitive (data not shown).

The Gompertz function was fitted to the germination rates for each replicate batch of 50 seeds:

$$G(t) = a\exp(-\frac{b}{c}.\exp -ct)$$

Were G(t) is the germination percentage at t time (in hour) after sowing. a, b and c are three parameters of the model: a refers to the maximum germination rate, b and c are shape parameters of the simulated curve (Brunel et al., 2009). This function is an adjustment model usually used to simulate the growth of living organisms (Brunel et al., 2009; Dantigny et al., 2007). Then germination times were deduced and used to compare Progeny-plants germination behavior. Statistical analyses were performed with Rstudio (R version 4.0.3 Rstudio, PBC) for the final germination rates and for 3 germination times (i.e. T25, T50 and T75, which correspond to the time to observe 25%, 50% and 75% of germinated seeds respectively).

Statistical analysis

Both sulphur conditions (i.e. High Sulphur and Low Sulphur) results were analysed separately. To highlight the intergenerational effects, two-way ANOVAs to test the Mother and Progeny temperature stress (i.e. the Mother-modalities and the Progeny-modalities) effects were performed on the measured variables, both considered as independent factors. Residues independence and normality, and homogeneity of variances were tested before performing

the ANOVAs (using Dubin-Watson, Shapiro-Wilk and Bartlett tests respectively). Mother-modalities, Progeny-modalities and Mother x Progeny interactions effects were analysed using R software (version 4.0.2, R Core Team, 2020), following a Type III two-way ANOVAs. To have a complete and balanced model, the [Mother-control x Progeny-control] combination has been left out, as the Mother-control was only combined to Progeny-control. As interaction effects were not observed in this experiment, Tukey tests were performed for the significant factor (i.e. Mother and/or Progeny temperature stress effect) among the 5 Progeny-modalities or among the 4 Mother-modalities (Tables 1, 2, 3 and 4 (Chap. 4.1.)), also taking in account the [Mother-control x Progeny-control] treatment. In addition, we performed mean comparison tests among Progeny-modalities for a given Mother-modality (Supplemental Data, Tables 1 and 2 (Chap. 4.1.)). Different Progeny-modalities rankings mean that the Mother-modality modulates the effect of Progeny-modality.

4.1.4. Results

Because S supply is a secondary factor in this study, the results under the Low Sulphur condition are commented after the results under High Sulphur condition, and the tables and graphs are given in Supplemental Data (Chap. 4.1.). In doing so, we meant to simply observe to what extent S limitation modifies the plant performances under heat stress.

Yield components

Table 1 (Chap. 4.1.) displays total yield and yield components (i.e. seed number and TSW) for the whole plant seeds and for both categories of seeds collected separately (from $pods_{L\geq5cm}$ and $pods_{L<5cm}$) under the High Sulphur condition. No significant Progeny x Mother interaction effect was observed for any of the yield-related variables. Total seed yield among the Progeny-modalities ranged from 5.53 g plant-1 (Progeny-priming) to 7.92 g plant-1 (Progeny-control) with a significant Progeny effect ($p<0.001$). The decrease in the total seed yield was only significant for the Progeny-priming (-30% relative to Progeny-control) as a consequence of the seed yield penalties for $pods_{L<5cm}$ which was important in this treatment (-43% relative to Progeny-control) and globally affected by all the Progeny-modalities ($p<0.001$). A significant Progeny effect was also observed on TSW for total pods and both pod categories. Decreases in the TSW were observed for all the Progeny-modalities compared to the Progeny-control, with the Progeny-priming modality being the most penalizing modality (-29%, -32% and -27% for total pods, $pods_{L<5cm}$ and $pods_{L\geq5cm}$ respectively from the Progeny-control value). No Mother

effect was observed except for TSW from $pods_{L\geq5cm}$ (*p<0.05*), with the Mother-EMS being 22% lower than the Mother-control. Regarding the Progeny-modalities ranking for a given Mother-modality under High Sulphur condition (Supplemental Data, Table 1 (Chap. 4.1.)), no difference in rankings were observed for total seed yield nor total TSW, as for every Mother-modality the Progeny-priming and the Progeny-control were respectively the most and the less penalizing modalities. For seeds from $pods_{L\geq5cm}$ differences can be observed for Mother-3LHP, with Progeny-control having the lowest values (along with Progeny-priming and Progeny-EMS for seed yield from $pods_{L\geq5cm}$). For seeds from $pods_{L<5cm}$, different rankings among Progeny-modalities were observed for seed yield and TSW i.e. lowest seed yield for Progeny-priming under Mother-EMS and Mother-priming only, and lowest TSW for Progeny-priming under Mother-3LHP and Mother-priming only.

As observed under the High Sulphur condition, no significant Progeny x Mother interaction effect was observed for any of the yield-related variables under Low Sulphur condition (Supplemental Data, Table 3 (Chap. 4.1.)). Total seed yield among the Progeny-modalities ranged from 5.60 g plant-1 (Progeny-priming) to 7.25 g plant-1 (Progeny-control) with a significant Progeny effect (*p<0.001*). The decrease of seed yield under the temperature modalities resulted from decreased yield of seeds from $pods_{L<5cm}$ (*p<0.01*). Seed number (i.e. total, $pods_{L<5cm}$ and $pods_{L\geq5cm}$) were not impacted by the Progeny nor by the Mother modalities, although the total seed number displayed a significant Mother effect (*p<0.01*) with the Mother-priming having the highest value (+30% from the Progeny-control value). A significant Progeny effect was observed on TSW for total pods and both pod categories (*p<0.001*) and a Mother effect was also observed for total pods and $pods_{L<5cm}$ (*p<0.001*, Supplemental Data, Figure 1 (Chap. 4.1.)). Both Progeny and Mother effects led to decreased TSW with the Mother-priming and Progeny-priming being the most penalizing sequences (Supplemental Data, Table 3 (Chap. 4.1.)). Regarding the Progeny-modalities ranking for a given Mother-modality under Low Sulphur condition (Supplemental Data, Table 2 (Chap. 4.1.)), differences in rankings were observed for total seed yield under Mother-EMS and Mother-3LHP, with the Progeny-priming being the most penalizing modality. The Progeny-priming modality was also the most impacting on TSW whatever the Mother-modalities. As for the total seed number, Progeny rankings were different only under the Mother-priming modality, with Progeny-EMS having the lowest value. For both pods categories, the Mother-priming and Mother-3LHP modalities impacted the Progenies ranking for TWS while the Mother-EMS modality only affected TSW of seeds from $pods_{L\geq5cm}$.

Nutritional seed quality criteria

- *Seed C and S concentrations*

Under High Sulphur condition, the seed C and S concentrations (Table 2 (Chap. 4.1.)) were slightly impacted by Progeny-modalities ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively), but neither Mother nor Progeny x Mother interaction effects were not observed. The Progeny-priming modality displayed the lowest C concentration (5% lower than the Progeny-control), whereas the Progeny-EMS modality displayed the highest value. Adversely, the seeds from the Progeny-priming modality plants displayed the highest seed S concentration (32% higher than the Progeny-control). Regarding the Progeny-modalities ranking for a given Mother-modality under High Sulphur (Supplemental Data, Table 1 (Chap. 4.1.)), rankings among Progeny-modalities differed under Mother-3LHP and Mother-EMS modalities. For C concentration, while Progeny-control displayed the highest value among the Progeny-modalities for the Mother-3LHP, its value was the lowest among the Progeny-modalities for the Mother-EMS.

As observed under the High Sulphur condition, only a Progeny effect was observed on C and S concentrations under the Low Sulphur condition (Supplemental Data, Table 4 (Chap. 4.1.)). Similarly, the Progeny-priming displayed the lowest C concentration (-7% from the Progeny-control). By contrast, while the Progeny-priming significantly displayed the highest value in S under High Sulphur condition, the Low Sulphur condition alleviated the increase under the Progeny-priming and negatively impacted the value under the Progeny-EMS (-19% from the Progeny-control). Regarding the Progeny-modalities ranking for a given Mother-modality under Low Sulphur (Supplemental Data, Table 2 (Chap. 4.1.)), the Progeny-priming was the most negatively impacted modality regarding the C concentration under the Mother-EMS and Mother-3LHP modalities, while it was the Progeny-EMS under the Mother-priming modality. For S concentration, the Progeny-modalities were significantly ranked only under Mother-EMS, with the Progeny-EMS displaying the lowest value (-36% from the Progeny-control).

- *Seed N and total protein concentrations*

Table 2 (Chap. 4.1.) displays seed N and protein concentrations. Similar to C and S, the seed N and protein concentrations were only affected by Progeny-modalities ($p<0.001$). The highest N and protein concentration values were observed for the Progeny-priming modality (+24% compared to Progeny-control). These observations lead to conclude that the early mild stress had a positive effect over the late heat peaks, which suggested an alleviating effect. Rankings among the Progeny-modalities under High Sulphur condition (Supplemental Data, Table 1 (Chap. 4.1.)) for N concentrations were not changed whether the Mother-modality, with

Progeny-priming and Progeny-control seeds having the highest and the lowest values respectively. As observed under the High Sulphur condition, only a Progeny effect was observed to N and protein concentrations under the Low Sulphur condition (Supplemental Data, Table 4 (Chap. 4.1.)), with the Progeny-priming modality displaying the highest values (+12% compared to Progeny-control). Rankings among the Progeny-modalities under Low Sulphur condition (Supplemental Data, Table 2 (Chap. 4.1.)) for N concentrations were not changed for the Mother-EMS, while Progeny-priming displayed the highest values under Mother-priming and Mother-3LHP.

- *Fatty acids concentration and profiles*

Total FAs, saturated FAs (SFAs) and unsaturated FAs (UFAs) concentrations under High Sulphur condition are displayed in Table 2 (Chap. 4.1.). The 3 variables were strongly impacted by the Progeny-modalities ($p<0.001$), but no Mother nor Progeny x Mother interaction effects were observed. Total FAs ranged from 11.00 %DW (Progeny-priming) to 28.67 %DW (Progeny-control) among the Progeny-modalities and decreases in total FAs concentration were observed on seeds from all the heat stressed plants compared to Progeny-control, although only the Progeny-priming mean was significantly lower (-61% compared to Progeny-control). The SFAs (including C16:0, C18:0, C20:0, C22:0) concentrations ranged from 1.90 %DW (Progeny-priming) to 2.51 %DW (Progeny-3LHP) and the UFAs (including C16:1, C18:1, C18:2, C18:3, C20:1) concentrations ranged from 15.11 %DW (Progeny-priming) to 26.26 %DW (Progeny-control). Overall, the Progeny-priming modality had the greatest impact on decreasing FAs concentration, as a result of both SFAs and UFAs decreased concentrations, meaning that the early mild stress event did not alleviate the negative effects of the later heat peaks. These decreases are in line with increased proteins concentration as usually observed in oilseed crops for which oil and protein contents are inversely proportional. The ω6:ω3 ratio (i.e. C18:2/C18:3 ratio) is commonly used as an indicator of the health quality of vegetable oils. This ratio was significantly impacted by the Progeny and Mother-modalities ($p<0.001$ and $p<0.05$, respectively), but no significant Progeny x Mother interaction effects were observed (Table 2 and Figure 2 (Chap. 4.1.)). The lowest ratios were observed on both Mother-control and Progeny-control modalities. The highest ω6:ω3 ratios were observed for the Progeny-priming (+43% compared to Progeny-control) and for the Mother-EMS (+18% compared to Mother-control). These results indicated that the number of desaturations decreased with greater duration of stress exposure. Whatever the Mother-modality, ranking among Progeny-modalities under High Sulphur (Supplemental Data, Table 1 (Chap. 4.1.)) remained unchanged for the total FAs, SFAs and UFAs concentrations, with the Progeny-priming being the most

impacting modality (lowest values). Similarly, extreme rankings among Progeny-modalities for the ω6:ω3 ratio remained unchanged with Progeny-priming and Progeny-control having the highest and the lowest values whatever the Mother-modality.

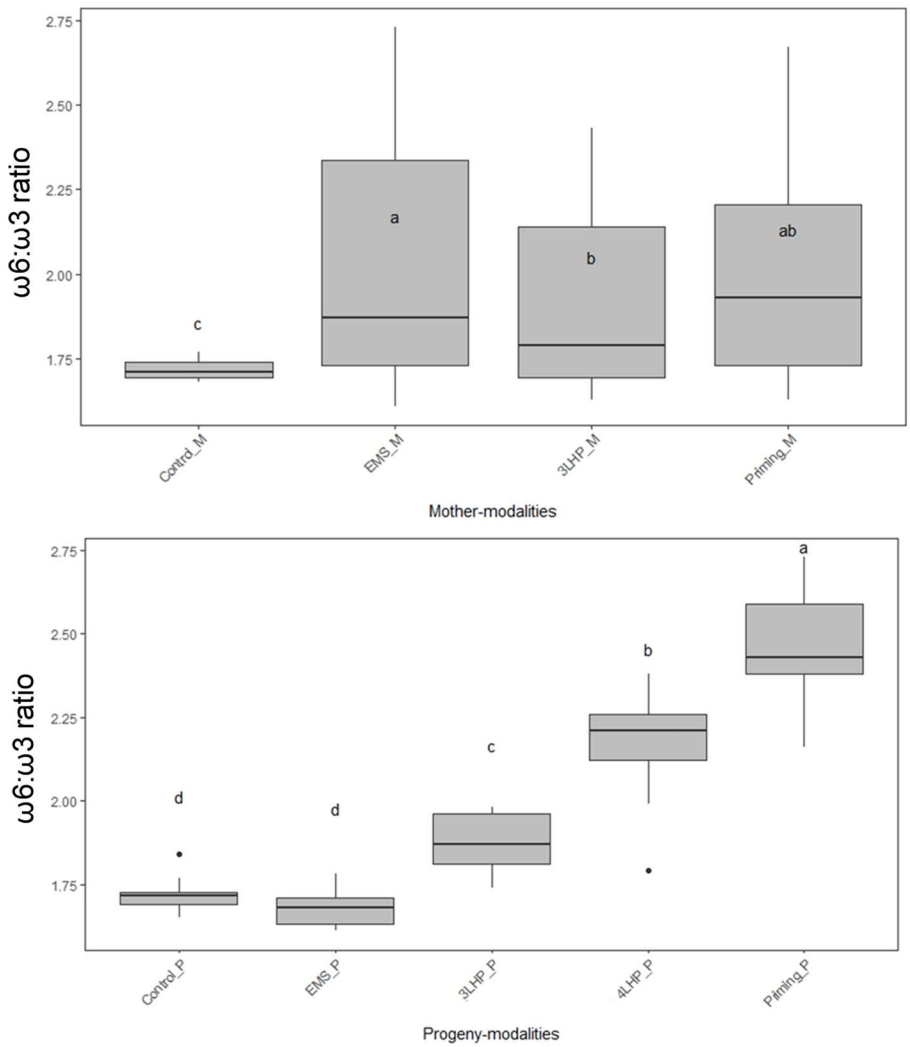


Figure 2 (Chap. 4.1.) : Boxplots of the ω6:ω3 ratio measured in seeds from $pods_{L \geq 5cm}$ under High Sulphur condition among mother modalities (top) and progeny modalities (bottom). This ratio is the main quality criteria impacted significantly by both Mother and Progeny modalities. Letters indicate the ranking among all the treatments (including the control). P-values and levels of significance are given on Table 2 (Chap. 4.1.). EMS: Early Mil Stress modality, 3LHP: 3 late heat peaks modality, 4LHP: 4 late heat peaks modality.

As observed under the High Sulphur condition, only a Progeny effect was observed on FA, SFA and UFA concentrations under the Low Sulphur condition (Supplemental Data, Table 4 (Chap. 4.1.)), with the Progeny-priming displaying the lowest values (-44%, -24% and -46% compared to Progeny-control, respectively). In addition, the Progeny-EMS also led to significant decrease (-18%, -12% and -19% compared to the Progeny-control, respectively). Under Low Sulphur, the ω6:ω3 ratio was only affected by Progeny-modalities (unlikely to the High Sulphur condition, for which a significant Mother effect was observed). As under High Sulphur condition, the Progeny-control displayed the lowest values and the Progeny-priming displayed the highest values (+49% compared to Progeny-control). Rankings among the Progeny-modalities under Low Sulphur condition (Supplemental Data, Table 2 (Chap. 4.1.)) for FA, SFA and UFA were not changed whatever the Mother-modality, with Progeny-priming having the lowest values, and the Progeny-control and the Progeny-3LHP modalities having the highest values.

Physiological seed quality-related criteria

- *Soluble sugar ratio as indicator of desiccation tolerance*

Table 3 (Chap. 4.1.) gives the concentrations of three soluble sugars found in seeds of oilseed rape (i.e. sucrose, raffinose and stachyose) under High Sulphur condition. For all of them, only Progeny effects were observed ($p<0.01$ for sucrose and raffinose, and $p<0.001$ for stachyose). Sucrose concentrations ranged from 2.83 %DW (Progeny-priming) to 3.98 %DW (Progeny-4LHP). The late heat peaks tended to increase the sucrose concentration, as the Progeny-3LHP and Progeny-4LHP modalities displayed the highest values. The lowest sucrose concentrations were observed in the Progeny-priming modality (-12% than in the Progeny-control). Raffinose and stachyose concentrations were the highest in the Progeny-control and Progeny-EMS modalities. Under the Progeny-priming modality, raffinose and stachyose concentrations were respectively 25% and 53% lower than under the Progeny-control. The [raffinose+stachyose]:sucrose ratio was used as an indicator of drying tolerance i.e. the higher the value, the more tolerant to desiccation (Bailly et al., 2001). Results ranged from 0.21 (Progeny-priming) to 0.39 (Progeny-EMS) (Table 3 (Chap. 4.1.)), thus indicating indicate that whatever the Mother-modality, the Progeny-priming modality was the most negatively impacted for the acquisition of seed desiccation tolerance. When comparing the Progeny-modalities for a given Mother-modality under High Sulphur (Supplemental Data, Table 1 (Chap. 4.1.)), the lowest [raffinose+stachyose]:sucrose ratio was obtained under the Progeny-priming for all the Mother-modalities, but the highest ratio was not obtained for the same Progeny-

modality i.e. the 4 other Progeny-modalities (including Progeny-control) for the Mother-priming but only the Progeny-EMS for the Mother-EMS and the Mother-3LHP.

As observed under the High Sulphur condition, only a Progeny effect (*p<0.001*) was observed to the three soluble sugars and the [raffinose+stachyose]:sucrose ratio under Low Sulphur condition (Supplemental Data, Table 5 (Chap. 4.1.)), with the Progeny-priming modality displaying the lowest values. Similarly, the late heat peaks tended to increase the sucrose concentration, as the Progeny-3LHP and Progeny-4LHP modalities displayed the highest values. The rankings among the Progeny-modalities under the Low Sulphur condition were almost similar to those observed under the High Sulphur condition, thus leading to conclude that the thermal stress is far more impacting on soluble sugars than sulphur limitation as applied in our experimental conditions (Supplemental Data, Table 5 (Chap. 4.1.)). When comparing the Progeny-modalities for a given Mother-modality under Low Sulphur (Supplemental Data, Table 2 (Chap. 4.1.)), the lowest [raffinose+stachyose]:sucrose ratio was obtained under the Progeny-priming for all the Mother-modalities.

- *ABA:GA3 ratio as indicator of temperature-induced seed dormancy*

Because the dynamics of ABA and GA3 controls the balance between dormancy and germination, the ABA:GA3 ratio was used as a proxy for seed dormancy under stress condition i.e. a high ABA:GA3 ratio indicates increased secondary seed dormancy, which is induced by thermo-inhibition (Debeaujon and Koornneef, 2000; Finkelstein, 2013). Table 3 (Chap. 4.1.) displays the values of the ABA:GA3 ratio under High Sulphur condition. As expected, under high temperature this ratio increased, but only Progeny effects were observed (*p<0.01*). The ABA:GA3 ratio ranged from 0.44 (Progeny-3LHP) to 1.66 (Progeny-priming), thus indicating that the most negatively impacting modality (highest ratio) corresponded to the longest cumulated heat days during the Progenies generation. Rankings were different according to the Mother-modality under High Sulphur (Supplemental Data, Table 1 (Chap. 4.1.)). Significant lower values of the ratio were observed for Progeny-4LHP and Progeny-3LHP under Mother-priming, and for Progeny-EMS and Progeny-control under Mother-EMS.

Similar to the High Sulphur condition, only a Progeny effect (*p<0.01*) was observed to the ABA:GA3 ratio under Low Sulphur condition (Supplemental Data, Table 5 (Chap. 4.1.)). When comparing the Progeny-modalities for a given Mother-modality under Low Sulphur (Supplemental Data, Table 2 (Chap. 4.1.)), different rankings can be observed. While under Mother-priming the highest and lowest values were observed on Progeny-3LHP and Progeny-priming respectively, under Mother-EMS the highest and lowest values were observed to

Progeny-control and Progeny-EMS respectively, and no differences among the Progenies were observed under the Mother-3LHP.

- *Germination capacity as indicator of seed vigor*

The germination time courses (T25, T50 and T75) and the final rates obtained at optimum (25 °C) and suboptimum (5 °C) temperatures under the High Sulphur condition are presented in Table 4 (Chap. 4.1.). The final germination percentages were high (over 90%) under both temperatures and only the Progeny effect was significant ($p<0.01$). The short duration temperature stress (early mild stress or late heat peaks) have not affected the final rate, as the Progeny-EMS, Progeny-3LHP and Progeny-4LHP modalities displayed the highest values. However, under both temperatures (i.e. 25 °C and 5 °C) the Progeny-priming displayed the lowest final rates, thus suggesting that the longer the stress exposure, the more negative the impacts on final germination rates. Regarding the time courses, only T25 was significantly affected by the Progeny-modalities at both germination temperatures ($p<0.05$), with the Progeny-priming displaying the lowest values (faster germination). When comparing the Progeny-modalities for a given Mother-modality under High Sulphur (Supplemental Data, Table 6 (Chap. 4.1.)), different Mother effect on Progeny rankings were observed according to the germination temperature. At 25 °C, the Progeny-priming modality displayed the lowest final rates whatever the Mother-modality, followed by the Progeny-control. Differences among the Progeny T25 values were only observed under Mother-EMS, with the Progeny-control and the Progeny-priming displaying the highest and lowest values respectively. For T50, differences among the Progeny-modalities were observed under Mother-priming and Mother-EMS, with the Progeny-control displaying the highest values. The differences in T75 among the Progeny-modalities were only observed under Mother-priming, with the Progeny-control and the Progeny-3LHP displaying the highest and lowest values respectively. In contrast to the results under optimal temperature, the time courses under 5 °C were only affected under Mother-3LHP, with Progeny-EMS displaying the lowest T25, T50 and T75 values. Globally, heat stress under High Sulphur condition accelerated germination time (Figure 3 (Chap. 4.1.)). Although the thermal modalities applied on the Progeny plants were more impacting than those applied on the Mother plants, the history of the Mother plants modified the Progeny-modality effects on the germination time courses and final rates of the seeds from the Progeny plants.

Under Low Sulphur condition, no significant Progeny, Mother nor interaction effects were observed for any germination variables at 25 °C, except for T75 which was impacted by the Mother modalities ($p<0.05$) (Supplemental Data, Table 7 (Chap. 4.1.)). By contrast, under 5 °C T25, T50 and T75 were affected by the Progeny-modalities ($p<0.01$) and a slight Mother

effect (*p<0.05*) can be observed on T75. The Progeny-EMS modality displayed the lowest values of T25, T50 and T75, thus suggesting a faster germination. The final rates were only impacted by a Progeny x Mother interaction effect, thus suggesting that the final germination rate was the result of the stress exposure of both generations. When comparing the Progeny-modalities for a given Mother-modality under Low Sulphur (Supplemental Data, Table 8 (Chap. 4.1.)), different Mother effects were observed. At 25 °C, differences in the final rate among the Progenies were observed under Mother-priming and Mother-3LHP, with Progeny-EMS displaying the highest values in both Mother-modalities. Differences in germination times were observed only under Mother-priming, with the Progeny-priming displaying the lowest values to T25, T50 and T75 (faster germination). At 5 °C, the final rates were different under Mother-priming and Mother-3LHP, with lower values for the Progeny-3LHP and the Progeny-control respectively. Differences in T25 and T50 were observed only under the Mother-priming, with Progeny-EMS displayed the lowest values (faster germination). The slowest germination rates (i.e. higher T75) were observed for Progeny late heat peaks modalities irrespective of the Mother-modalities. Globally, heat stress under the Low Sulphur condition accelerated germination to some extent according to the Mother-modalities (Supplemental Data, Figure 8 (Chap. 4.1.)), but these observations were less obvious than under the High Sulphur condition.

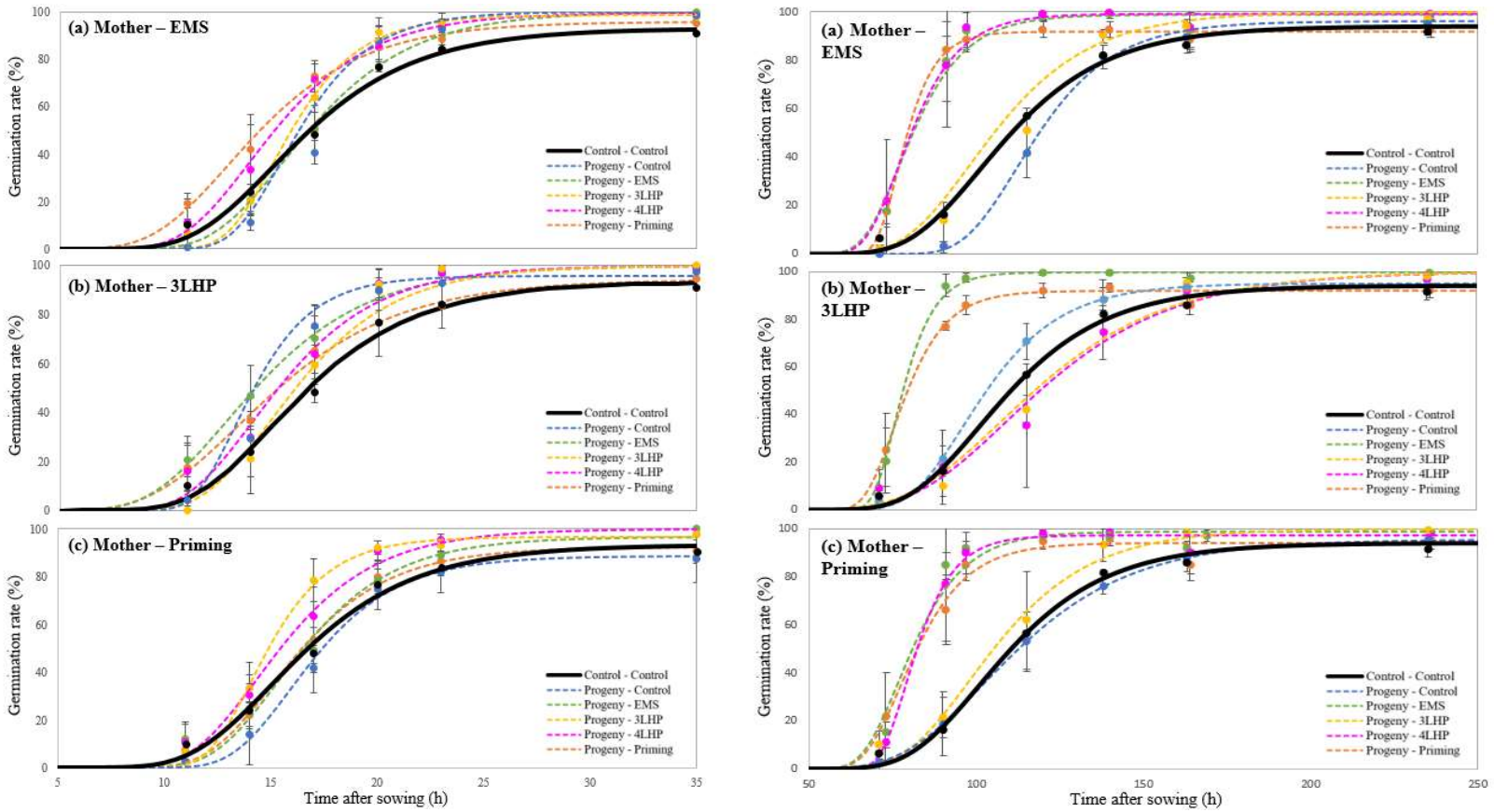


Figure 3 (Chap. 4.1.) : Germination time courses at 25◦C (left) and 5◦C (right) under High Sulphur condition. Each graph illustrates the germination time courses for the 5 Progeny-modalities (including the [Mother-Control x Progeny-Control] combination for reference) for a given Mother modality. Dots are germination observations and lines are fitted Gompertz functions. Vertical bars denote standard errors. P-values of the germination time courses (T25, T50 and T75) and final germination rates are given in Table 4 (Chap. 4.1.). EMS: Early Mild Stress modality, 3LHP: 3 late heat peaks modality, 4LHP: 4 late heat peaks modality.

Table 1 (Chap. 4.1.) : Yield components distinguishing the two pools of pods (i.e. $pods_{L<5cm}$ and $pods_{L\geq5cm}$ at the beginning of the temperature stress application). Results are presented by factor (Progeny-modality and Mother-modality) under High Sulphur condition. For a given variable, different letters (Tukey multiple comparisons test) indicate the ranking among Progeny or Mother modalities (including the control). P-values and levels of significance are given for Progeny, Mother and Progeny x Mother interaction effects. Levels of significance: ns non-significant, *p<0.05*, p<0.01**, p<0.001****. SE: standard error, TSW: Thousand Seed Weight.

	Total pods			**Pods L < 5cm**			**Pods L ≥ 5cm**		
Factor\Variables	**Yield (g.pl^{-1})**	**Seed number**	**TSW (g)**	**Yield (g.pl^{-1})**	**Seed number**	**TSW (g)**	**Yield (g.pl^{-1})**	**Seed number**	**TSW (g)**
Progeny-modalities									
Control	7.92 a	1838 ns	4.34 a	5.67 a	1347 ns	4.25 a	2.25 ns	491 ns	4.76 a
Early mild stress	6.84 a	1711 ns	4.04 a	4.50 ab	1150 ns	3.90 a	2.34 ns	560 ns	4.31 a
3 late heat peaks	7.53 a	1911 ns	3.98 a	4.70 ab	1239 ns	3.79 a	2.83 ns	672 ns	4.42 a
4 late heat peaks	6.91 a	1813 ns	3.91 a	3.51 b	970 ns	3.64 ab	3.39 ns	842 ns	4.30 a
Priming	5.53 b	1843 ns	3.10 b	3.24 b	1155 ns	2.91 b	2.29 ns	687 ns	3.48 b
se	*0.29*	*116*	*0.14*	*0.34*	*85*	*0.17*	*0.39*	*82*	*0.17*
Mother-modalities									
Control	7.92 ns	1741 ns	4.55 ns	6.15 ns	1394 ns	4.42 ns	1.77 ns	347 ns	5.10 a
Early mild stress	7.17 ns	1951 ns	3.72 ns	4.21 ns	1164 ns	3.61 ns	2.96 ns	786 ns	3.95 b
3 late heat peaks	6.92 ns	1761 ns	3.95 ns	4.14 ns	1100 ns	3.75 ns	2.78 ns	660 ns	4.25 ab
Priming	6.76 ns	1777 ns	3.91 ns	4.54 ns	1243 ns	3.70 ns	2.21 ns	534 ns	4.50 a
se	*0.32*	*91*	*0.15*	*0.40*	*95*	*0.16*	*0.32*	*113*	*0.14*
Progeny effect	**0.000** ***	0.856	**0.000** ***	**0.001** **	0.169	**0.001** **	0.309	0.187	**0.002** **
Mother effect	0.533	0.359	0.375	0.589	0.449	0.797	0.251	0.430	**0.044** *
Progeny x Mother	0.604	0.900	0.600	0.283	0.663	0.544	0.529	0.752	0.815

Table 2 (Chap. 4.1.) : Nutritional seed quality criteria measured in seeds from pods$_{L \geq 5cm}$. Results are presented by factor (Progeny-modality and Mother-modality) under High Sulphur condition. For a given measured variable, different letters (Tukey multiple comparisons test) indicate the ranking among Progeny or Mother modalities (including the control). P-values and levels of significance are given for Progeny, Mother and Progeny x Mother interaction effects. Levels of significance: ns non-significant, *p<0.05*, p<0.01**, p<0.001****. SE: standard error, DW: dry weight, FA: fatty acid, UFA: unsaturated FA, SFA: saturated FA.

	Seed C, S, N and protein concentrations (%DW)				**Oil content and fatty acids (%DW)**			
Factor\Variables	**Carbon**	**Sulphur**	**Nitrogen**	**Protein (mg.g^{-1})**	**FA**	**SFA**	**UFA**	**ω6:ω3 ratio**
Progeny-modalities								
Control	47.53 ab	0.34 b	3.30 b	181.47 b	28.67 a	2.40 a	26.26 a	1.72 d
Early mild stress	48.14 a	0.37 b	3.52 b	193.99 b	26.67 a	2.28 a	24.39 a	1.68 d
3 late heat peaks	47.74 ab	0.35 b	3.39 b	186.53 b	27.99 a	2.51 a	25.48 a	1.87 c
4 late heat peaks	46.89 ab	0.37 b	3.56 b	195.87 b	26.05 a	2.49 a	23.56 a	2.16 b
Priming	45.00 b	0.45 a	4.09 a	225.35 a	17.00 b	1.90 b	15.11 b	2.46 a
se	*0.54*	*0.02*	*0.25*	*5.86*	*0.89*	*0.07*	*0.83*	*0.04*
Mother-modalities								
Control	48.53 ns	0.35 ns	3.21 ns	176.71 ns	29.15 ns	2.41 ns	26.74 ns	1.72 c
Early mild stress	46.41 ns	0.36 ns	3.57 ns	196.33 ns	25.00 ns	2.33 ns	22.67 ns	2.03 a
3 late heat peaks	47.52 ns	0.37 ns	3.60 ns	198.25 ns	25.77 ns	2.32 ns	23.45 ns	1.91 b
Priming	47.06 ns	0.39 ns	3.57 ns	196.29 ns	24.96 ns	2.30 ns	22.67 ns	1.99 ab
se	*0.82*	*0.02*	*0.12*	*6.63*	*1.15*	*0.08*	*1.08*	*0.07*
Progeny effect	**0.011** *	**0.008** **	**0.000** ***	**0.000** ***	**0.000** ***	**0.000** ***	**0.000** ***	**0.000** ***
Mother effect	0.269	0.465	0.945	0.943	0.664	0.881	0.631	**0.029** *
Progeny x Mother	0.109	0.941	0.132	0.133	0.256	0.286	0.259	0.589

Table 3 (Chap. 4.1.) : Seed physiological quality values measured in seeds from pods$_{L \geq 5cm}$. Results are presented by factor (Progeny-modality and Mother-modality) under High Sulphur condition. For a given measured variable, different letters (Tukey multiple comparisons test) indicate the ranking among Progeny or Mother modalities (including the control). P-values and levels of significance are given for Progeny, Mother and Progeny x Mother interaction effects. Levels of significance: ns non-significant, *p<0.05*, p<0.01**, p<0.001****. SE: standard error, DW: dry weight, ABA: abscisic acid, GA3: gibberellic acid.

	Soluble sugars				Hormones
Factor\Variables	**Sucrose (%DW)**	**Raffinose (%DW)**	**Stachyose (%DW)**	**[Raffinose+stachyose] : sucrose ratio**	**ABA:GA3 ratio**
Progeny-modalities					
Control	3.23 b	0.20 a	0.99 a	0.37 a	0.58 b
Early mild stress	3.10 b	0.23 a	0.98 a	0.39 a	0.75 b
3 late heat peaks	3.55 ab	0.18 ab	0.97 a	0.32 ab	0.44 b
4 late heat peaks	3.98 a	0.19 ab	0.94 a	0.29 bc	0.65 b
Priming	2.83 b	0.15 b	0.46 b	0.21 c	1.66 a
se	*0.17*	*0.01*	*0.06*	*0.01*	*0.18*
Mother-modalities					
Control	3.18 ns	0.23 ns	1.09 ns	0.41 ns	0.67 ns
Early mild stress	3.31 ns	0.20 ns	0.86 ns	0.32 ns	0.85 ns
3 late heat peaks	3.23 ns	0.18 ns	0.82 ns	0.31 ns	0.55 ns
Priming	3.47 ns	0.19 ns	0.91 ns	0.32 ns	1.00 ns
se	*0.14*	*0.01*	*0.06*	*0.02*	*0.25*
Progeny effect	**0.003** **	**0.008** **	**0.000** ***	**0.000** ***	**0.001** **
Mother effect	0.526	0.493	0.430	0.775	0.212
Progeny x Mother	0.777	0.959	0.547	0.058	0.459

Table 4 (Chap. 4.1.) : Germination variables measured at optimal (25◦C) and suboptimal (5◦C) temperatures. Results are presented by factor (Progeny-modality and Mother-modality) under High Sulphur condition. T25, T50 and T75 represent respectively the time (in hours) for 25%, 50% and 75% of germinated seeds, as adjusted from the observations with the Gompertz functions. Final rate is the observed final rate (in percentage). For a given measured variable, different letters (Tukey multiple comparisons test) indicate the ranking Progeny or Mother modalities (including the control). P-values and levels of significance are given for Progeny, Mother and Progeny x Mother interaction effects. Levels of significance : ns non-significant, *p<0.05*, p<0.01**, p<0.001****. SE: standard error.

	Germination at 25°C				**Germination at 5°C**			
Factor\Variables	**T25 (h)**	**T50 (h)**	**T75 (h)**	**Final rate (%)**	**T25 (h)**	**T50 (h)**	**T75 (h)**	**Final rate (%)**
Progeny-modalities								
Control	14.7 a	16.6 ns	19.6 ns	93 b	97.3 a	111.5 ns	131.1 ns	98 a
Early mild stress	13.4 a	15.8 ns	18.9 ns	99 a	81.9 a	98.9 ns	120.8 ns	98 a
3 late heat peaks	14.2 a	15.6 ns	17.5 ns	98 ab	99.7 a	111.4 ns	126.4 ns	99 a
4 late heat peaks	13.2 a	15.1 ns	17.7 ns	98 ab	100.4 a	112.3 ns	127.7 ns	98 a
Priming	12.8 a	15.5 ns	19.3 ns	93 b	79.3 b	104.7 ns	139.3 ns	94 b
se	*0.5*	*0.4*	*0.5*	*1.0*	*5.1*	*4.7*	*5.3*	
Mother-modalities								
Control	14.1 ns	16.8 ns	20.6 ns	97 ns	95.6 ns	111.4 ns	133.4 ns	96 ns
Early mild stress	13.9 ns	15.9 ns	18.4 ns	95 ns	93.9 ns	109.1 ns	129.1 ns	98 ns
3 late heat peaks	13.1 ns	15.2 ns	18.0 ns	98 ns	90.3 ns	105.1 ns	125.1 ns	97 ns
Priming	14.0 ns	16.1 ns	19.2 ns	95 ns	91.2 ns	109.1 ns	132.6 ns	98 ns
se	*0.4*	*0.4*	*0.5*	*1.4*	*4.3*	*4.5*	*6.1*	
Progeny effect	**0.037** *	0.131	0.063	**0.000** ***	**0.046** *	0.405	0.302	**0.007** **
Mother effect	0.168	0.111	0.178	0.147	0.859	0.765	0.533	0.810
Progeny x Mother	0.226	0.056	0.141	0.254	0.856	0.808	0.687	0.797

4.1.5. Discussion

Progeny effects overrule Mother effects in most seed quality criteria

Under both sulphur conditions, Progeny effects were predominant over Mother effects on most variables. Overall, our findings suggest that the effects of Mother-modalities (as described in Magno et al., 2021) did not pass on to the next generation, which supports that the stress-triggered modifications at the Mother level were erased. In consistence with Herman and Sultan (2011), Mother effects (i.e. herein transgenerational plasticity) do not entail negative impacts of the history of the Mother plants, such that they could be erased/reset when passed on to the next generation. This was not observed in Groot et al. (2017), as seed size was positively affected by Mother effect and to a much lesser extent Progeny effect. Because of contrasting findings in the literature, fine description of stress sequences i.e. in terms of stress intensity, duration, frequency and synchrony with phenological stages, are required to interpret resetting vs. memory strategies from an adaptive perspective at the light of the metabolic costs that sustain individual and species survival.

Regarding yield components, the Progeny effects were observed on yield and TSW from total seeds and seeds from $pods_{L<5cm}$, and TSW of seeds from $pods_{L\geq5cm}$, with the Progeny-priming being the most penalizing modality under both S conditions. Heat stress during flowering was shown to reduce seed yield as a consequence of alterations of gametogenesis, fertilization and damage on post-fertilization structures in canola (Elferjani and Soolanayakanahally, 2018). Other studies described the trade-off between grains number and grain weight and highlighted a hierarchy in the plasticities of these components such that the grain number was the only component able to adjust to massive stressful changes in contrast with grain weight (wheat, Slafer et al. (2014). By contrast, our results indicated that the number of seeds could not be adjusted anymore at the time of stress exposure whatever the pod categories and that the weight of seeds from $pods_{L\leq5cm}$ were the most impacted by stresses, in line with our previous conclusions (Magno et al., 2021). Under Low Sulphur, the other Progeny-modalities also impacted these seed yield components, but to a lesser extent (Table 1 (Chap. 4.1.) and Supplemental Data, Table 3 (Chap. 4.1.)). The one-off Mother effects were only observed on TSW of seeds from $pods_{L\geq5cm}$ under High Sulphur, and total TSW and TSW from $pods_{L<5cm}$ under Low Sulphur. These observations suggest that the Low Sulphur condition applied on the Progeny plants might have delayed flowering and further seed development and maturation, thus leading to Mother effects observed on younger seeds (from $pods_{L<5cm}$) at the timing of heat stress. They also indicate that two consecutive generations of plants growing in a S limiting environment are more susceptible to high temperature stress, thus leading to lower

thermotolerance compared to well-supplied plants. In addition, although Mother effects were weak, Mother-modalities impacted the Progenies performances in response to the Priming treatment in different directions (Supplemental Data, Tables 1 and 2 (Chap. 4.1.)). For instance, under the High Sulphur condition, while the Mother-3LHP induced contrasting progeny rankings for seed yield and seed number from $pods_{L\geq5cm}$, the Mother-EMS alleviated the differences among the Progeny-modalities for TSW of seeds from $pods_{L\geq5cm}$ (as the Progeny-priming did not differ anymore from the other Progeny-modalities). Under the Low Sulphur condition, the effects of the Mother-modalities on the Progeny rankings were also observed although distinct Mother-modalities alleviated or exacerbated the Progeny effects among the Progeny-modalities. The lowest total seed yield was also observed for seeds from two generations of plants challenged with the Priming treatment i.e. which underwent the longest cumulated duration of stressing days, as previously shown at the plant cycle level in Magno et al. (2021).

Similar to the yield-related variables, Progeny effects also prevailed over Mother effects on the concentrations of FAs-related variables and N under both sulphur conditions, as a one-off Mother effect was observed on the ω6:ω3 ratio under the High Sulphur condition (Table 2 and Supplemental Data, Table 4 (Chap. 4.1.)). As observed in Magno et al. (2021), the Progeny-priming (i.e. the longest stress duration) was also the most negative to FAs, SFAs, UFAs concentrations (low values) and to ω6:ω3 ratio (high value), which resulted in opposite effects on seed N and protein concentrations which is a well-known negative relationships in oil crops (Si et al., 2003 and references herein; Hammac et al., 2017). These observations confirm that high temperature throughout seed filling induced negative impacts on FAs contents and quality i.e. decreases in poly-UFAs in favor of SFAs and mono-UFAs, thus leading to high ω6:ω3 ratio as a result of temperature-triggered impairment of desaturase enzyme activity (Aksouh-Harradj et al., 2006; Baux et al., 2013; Brunel-Muguet et al., 2015b; Gauthier et al., 2017).

In consistence with the observations on yield components and nutritional quality criteria, seed desiccation tolerance, seed dormancy and germination behaviour were only impacted by Progeny-modalities. For both sulphur conditions, Progeny values pointed out that the longest the cumulated stress duration (over the two generations), the more negative the effects i.e. low [raffinose+stachyose]:sucrose ratio suggesting low desiccation tolerance, and high ABA:GA3 ratio indicating high seed dormancy. Nevertheless, under Low Sulphur Mother effects were observed on T75 at both germination temperatures along with interaction effects on the final rate at 5°C (Supplemental Data, Table 7 (Chap. 4.1.)). A slight positive effect of short heat stress applied on the Progeny plants (EMS, 3LHP and 4LHP) was observed on the final

rate at both temperatures under High Sulphur in contrast to the sulphur limiting conditions, for which the germination times courses were slowed down (Supplemental Data, Table 8, Figure 2 (Chap. 4.1.)), in line with prior studies (Brunel-Muguet et al., 2015b; D'hooghe et al., 2019). Consistently with most prior results, the lowest final germination rates at the optimal temperature were observed for seeds from the modalities combination that matched the longest stress duration over the two plant generations (Supplemental Data, Table 6 (Chap. 4.1.)). In terms of features of the stress events, the shortest duration combination over the two generations, which also matched with the latest events [Mother-3LHP x Progeny-3LHP] tended to be the least penalizing scenario for the yield and FAs- related variables (except for the ω6:ω3 ratio), which was less remarkable for N concentration, soluble sugars and the ABA:GA3 ratio under High Sulphur. As expected, the longest stress duration over the two generations which also matched with the earliness of stress application [Mother-priming x Progeny-priming] tended to be the most negative, except on N concentration. Under the sulphur limiting conditions, these observations slightly differed as a consequence of a delay in the phenology which impacted younger pods than under the non-limiting sulphur condition (e.g. total seed yield).

Intergenerational thermopriming protocols as climate acclimation strategy

One outcome of our study deals with the identification of Mother x Progeny stress combinations that penalize or improve yield and quality of seeds from two stressed generations, hence guiding towards thermotolerance acquisition breeding schemes. Figure 4 (Chap. 4.1.) displays the values of yield components and nutritional and physiological quality criteria for the 15 Mother x Progeny modalities combinations, expressed as the relative difference to the [Mother-control x Progeny-control] combination (i.e. both Mother and Progeny plants were grown under natural conditions). Similar patterns of responses to these combinations were observed for both sulphur conditions, such that the results will be discussed regardless of the S conditions and specifications will be provided when differences are observed.

Regarding yield components, slight increases in total yield were only observed under Progeny-control that derived from Mother-priming or Mother-EMS, which also demonstrate the overruling effect of the Progeny-modalities. The most negative combinations implied either the longest stress duration over the two generations or late stress events which impaired the filling phase of seeds from lately-fertilized flowers. In contrast, the number of seeds increased at the expense of averaged seed weight as usually observed for R-selected species such as the wild relative *Arabidopsis* that favors the dispersal of a large number of seeds which is not

predetermined before the reproductive stage as a consequence of adjustments to later stresses (Bennett et al., 2011). This trade-off between seed size and number was particularly exacerbated under our stressing conditions as it was also observed under drought stress (sesame, Najafabadi and Ehsanzadeh, 2017; wheat, Slafer et al., 2014). As previously mentioned, grain number appears to be a coarse-tuning stress-adjustment variable where grain weight might to act as a fine-tuning mechanism.

Under Low Sulphur, the features of the combinations that led to decreased yield and decreased seed weight gathered late events over the two generations which also matched the most intense events. This was likely explained by the delay and slowdown in the phenology induced by sulphur limitation (although moderate) which extended the seed development period until the late heat peaks event, thus resulting in longer heat stress sensitive window and penalties on later-formed pods and seeds.

The total FA concentration was negatively impacted under almost all combinations, with the most pronounced effects being induced by a high cumulated duration (i.e. for Progeny-priming modalities regardless of the history of the Mother plants). Indeed, two combinations under High Sulphur, led to unchanged concentrations i.e. [Mother-EMS x Progeny-EMS] and [Mother-3LHP x Progeny-3LHP] which indicates that the shortest the duration over the two generations, the less impacting. The little impact of an early stress is consistent with the mismatch with timing of seed storage compounds biosynthesis which starts by lipids along with starch (Baud et al., 2002; Borisjuk et al., 2013). As expected, the concentrations in SFA benefited from high temperature as a consequence of the impairment in the desaturase enzyme activity (Menard et al., 2017) with logically more pronounced effects upon late events during the Progeny cycle, regardless of the history of the Mother plants. Therefore, increased values of the ω6:ω3 ratio, which is a negative diet characteristic (Simopoulos, 2006), were more prone to be observed under the late heat peaks modalities. By contrast, an early mild stress on the Progenies, regardless of the history of the Mother plants, slightly decreased the ω6:ω3 ratio, thus improving this targeted characteristic. As expected, due to the extension of the heat stress sensitive window resulting from sulphur limitation, these negative effects on FAs concentrations were exacerbated especially when late heat peaks were applied over the two generations. By contrast with FA concentrations, the Progeny-priming displayed expectedly the highest N concentrations regardless of the history of the Mother plants, under both sulphur conditions. This effect was more pronounced under High Sulphur. The effective priming effect observed on N concentration on the first stressed plants generation (Magno et al., 2021) was not reset under the temperature modalities applied to the offspring, as the values of the

different Progeny-modalities from the Mother-priming plants were higher than the [Mother-control x Progeny-control] combination except for seeds from Progeny-control. There might be a slight dilution of the beneficial priming effect, as the value of the seeds from the Priming treatment at the first generation (Magno et al., 2021) was higher than the values of the seeds from the [Mother-priming x Progeny-control] combination. This dilution effect over successive generations was also observed in Groot et al. (2017), where transgenerational effects were usually weaker and less commonly observed than effects observed of the stress applied on the last generation of plants (offspring).

The priming effect observed on the first stressed plants generation for the [raffinose+stachyose]:sucrose ratio used as a proxy of seed desiccation tolerance (Magno et al., 2021) was not observed on the offspring as lower values were observed for all the combinations compared to the [Mother-control x Progeny-control] combination, except for seeds from two generations of plants challenged with early mild stress only under High Sulphur. These results also suggested that the late heat peaks were the most detrimental events to the acquisition of desiccation tolerance under both sulphur supplies, whether they occurred at the first or the second plant generation, as the soluble sugars biosynthesis was likely to overlap the timing of the soluble sugars biosynthesis and/or maturation.

Regarding seed S concentrations under High Sulphur, higher values were mostly observed, meaning that heat stress did not impair sulphur allocation to the seeds while the seed weight decreased. Whether the amount of S in the seeds was assimilated or stored under mineral forms remains to be investigated so as to claim the benefits of heat stress on S-containing proteins (including napins sand cruciferins) which are of interest in high protein-oil cakes used for cattle feeding. Seed dormancy was the most impacted by heat stress at both sulphur conditions although in contrasting ways, since relative increased ABA:GA3 ratios were mainly observed under High Sulphur unlike under Low Sulphur. However, several combinations led to reduce the relative ABA:GA3 ratio, thus breaking seed dormancy, but no straightforward features (in terms of timing, duration nor intensity) could be identified. As observed in Magno et al. (2021), the Progeny-priming led to the highest increases regardless of the Mother-modalities under High Sulphur. Low Sulphur had negative impact on the ratio, which was also observed when comparing the [Mother-control x Progeny-control] modalities under both sulphur supplies. However, heat sequences tended to alleviate the negative impact of S limitation as for most combination, the relative ABA:GA3 ratios increased. This might be another consequence of the delay in the phenology thus making the developing seeds more

prone to germinate as already observed under heat stress and eventually to undergo pre-harvest sprouting (Brunel-Muguet et al., 2015b).

Finally, the final germination rate remained almost unchanged under both sulphur conditions. The early mild stress applied on the Mother plants led to a slight decrease in final rates at optimal temperature under High Sulphur. Although little effects on relative final rates were observed, germination times courses were much more affected (Supplemental Data, Tables 6 and 7 (Chap. 4.1.)) which is important for base temperature calculations, thus meaning that repeated stresses over several plant generations can lead to changes in the base temperature value usually defined at the species, and sometimes, genotype levels. Overall, increases times courses were observed under heat stress meaning that the germination behaviour is tightly related to the history with the seed's ancestors and that their environmental conditions could help interpreting the germination behaviour of seedlots produced in the fields.

These results clearly pointed out the complexity of priming effects which are criteria-dependent in addition to stress features-determined. Indeed, as observed in other inter/transgenerational studies, the beneficial effects of prior stress exposures are observed on specific behavior and stage on the progeny. Yadav et al. (2020) demonstrated positive impacts of multigenerational exposure to heat stress at the mature plant-stage (i.e. survival rate under heat stress at bolting) but not at the germination stage in Arabidopsis. In addition, although we observed that the offspring performances were mainly driven by the stress sequence applied on the Progeny, the history of the Mother plants leads to different extent of the Progeny responses to heat stress. For some variables, the accumulation of stress days over the two generations leads to amplified negative impact (e.g. seed weight, ω6: ω3 ratio), or to a negative impact while the stress sequence at the Mother plant level had a priming effect (e.g. [raffinose+stachyose]: sucrose ratio). For other variables, the negative effect of the stress sequence applied on the Mother plants disappeared when the Progenies were not stressed (e.g. total fatty acids), which might indicate that the effects were not memorized and rather reset when passed on to the next generation. However, although positive effects of heat treatment across multiple generations could be highlighted on reproductive outputs (e.g. seed production) in Arabidopsis (Whittle et al., 2009), in our conditions, no priming effect of a stress sequence applied on the Mother plants, could be observed on the offspring performances when challenged with heat stress.

(a)

Temp-modalities		Yield components			Seed nutritional quality criteria								Seed physiological quality indicators			
Mother	Progeny	Total yield	Total SN	Total TSW	Total FA	UFA	SFA	ω6:ω3	C	N	S	Protein	ABA:GA3	SS ratio	Final rate at 25°C	Final rate at 5°C
Control	Control	7,9	1741,7	4,6	29,2	26,7	2,4	1,7	48,5	3,2	0,35	176,7	0,7	0,41	97	96
Priming	Control	+1%	0%	+2%	-1%	-1%	+1%	0%	-3%	-3%	-6%	-3%	+81%	-5%	-6%	+2%
	Priming	-35%	+12%	-40%	-43%	-44%	-23%	+46%	-7%	+25%	+40%	+25%	+212%	-51%	-6%	0%
	EMS	-21%	-11%	-11%	-14%	-14%	-11%	-1%	-2%	+16%	+9%	+15%	+30%	-15%	+3%	+2%
	4LHP	-11%	+2%	-10%	-7%	-8%	+7%	+24%	-3%	+9%	+11%	+9%	-6%	-22%	+1%	+3%
	3LHP	-8%	+8%	-13%	-8%	-9%	+2%	+11%	-1%	+9%	+6%	+9%	-64%	-20%	+1%	+3%
EMS	Control	+10%	+26%	-13%	-2%	-2%	+3%	+2%	-9%	+2%	-6%	+1%	-54%	-10%	-10%	+3%
	Priming	-31%	+3%	-31%	-50%	-52%	-27%	+49%	-8%	+36%	+23%	+36%	+151%	-51%	-2%	-3%
	EMS	-5%	+12%	-14%	0%	0%	+4%	-2%	+1%	-1%	-3%	-1%	-1%	+12%	+3%	+3%
	4LHP	-16%	+10%	-21%	-16%	-18%	-1%	+33%	-5%	+12%	+3%	+12%	+18%	-37%	2%	+4%
	3LHP	-6%	+9%	-13%	-4%	-4%	+6%	+9%	-2%	+7%	+3%	+7%	+19%	-22%	+1%	+4%
3LHP	Control	-10%	-3%	-8%	-5%	-5%	-4%	-2%	+3%	+13%	0%	+13%	-61%	-24%	+2%	+2%
	Priming	-25%	+3%	-25%	-33%	-34%	-14%	+35%	-7%	+22%	+23%	+22%	+48%	-39%	-2%	-2%
	EMS	-15%	-7%	-9%	-12%	-12%	-8%	-2%	-2%	+15%	+9%	+15%	+12%	-10%	+2%	+3%
	4LHP	-12%	0%	-11%	-9%	-10%	+4%	+20%	-3%	+12%	+3%	+12%	-21%	-32%	+2%	+1%
	3LHP	-1%	+13%	-12%	0%	-1%	+5%	+7%	-2%	0%	-9%	0%	-58%	-20%	+3%	+3%

(b)

Temp-modalities		Yield components			Seed nutritional quality criteria								Seed physiological quality indicators			
Mother	Progeny	Total yield	Total SN	Total TSW	Total FA	UFA	SFA	ω6:ω3	C	N	S	Protein	ABA:GA3	SS ratio	Final rate at 25°C	Final rate at 5°C
Control	Control	7,1	1552,3	4,6	29,8	27,4	2,4	1,7	45,4	3,5	0,34	191,1	1,2	0,33	96	98
Priming	Control	+8%	+21%	-11%	-1%	-2%	+2%	+3%	+1%	-8%	-18%	-8%	-28%	-3%	-1%	+2%
	Priming	-14%	+45%	-41%	-41%	-43%	-21%	+51%	-4%	+4%	-18%	+4%	-78%	-36%	-1%	+1%
	EMS	-7%	+13%	-19%	-14%	-15%	-8%	+3%	-6%	+3%	-24%	+3%	-82%	+3%	+4%	+2%
	4LHP	-2%	+28%	-23%	-12%	-14%	+7%	+36%	0%	+2%	-15%	+2%	-79%	-27%	+3%	+1%
	3LHP	+6%	+42%	-26%	+3%	+2%	+15%	+11%	0%	-10%	-24%	-10%	+1%	-18%	+3%	0%
EMS	Control	0%	+17%	-15%	+1%	+1%	+3%	+1%	0%	-1%	+6%	-1%	-26%	+6%	+4%	+2%
	Priming	-27%	+4%	-29%	-43%	-45%	-23%	+53%	-7%	+8%	-15%	+8%	-74%	-42%	+1%	+1%
	EMS	-20%	+1%	-20%	-21%	-22%	-11%	+7%	0%	+3%	-32%	+3%	-78%	-21%	+1%	0%
	4LHP	-2%	+27%	-22%	-19%	-21%	0%	+40%	-2%	+4%	-9%	+4%	-76%	-33%	+1%	-1%
	3LHP	+2%	+33%	-23%	-9%	-9%	-1%	+12%	+1%	0%	-6%	0%	-70%	-18%	+3%	+2%
3LHP	Control	+2%	+8%	-6%	+6%	+5%	+9%	+4%	0%	-3%	-21%	-3%	-61%	-12%	-6%	-1%
	Priming	-21%	+11%	-29%	-46%	-48%	-20%	+51%	-9%	+12%	-9%	+12%	-75%	-45%	0%	+2%
	EMS	-12%	+5%	-16%	-16%	-17%	-9%	+2%	-3%	+5%	-24%	+6%	-84%	+3%	+3%	+2%
	4LHP	-12%	+10%	-20%	-20%	-22%	0%	+43%	-3%	+9%	-6%	+9%	-80%	-30%	+2%	+2%
	3LHP	-13%	-6%	-7%	-3%	-4%	+8%	+18%	0%	-1%	-21%	-1%	-7%	-18%	+1%	+2%

Decrease (-) ← -10% 0 +10% → Increase (+)

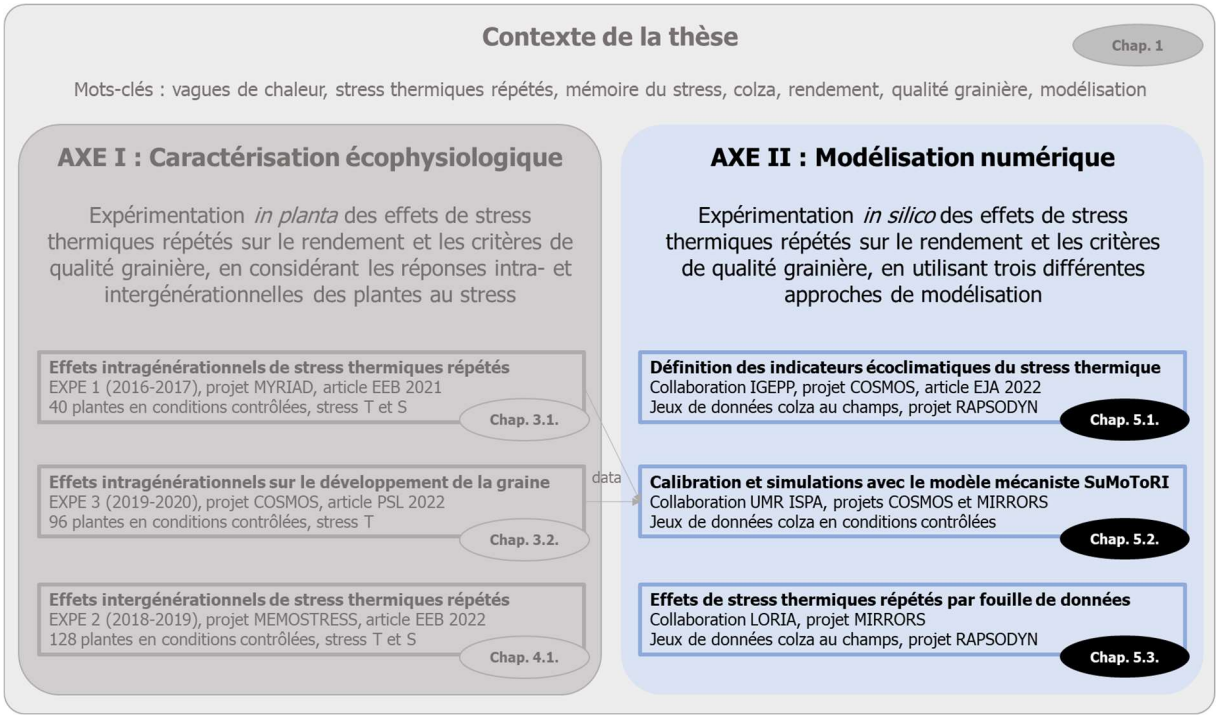
Figure 4 (Chap. 4.1.) : Summary of the effects of the combined temperature sequences (Mother x Progeny) in yield components, nutritional and physiological quality criteria under both High Sulphur (a) and Low Sulphur (b) conditions. Numbers in boxes display the relative difference between the stressed modality and the [Mother- control x Progeny-control] modality. As illustrated in the legend, colours indicate the trends by level of increase or decrease. SN: seed number, TSW: Thousand Seed Weight, FA: fatty acid, UFA: unsaturated FA, SFA: saturated FA, C: carbon, N: nitrogen, S: sulphur, ABA: abscisic acid, GA3: gibberellic acid, SS: soluble sugars.

4.1.6. Conclusion

The underlying objective of this work was to pinpoint, in a crop species, whether the temperature stress history experienced by the Mother plants impacted the Progeny responses to heat stress. Our results highlighted several significant results: (i) the Progeny effects overruled the Mother effects on most criteria, but the history of the Mother plants had an impact on the extent of the offspring responses to heat stress; (ii) the effects of heat stress sequences were strongly correlated with the duration of high temperature events over the two generations and they should be interpreted regarding the synchrony between the timing of the stress event and the dynamics of the seed storage compound synthesis; (iii) priming effects observed on the first stressed-plant generation for specific quality criteria (seed N concentrations and soluble sugar ratio used as a proxy of desiccation tolerance) were not systematically maintained (for the proxy of desiccation tolerance only) as a result of negative accumulated effects of late heat peaks or a reset of the stress induced modifications; and (iv) sulphur limitation had little effect on the Progeny responses to heat stress, and when the effects were amplified, it was due to the delay and slowdown in the phenology which resulted in a longer heat stress sensitive window. Interestingly, S restriction led to lower heat stress-induced seed dormancy.

Eventually, these highlights should be bear in mind in the perspective to define multiple generations priming protocols in oilseed rape, and more widely demonstrated the challenge of defining priming-based acclimation strategies due to trade-offs between criteria and the fine tuning (i.e. in terms of heat sequence features and adequate S-fertilization supply to target the desired seed characteristics). In conclusion, our results suggest different processes that support intergenerational memory, as their extent, persistence and impact (positive or negative) vary according to seed characteristics.

Chapitre 5 :
Modélisation des effets des stress thermiques répétés



5.1. Utilisation des indicateurs écoclimatiques pour améliorer la prise en compte des stress thermiques répétés dans les approches de modélisation

5.1.1. Préambule

Ce chapitre présente les résultats obtenus suite au traitement des données issues du projet RAPSODYN, qui a permis de définir des indicateurs écoclimatiques. Cette approche repose sur (i) le décompte de jours de stress (dont l'intensité a été fixée sur la base de la littérature) sur des intervalles de croissance les plus critiques aux stress thermiques, entre la floraison et la maturité du colza ; et (ii) l'analyse des interactions entre les stress répétés précoces et tardifs dans le cycle de culture. D'abord les jeux de données ont été analysés par des Focused Principal Components Analysis (FPCA) dans l'objectif de visualiser les corrélations entre les indicateurs écoclimatiques pour chaque variable de performance des plantes disponible dans les jeux de données. Ensuite, des modèles de type régression linéaire multiple mettant en relation les indicateurs écoclimatiques (variables explicatives) et les performances du colza (variables d'intérêt) ont été créés en se basant sur l'Akaike Information Criterion (AIC). Mes travaux sur la définition des indicateurs écoclimatiques et la prédiction des performances par ces indicateurs ont servi à valoriser ces jeux de données colza. Cette démarche originale a été mise à disposition pour la communauté scientifique grâce à la publication d'un article valorisant ces travaux (Magno et al., 2022b).

Article Magno et al, 2022 EJA : principaux résultats

- Les stress thermiques répétés après la floraison impactent le rendement et la qualité des graines de colza, notamment les teneurs en lipides et protéines.

- Les indicateurs écoclimatiques permettent une analyse plus fine des stades de croissance critiques des plantes associés à des seuils de température spécifiques.

- L'utilisation de ces indicateurs écoclimatiques a permis de démontrer de façon mathématique que l'effet d'une succession d'événements stressants n'est pas égal à la somme des effets individuels de chaque événement stressant.

- La prise en compte de la mémoire des stress peut aider à améliorer les modèles prédictifs de culture dans un contexte d'augmentation de la fréquence des vagues de chaleur.

European Journal of Agronomy 141 (2022) 126622

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Agronomy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eja

To what extent can ecoclimatic indicators assist crop performance predictions in oilseed rape upon repeated heat stresses?

Lethicia Magno Massuia de Almeida [a], Erwan Corlouer [b], Anne Laperche [b], Nathalie Nesi [b], Alain Mollier [c], Sophie Brunel-Muguet [a,*]

[a] EVA, Normandie Université, UNICAEN, INRAE, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, SFR Normandie Végétal (FED 4277), Esplanade de la Paix, 14032 Caen, France
[b] IGEPP, INRAE, Institut Agro Rennes, Rennes 1, Le Rheu 35650, France
[c] ISPA, INRAE, Bordeaux Sciences Agro, UMR1391, F-33882 Villenave d'Ornon Cedex, France

Modelling is an obligate approach to predict crop yield under a wide range of environmental conditions. The present work aims to improve predictions of crop performance under repeated high temperature events by (i) demonstrating that ecoclimatic indicators (i.e. calculated for a given phenological stage) allow a finer description of the plant critical stages, and (ii) highlighting the non-additive effects of these successive stressful events. For this purpose, statistical models based on large datasets in oilseed rape were developed to look for correlations between ecoclimatic indicators and the plant performance-related variables (i.e. seed yield, lipid and protein content), as follows: (i) the plant cycle was divided into four intervals after flowering, according to the physiological stages of development in oilseed rape; (ii) the number of warm days (i.e. above 25°C and 30°C, respectively) in each interval for 26 combinations of location x year in France was scored; (iii) several statistical models that differed from the combination of ecoclimatic indicators were evaluated; and (iv) the best fit model for each plant performance-related variable was selected following a stepwise approach based on the Akaike Information Criterion. The results highlighted that contrasting final crop performances were tightly related to the timing, frequency and intensity of high temperature events after flowering. In addition, specific combinations of these ecoclimatic indicators were much more predictive of the crop performance-related variables than a single cumulative indicator which reflects the sum of all stresses in the same period. These results support our prior assumption that the outcome of several successive stressful events is not equal to the sum of each individual effect. The proposed approach is a proof of concept of the need to consider stress memory (i.e. the capacity of plants to store and retrieve information acquired during an initial exposure to stress) in predictive crop models, so as to better estimate the effects of repeated stresses and their consequences on crop yield and quality of harvested products.

Keywords: oilseed rape, heat stress, stress memory, crop modelling, indicators.

5.1.2. Introduction

Climate change is a key driver of crop performances, which makes it an obligate component to predict the quantity and quality of harvested products. Simulations under different climatic scenarios can provide useful information to adapt management practices (i.e. earlier sowings, new cultivars, innovative fertilization strategies) in order to maintain, or even improve, crop performances under changing environments. Prior studies estimated that about 30% of the interannual yield variations of the main field crops are the result of variations in temperature and rainfall (Lobell and Field, 2007; Ray et al., 2015). For instance, extreme events such as heat waves are expected to become more frequent, to last longer and to increase in intensity according to the last IPCC report (IPCC, 2021) and other prospective works (Bador et al., 2017; Christidis et al., 2015; Lemonsu et al., 2014; Trnka et al., 2014). These new climatic patterns impel to unravel their complex effects for predictive crop modeling purposes, which remains a challenging task because it requires to integrate the effects of the 4-fold features of a climatic event (i.e. intensity, timing, duration and frequency), as well as their synchrony with crop phenological stages).

Plant responses to heat stress are tightly related to its development stage when the climate stressful event occurs. It is well known that a short period of extreme temperature at some critical stage can be as impacting to crop production (or even more) as a mild temperature stress over a longer period (Aksouh-Harradj et al., 2006; Aksouh et al., 2001; Angadi et al., 2000; Chen et al., 2020; Wu et al., 2020). The reproductive stage is the most susceptible stage to temperature stress in most crops, including oilseed rape (Angadi et al., 2000; Gan et al., 2004; Habekotté, 1997a). Because winter oilseed rape varieties - which are mainly grown in Europe - have a long crop cycle, plants are more likely to be exposed to a wide range of climate conditions from freezing periods to heat waves. High temperature events often coincide with the critical flowering and pod development periods in oilseed rape, thus impacting seed yield and quality. Most studies have highlighted threshold values above which flowering and pod development are impaired, and thus provide important indications with respect to the maximum cumulated high temperature exposition for a given development stage (Aksouh-Harradj et al., 2006; Angadi et al., 2000; Brunel-Muguet et al., 2015b). However, few studies were designed to assess whether the response of plants to a climate extreme event was modified when they were previously exposed to similar stresses, i.e. if they memorize and retrieve the first stress exposure-triggered information that will interfere with the subsequent response to a following stress (Crisp et al., 2016; Kinoshita and Seki, 2014). Important advances in understanding stress memory have been made in the perspective of priming crops

to face future climate (Liu et al., 2021a). In oilseed rape, intra and intergenerational effects of high temperature exposures were observed thus raising the importance of considering the repetitive features of heat stress exposures to better understand the crop responses (Magno et al., 2021, 2022a). These observations on stress memory raise the question of how to characterize and to take into account the effects of repeated stress events into the predictions of crop performances.

So far, to quantify the effects of future climate change on crop phenology and production, mechanistic and statistical modelling approaches have been developed and extensively used (Asseng et al., 2015a; Chenu et al., 2017; Kumar, 2016; Martre et al., 2015; Rötter et al., 2013; Tao et al., 2018; Wang et al., 2017a; Zhai et al., 2017). While the first one attempts to capture the effects of environmental factors on major biological processes through the conceptualization and calibration of process-based models (crop models), the second approach seek correlations between agroclimatic indicators and output variables such as growth indices, phenology and other crop performance-related criteria (Hundal et al., 2003). These agroclimatic indicators derived directly from climatic variables (e.g. number of heat or cold days and the number of water excess or deficit over specific calendar periods), and provide synthetic information on the effects of climate on crop functioning (Caubel et al., 2015). These modelling approaches are usually implemented from mean climate parameters and/or cumulated effects over the crop cycle, without considering changes in climatic variability through extreme events, such as drought and heat waves (Luo et al., 2010; Wilcox and Makowski, 2014). Lines of evidence support the necessity of improving crop climate models, and especially the temperature response functions in order to reduce uncertainty in yield simulations before further decision-making on agriculture management (Rötter et al., 2011; Wang et al., 2017a). Nevertheless, no process-based modelling studies have attempted to consider the effects of repeated heat stresses, especially because of the complexity to reflect the memory effects on the biological processes in the models and the feedback loops. An alternative to this approach relies on the development of relevant agroclimatic indicators into statistical models, which are easier to implement and manipulate under large field conditions (Rötter et al., 2013; Trnka et al., 2011). However, most agroclimatic indicators fail to focus on specific development stages, which is an issue considering that the plant responses to climatic stresses are stage-dependent. As proposed by Caubel et al. (2015), accurate information could be provided using agroclimatic indicators that are calculated given a particular plant processes over phenological periods, thus called ecoclimatic indicators. So far, no use of these ecoclimatic indicators attempt to represent the effects of repeated stresses that could be explained by the

interactions between these indicators, i.e. how the effect of one event is modulated by the effect of a previous event.

In the present work, we aim to improve predictions of crop performance under repeated high temperature stresses by (i) demonstrating that ecoclimatic indicators (i.e. calculated for a given phenological stage) allow a finer description of the plant critical stages to high temperature stress, and hence a better prediction of crop performances than cumulated indicators over the crop season, and (ii) highlighting the non-additive effects of successive high temperature stressing events, thus indicating the benefits of considering stress memory for better crop performance-related predictions. Overall, we highlight the need to consider both plant physiological stages and stress memory into modelling approaches, so as to better predict crop performances under climate change condition.

5.1.3. Materials and methods

Plants growth conditions in the field trials

Field experiments were conducted between 2011 and 2018 in 16 different locations in France. Experiments were conducted using conventional crop management practices (i.e. fertilization, weeds, pests, and pathogens control) for winter oilseed rape. Each trial was designed as a randomized block with two to four repetitions in the field. Three genotypes (i.e. Aviso, Montego and Alpaga), mainly contrasted for earliness at flowering and height (Corlouer et al., 2019), were characterized at maturity by measuring the seed yield (in $q.ha^{-1}$), seed number (in $nb.m^{-2}$), and thousand seed weight (TSW, in grams), as well as the seed quality criteria defined by the lipid content (%DW) and protein concentration (%DW). As the original field datasets were provided by an independent experimental network, data was manually sorted prior to the analysis to remove the years of harvest in which particular field management practices were tested (e.g. induced nitrogen limitation) and the datasets with well-known climate abnormalities that might prevent the effects of heat stress to be studied solely (e.g. 2017, a year with severe drought in several areas in France). This data selection resulted in datasets representing 26 combinations of a given location by the year of harvest, hereafter named environment (as described in Corlouer et al. 2019), thus totalizing 170 individuals (combining environment, genotype and repetition). The range of variations of the performance-related variables in the 26 environments are presented in Table 1 (Chap. 5.1.), with maximum, minimum and mean values of the three genotypes pooled altogether.

Definition of ecoclimatic indicators based on key periods after flowering

The goals of this work were (i) to build high temperature indicators associated to specific physiological stages in oilseed rape, namely ecoclimatic indicators, and (ii) to correlate and model their effects on the seed yield and quality criteria in oilseed rape. For this purpose, the crop cycle was divided into four consecutive and non-overlapping periods from flowering until harvest (Figure 1 (Chap. 5.1.)), as defined in Corlouer et al. (2019). Dates of sowing and harvest for each of the 26 environments were provided in the original datasets. The number of days until flowering for each environment was also provided, thus allowing to calculate the specific flowering date considering the earliness of each genotype (i.e. Aviso, Montego and Alpaga). The four post-flowering periods were defined on the base of growing degree days (GDD), by accumulating the thermal time from the specific flowering date using a base temperature of 0°C (Corlouer et al., 2019; Jullien et al., 2011). The P300 period lasts 300 GDD after the onset of flowering, when the seed set is established (Habekotté, 1997b). The P600 period starts at the end of P300 and lasted 300 GDD, resulting in 600 GDD accumulated from flowering, when reserve allocation to the pods growth occurs. The P1000 period starts at the end of P600 and lasts 400 GDD, resulting in 1000 GDD accumulated from flowering, and matches the period when reserves are primarily allocated to seeds growth. Finally, the Pharv period starts at the end of P1000 and ends at the harvest date, then representing the seed final maturation stage. These intervals (i.e. P300, P600, P1000 and Pharv) were defined as key periods of the oilseed rape reproductive stage. The sum of these intervals resulted in the construction of two additional indicators considering the whole period post-flowering, hereafter named Ptot.

The climatic data that cover the whole plant cycle collected in each in the 26 environments were obtained from the public data catalogues of Météo France (Corlouer et al., 2019) and/or from the INRAE CLIMATIK platform (https://agroclim.inrae.fr/climatik/, in French) managed by the AgroClim laboratory of Avignon, France. The daily temperature thresholds of 25°C and 30°C were chosen based on previous studies that highlight negative impacts in oilseed rape production (i.e. reduced yield and seed quality degradation) when plants were exposed to daily temperatures over to 25°C, also with temperatures over to 30°C representing heat peaks late on the crop cycle (Aksouh et al., 2001; Magno et al., 2021, 2022a). Then the number of warm days (i.e. above 25°C and 30°C, respectively) in each of the 26 environments was scored using R (version 4.0.2, R Core Team, 2020). Therefore, 10 ecoclimatic indicators were defined (Figure 1 (Chap. 5.1.)), considering the distribution of the warm days over the pre-defined intervals after flowering (i.e. P300, P600, P1000 and Pharv) and within the whole post-

flowering period (i.e. Ptot), as follows: (i) those representing the number of warm days above 25°C in each crop interval (named P300_25, P600_25, P1000_25 and Pharv_25); (ii) those representing the number of warm days above 30°C in each crop interval (named P300_30, P600_30, P1000_30 and Pharv_30); and finally (iii) those representing the total number of warm days above 25°C and 30°C from flowering until harvest (named Ptot_25 and Ptot_30).

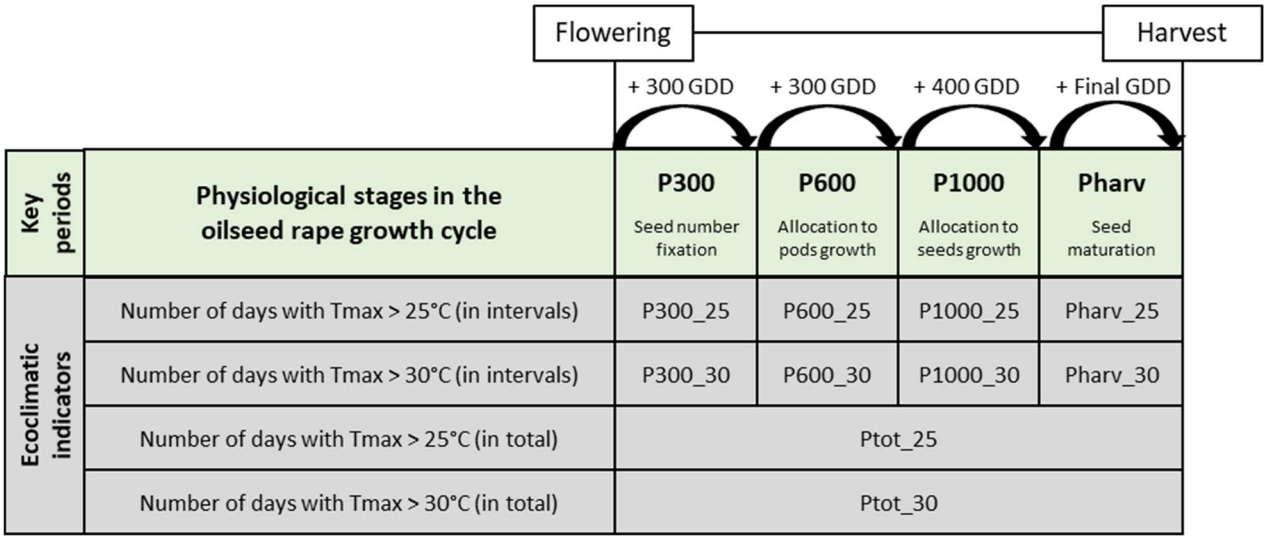


Figure 1 (Chap. 5.1.) : Simplified scheme of oilseed rape growth stages after flowering, displaying the physiological intervals based on key periods (in green). Ten ecoclimatic indicators were created (in gray), being eight of them based on the physiological intervals and two of them considering the whole period post-flowering. GDD: growing degree days; Tmax: daily maximum temperature; harv: harvest; tot: total.

Statistical approach to model crop performances

A Principal Component Analysis (PCA) was performed to establish relationships between the final performance-related variables (i.e. seed yield, seed number, thousand seed weight, seed lipid and protein concentrations) and the 10 pre-defined ecoclimatic indicators using packages FactoMineR and factoextra from R (Figure 2 (Chap. 5.1.)). In addition, a Focused Principal Component Analysis (FPCA, Figure 3 (Chap. 5.1.)) was performed to highlight the relationships between each performance-related variables (i.e. the plant's responses) and the ecoclimatic indicators (i.e. the explanatory parameters), as detailed in Falissard (1999). Then, three statistical models were built and tested for each of the five plant final performance-related variables, as follows: (i) Model 1, which includes the cumulative ecoclimatic indicators from flowering to harvest (i.e. Ptot_25 and Ptot_30); (ii) Model 2, which considers the additive

relationship between the ecoclimatic indicators defined by intervals; and (iii) Model 3, which considers all the individual parameters from Model 2 and also the interactions between the early (defined over P300 and P600) and the late (defined over P1000 and Pharv) ecoclimatic indicators. To select the best fit predictive parameters to each tested model, we used an automatic stepwise approach based on the Akaike Information Criteria (AIC), performed with the stepAIC function from the MASS package in R (Akmouche et al., 2019). This approach allows the sequential selection of parameters with a significant effect ($p< 0.05$), as described in Zhang (2016). If the indicator contributes to the predictive power of the model then it is retained; otherwise, if it no longer contributes significantly, the indicator is excluded. This method ensures that only significantly predictor indicators are included in the model, as detailed in Rötter et al. (2013). This approach allows to analyze to what extent the predictions of plant performances can be improved by considering (i) stressful events over intervals based on crop physiological stages rather than post-flowering cumulative indicators (Model 1 vs. Model 2), thus demonstrating that the outcome of several successive stressful events is not equal to the sum of each individual effect; and (ii) interactions between early and late stage ecoclimatic indicators (Model 2 vs. Model 3), as a way to reflect the effects of repeated stresses, and eventually capture stress memory effects. The genotype was not considered as an explanatory indicator in the construction of the models, because the genotype clusters were not discriminant in the PCA analyses (as shown in the individual's factor map, data not shown). To compare the three models tested to predict each final performance-related variable, we looked into the R-squared (the larger the values, the better the prediction power of the model), and the p-values (the smaller the values, the more significant the parameters).

5.1.4. Results

Relationships between ecoclimatic indicators and final performance-related variables

The PCA (Figure 2 (Chap. 5.1.)) was used to identify relationships among the final performance-related variables and the pre-defined ecoclimatic indicators, thus allowing to highlight their relevance as predictive parameters regardless of the genotype. The first four components accounted for 78.8% of the variance (Figure 2a (Chap. 5.1.)). The PC1, which contributed to 31.3% of the total variance, was mainly associated with the climate indicators such as Ptot_25 (20.5%), Ptot_30 (17.2%), Pharv_25 (17.5%) and Pharv_30 (17.0%). The PC2, which contributed to 23.5% of the total variance, was mainly explained by TSW (21.6%), seed lipid concentration (17.3%) and seed protein concentration (10.9%) for plant variables, and only P300_25 (19.8%) as ecoclimatic indicator. PC3 and PC4 contributed to 13.6% and

10.5% of the total variance, respectively. As expected, P300_30 and P600_30 did not contribute to any principal component, as heat peaks over to 30°C do not likely occur during the first two pre-defined intervals after flowering in winter oilseed rape. As their contribution was non-existent, these two ecoclimatic indicators were removed from the composition of Models 2 and 3. The individual's factor map (Figure 2b (Chap. 5.1.)) highlighted four clusters that illustrate the four climate types for oilseed rape production in France, as defined by the French oilseed technical institute Terres Inovia (https://www.terresinovia.fr/-/date-de-semis-colza-semer-avant-la-pluie, 2019). Because ecoclimatic indicators explained PC1, this axis clearly discriminates these four climate types which spread out along the axis. The PC2 allowed the discrimination of the Mediterranean climate type as a consequence of the major contribution of the P300_25 to this component. These observations are consistent with expected features of the Mediterranean climate type more prone to heat peaks over 25°C that occur early in the crop cycle compared to other locations. Overall, the PCA highlight straightforward correlations between the final performance-related variables and the majority of the pre-defined ecoclimatic indicators, excluding only those related to the P600 and P1000 intervals which do not seem to be very determinant to PC1 and PC2.

To analyze to what extend each ecoclimatic indicator contributed positively or negatively to the plant performance-related variable, a FPCA (Figure 3 (Chap. 5.1.)) was performed to each variable of interest according to Falissard (1999). In contrast with PCA, the FPCA allows to visualize both the correlations between the ecoclimatic indicators for a given variable and the correlations among the ecoclimatic indicators themselves (Canuto et al., 2010). Figure 3a (Chap. 5.1.) shows that the correlations between ecoclimatic indicators and seed yield were predominantly negative (yellow dots) rather than positive (green dots), although not significant as the dots were mainly plotted in concentric circles representing $r \leq 0.4$ (correlation coefficient), thus indicating that the majority of the correlations were weak. Interestingly, three independent clusters of ecoclimatic indicators can be observed, according to temperature intensity (i.e. 25°C vs. 30°C) and the earliness of stress exposure (i.e. contrasting positions for {P300 and P600} and {P1000 and Pharv}). For seed number (Figure 3b (Chap. 5.1.)) and TSW (Figure 3c (Chap. 5.1.)), significant relationships can be observed with the same ecoclimatic indicators (i.e. P300_25 and P1000_25). Nevertheless, their effects were opposite as they were both positive on TSW and negative on seed number. Similar to TSW, lipids (Figure 3d (Chap. 5.1.)) were also negatively impacted by P300_25 and P1000_25, while proteins (Figure 3e (Chap. 5.1.)) were mostly negatively impacted by high temperature events arriving at the end of the plant cycle (Pharv_25 and Pharv_30) and positively impacted by P300_25.

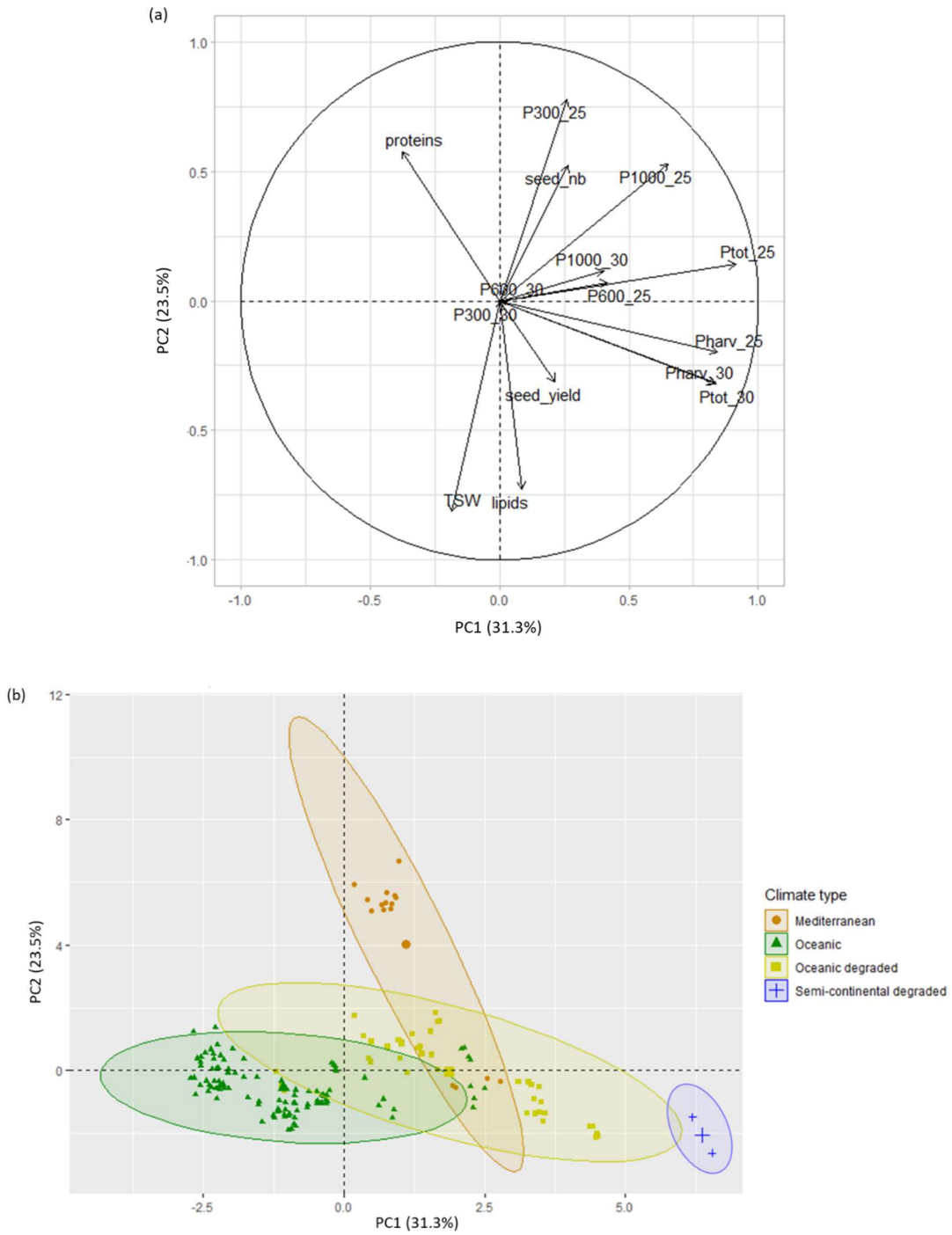


Figure 2 (Chap. 5.1.) : Principal Component Analysis (PCA) of the final plant performance-related variables (i.e. seed yield, seed number, thousand seed weight, seed lipid and protein concentrations) and the 10 pre-defined ecoclimatic indicators (i.e. P300_25, P300_30, P600_25, P600_30, P1000_25, P1000_30, Pharv_25, Pharv_30, Ptot_25 and Ptot_30) of the first two components PC1 and PC2. (a) the variable factors map, and (b) the individual's factor map distinguishing the four climate types for oilseed rape production in France according to Terres Inovia (2019).

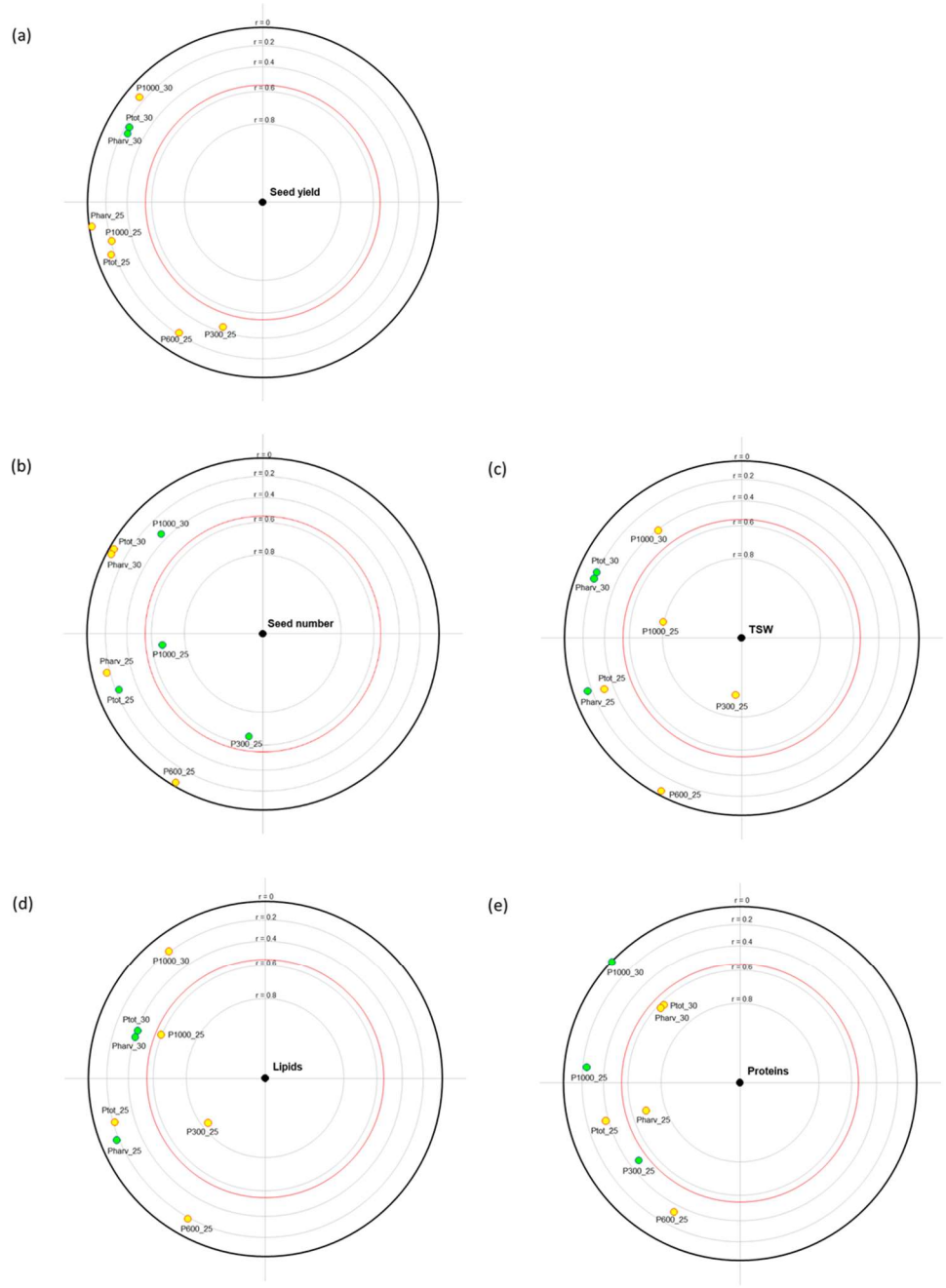


Figure 3 (Chap. 5.1.) : Focused Principal Component Analysis (FPCA) of the final performance-related variables (i.e. seed yield (a), seed number (b), thousand seed weight (c), seed lipid (d) and protein concentrations (e)) and the 10 pre-defined ecoclimatic indicators (i.e. P300_25, P300_30, P600_25, P600_30, P1000_25, P1000_30, Pharv_25, Pharv_30, Ptot_25 and Ptot_30). Negative and positive correlations between ecoclimatic indicators and the variable of interest are differentiated in the graph by colors (yellow and green, respectively). Two points close to one another indicate a strong positive correlation between ecoclimatic indicators. Inversely, two diametrically opposed points indicate a strong negative correlation. The red lines mark the limit of significance to the 5% level.

Predictive correlations based on multiple regressions models

To analyze to what extend the ecoclimatic indicators could be used as indicators of the final performance-related variables, three models were built and tested for each plant variable (Table 2 (Chap. 5.1.)) and the best fit parameters was selected based on the stepwise AIC (Table 3 (Chap. 5.1.)). By comparing Model 1 with Model 2, predictions were improved with r-squared values about twice higher for most of the plant variables when considering the additive relationship between plant physiological intervals (Model 2) instead of the sum of all the stressful events in the same period (Model 1). For seed yield, Model 2 explained 13.4% of the observed variation, while Model 1 explained 9.2% only. For seed number, the difference between both models was even more pronounced, with 42.3% for Model 2 against 7.7% for Model 1. For TSW, Model 2 explained 56.2% against 24.4% for Model 1. Same trends were founded for the seed quality criteria, with Model 2 explaining 45.8% for the seed lipid concentration and 38.0% for the seed protein concentration, as against 22.1% and 11.6% for the seed lipid and protein concentrations with Model 1. Furthermore, when comparing Model 3 to Model 2, the best prediction levels for the five plant performance-related variables were founded using Model 3, which considers additionally the interactions between the ecoclimatic indicators. Indeed, results show that the best predictive model for seed yield is Model 3, which explains 54.5% of the observed variation ($p< 0.001$). This model is explained by a several ecoclimatic indicators and their interactions (Table 3a (Chap. 5.1.)). Interestingly, for seed yield, the indicator over P300 (P300_25) seems to have more impacts on later stressing period than the indicator over P600 (P600_25), as the interactions between P300_25 and the late ecoclimatic indicators (i.e. P1000 and Pharv) were all significant, while a solely significant interaction was observed between P600_25 and the late ecoclimatic indicators (i.e. P600_25:P1000_30). As expected, the best fit models for seed number and TSW were also Model 3, which explains 65.2% and 65.8% of the observed variation ($p< 0.001$), respectively. As with seed yield, Model 3 for seed number is explained by several ecoclimatic indicators and their interactions (Table 3b (Chap. 5.1.)), with the indicator over P300 also interacting with late indicators more than the indicator over P600 did. For TSW (Table 3c (Chap. 5.1.)), the most important periods in the Model 3 seem to be P300 and P1000, both being significant alone (i.e. P300_25 and P1000_30) and involved in the interactions. Regarding the seed quality criteria, the seed lipid and protein concentrations were respectively 58.2% and 51.1% explained by Model 3. While P300 seems to be an important period for the lipid concentration (Table 3d (Chap. 5.1.)), P600 seems to be the most important period for seed protein concentration (Table 3e (Chap. 5.1.)), although their respective biosynthesis potentially lasts

until the late periods, over which indicators (i.e. P1000 and Pharv) are showed to be also significant in Model 3.

5.1.5. Discussion

The extent of the impacts on crop performances depends on the timing of heat stress events

Crop performance-related variables include a wide range of criteria, including yield components and the quality of harvested products, which can be degraded by the exposure to high temperatures (Kumar, 2016). Several *in planta* and *in silico* approaches have brought to light detailed effects of temperature stress on yield (Angadi et al., 2000; Asseng et al., 2013; Habekotté, 1993; Wang et al., 2017a; Weymann et al., 2015; Wheeler et al., 2000), while far fewer references on seed quality criteria can be found. Studies comparing high temperature effects on yield at different crop growth stages highlighted that the earlier the stress occurs, the greater the opportunity to recover, especially for indeterminate growth species (Angadi et al., 2000; Gan et al., 2004). However, short-term extreme temperature events, especially during key stages of plant development, can be much more critical for crop growth. Even if the effects of high temperature on crops have been extensively documented, the effects of extreme events such as heat waves still remain poorly documented. This work aims to clarify the effects of repeated heat stress on both yield and quality criteria in oilseed rape.

A few days of extreme temperature at the critical stages drastically reduce yields in many crops (Holzkämper et al., 2013; Wheeler et al., 2000). In oilseed rape, the critical period for seed set was shown to be concomitant to the flowering period (Habekotté, 1993), which was also pointed as being the most sensible period to temperature stress (Weymann et al., 2015). Because of its indeterminate growth, the long-lasting duration of the flowering period can expose plants to stressful temperature regimes that impact dry matter production and eventually seed set. Many studies pointed out that as temperature increases, the number of seeds produced per plant increases whereas the individual seed weight decreases, as observed in our previous results (Brunel-Muguet et al., 2015b; Magno et al., 2021, 2022a). However, the effects of high temperature on yield components depend on the characteristics of the stress protocol, notably timing, intensity and duration. If the stress exposure lasts several days and weeks, yield and its components will probably be affected as the stress may damage pollination and shorten the cycle (as GDDs accumulate faster), so the seeds have less time to fully fill-in. Otherwise, if the stress exposure is short and arrives throughout a less-critical physiological stage for seed yield establishment, plants may set up trade-off mechanisms. This trade-off between the different yield components can be explained by the regulation of each physiological phase by resource availability. Considering the plasticity of the plants,

compensatory mechanisms are set up in relation to source–sink relationships (Jullien et al., 2011).

Our results highlighted that the P300_25 was the most significant ecoclimatic indicator that explains the variation of yield components (i.e. increase for seed number and decrease for TSW, Figure 3 (Chap. 5.1.)), thus confirming that the P300 interval is the most critical to determine seed number. These observations are consistent with prior predictive modelling studies that indicated that the variation in seed density was better simulated when considering the critical period of 350 GDD from the onset of flowering rather than the whole flowering period (Habekotté, 1997b). According to Angadi et al. (2000), high temperatures at flowering affect yield formation more than heat stress at the pod development stage, because pods become autotroph about 400 GDD after the beginning of flowering (Leterme, 1985), which allows autonomous carbohydrate production for seed filling. However, our results also indicated significant effects of the later indicator P1000_25 on yield components (Figure 3 (Chap. 5.1.)). These observations can be explained by the complexity of seed set in oilseed rape due to its indeterminate growth. Therefore, while significant effects of early ecoclimatic indicators can be observed as expected, late indicators also contribute significantly to explain final yield components as flowers, pods and seeds were continuously formed until pod desiccation. In addition, interactions between early and late ecoclimatic indicators were also observed (Table 3 (Chap. 5.1.)). These interactions reflect that (i) the effect of one early stress is significant on the effect of a later one, in line with the stress memory concept; (ii) the final value of the performance-related variables results from the effect of several stresses, whose respective effects are not additive; and (iii) the compensation between pods of different ages due to source–sink relationships are complex in plants with indeterminate growth. Indeed, as plant performance-related variables were scored at the scale of the whole plant and do not consider different ages of pods, memory effect and compensatory mechanisms may intertwine. The negative impact of an early stressful event is likely to lead to compensation for indeterminate growth species, such as late flowering to counterbalance heat triggered - pollination impairment earlier. At the same time, the plant might trigger sustained molecular changes upon the first stress which will modify responses to later stresses (Ahuja et al., 2010; Probst and Mittelsten Scheid, 2015). Therefore, alleviated effects of a short-term stressing event that are triggered by compensatory mechanisms cannot rule out stress memory's responses in plastic species/varieties.

Like other commercial crops, seed quality in oilseed rape encompasses many criteria that depend on the intended market (e.g. seed size, protein concentration, lipids concentration and

profiles). The present study focused on protein and lipid concentrations, which are major variables of the nutritional quality in oleaginous crops. Generally, as temperature increases, the lipid content in seeds decreased and seed protein increases, as observed in previous results (Aksouh et al., 2001; Canvin, 1965; Magno et al., 2021, 2022a), although different trends can be observed depending on the duration and intensity of the heat stress (Aksouh-Harradj et al., 2006; Brunel-Muguet et al., 2015b). Because of the inverse correlation between seed protein and lipid concentrations in oilseed crops (Hammac et al., 2017; Kambhampati et al., 2020; Si et al., 2003), contrasting tendencies to predict these variables were expected. Consistently, Figure 3 (Chap. 5.1.) shows that the early stage stress (i.e. P300_25 indicator) was more decisive for lipids synthesis than proteins synthesis, for which late ecoclimatic indicators (i.e. Pharv_25 and Pharv_30) were more determinant. In addition, opposite correlation trends were identified to both compounds. While P300_25 was negatively correlated to lipids, it was positively correlated to proteins. Contrarily, both Pharv indicators were positive to lipids and negative to proteins. These trends can be explained by the timing of seed storage compounds biosynthesis. Although there is some overlap, lipids synthesis starts first and is followed by proteins synthesis which continues until the end of the late maturation stage (Baud et al., 2002; Borisjuk et al., 2013). This impact on seed lipids content was also observed in Weymann et al. (2015), as temperature stress at the onset of pods and seeds (i.e. from the beginning of inflorescence emergence until mid-flowering) was negatively associated to oil content. These findings highlight the complex relationship between lipid and protein in oilseeds, even more under abiotic stress condition which imposes prioritizing one compound over another due to limited resources availability, such as carbohydrates, which is determined by the duration the reproductive phase throughout which pods are the main photosynthetic organs (Kambhampati et al., 2020).

The interactions model can capture the effects of a multiple stress events sequence

The construction of models considering the interactions between ecoclimatic indicators (i.e. Model 3) allowed to better understand how the effect of one early stress modulates the effect of another later stress, although the differentiation of beneficial stress memory from compensation phenomena remains hard to unravel. Details about Model 3 were displayed in Table 3 (Chap. 5.1.), thus allowing a mathematical analysis of the interactions between early and late heat stress events by comparing the estimate (Est) values (whether positive or negative) and the p-value for each parameter in the model. Firstly, interactions that were statistically significant (i.e. $p<0.05$) indicated that the effect of an early stress modulates the

effect of a later one. Therefore, the estimate associated with each interaction provides conclusions about whether this interaction is beneficial (positive estimate) or disadvantageous (negative estimate), according to each plant performance-related variable.

When the interaction is beneficial, we can conclude that the effect of one stress alleviated the effect of another stress, thus suggesting a beneficial stress memory and/or compensatory regulation. Two scenarii resulting in beneficial effects of successive stressful events (i.e. a positive estimate for interactions) can be observed (i) either the combination of an early stress indicator that had a positive estimate alone and a late stress indicator that had a negative estimate alone, or (ii) an early stress indicator that had a negative estimate alone and a late stress indicator that had a positive estimate alone or no effect. The first scenario is illustrated with protein concentration (Table 3e (Chap. 5.1.)), as the estimate of the interaction P600_25:P1000_30 was statistically significant ($p<0.01$) and positive (2.288), whereas the individual estimates of the ecoclimatic indicators alone were positive for P600_25 (2.055) and negative for P1000_30 (-2.157). This trend highlights the potential of considering thermo-sensitizing schemes to improve protein content in oilseed rape under increasing heat waves condition, in line with our previous results (Magno et al., 2021). The second scenario is illustrated with seed yield (Table 3a (Chap. 5.1.)) as the estimate of the interaction P300_25:P1000_30 was positive (0.612), whereas P300_25 alone had a negative estimate (-6.082) and P1000_25 had no effect (not significant). In this case, the hypothesis is that the warm days in the P300 interval had a negative effect on pollination and/or the start of pods formation, thus inducing pod abortion. The plants attempted to compensate it by producing more flowers/pods following the stress period. The warm days during the interval P1000 probably came too late to have a negative effect on these new organs. This same trend can be observed for seed number (Table 3b (Chap. 5.1.)). When the interaction is not beneficial (i.e. negative estimates such as for P300_25:P1000_25 for TSW and lipids), it suggests that in some cases the effect of one early stress can amplify the negative effects of another stress, thus indicating a disadvantageous interaction between repeated heat stress events. Although these cases do not highlight the beneficial effects of repeated stresses, they are in line with the hypothesis that a stressing event can modulate the response of the plant upon a later one. Overall, this provides insights about the critical period of compound biosynthesis in oilseed rape. Finally, a cumulative effect of the succession of stressful events could be observed if the interactions vary in the same direction as each individual effect, whether positive or negative. However, this pattern is not observed in any of our results, thus indicating that the outcome of a succession of stressful events can rarely be associated with the sum of individual events.

Predictions were improved by using indicators based on the plant physiological stages

Climatic features are essential for predicting crop performance-related variables, and they have been extensively used in both mechanistic and statistical modelling approaches. As observed in other crops (e.g. wheat in Chenu et al., 2017), original oilseed rape crop models were developed to better understand plant's responses to crop management practices, and climate change impacts were mainly estimated by using basic climate variables (e.g. average temperature). In statistical approaches, the potential impacts of climate were mainly considered in a generic way, as the agroclimatic indicators were usually defined over the whole cycle and/or considering mean climate variables, thus weakening the effects of extreme events over the crop cycle. Although this approach is useful to better understand the effects of high temperatures on crop growth, because the physiological stages were defined in terms of the sum of thermal time, it does not reflect to what extent extreme events beyond the thresholds can impact crop performances. Recently, a special attention has been paid to realistic future climate projections (Asseng et al., 2015b; Rötter et al., 2011), in order to reduce uncertainties in climate impact studies. However, considerable work remains to be done to take into account extreme climate events such as heat waves in crop modelling approaches. This study contributes to the understanding of the effects of repeated high temperature stressful events during the reproductive phase in oilseed rape, and eventually highlights stress memory effects.

Firstly, the selection process of the best fit predictive models allowed the identification of the most relevant ecoclimatic indicators, which could be used to estimate the crop performance-related variables. Table 2 (Chap. 5.1.) displays the determination coefficient (ranging from 7.1 to 65.8%) and the associated significance of the best fit model for a given variable of interest. Although they were identified as the best fit ones, their respective power of prediction was moderate. Model 1, which considers the sum of high temperature events throughout the whole period between flowering and harvest, was the least predictive model, thus indicating that the use of climate indicators covering a long period of plant growth cycle is not an appropriated method to take in account extreme stressful events in crop modelling approaches. As highlighted in many studies (Ben-Ari et al., 2016; Caubel et al., 2015; Luo et al., 2010; Wilcox and Makowski, 2014; Zhai et al., 2017), the focus on mean climatic parameters and calendar periods has surely provided useful, but even not complete, information on how climate change might affect crop production. Then, Model 2 was built considering specific intervals based on plant's physiology. By comparing Model 1 and 2, a clear improvement in prediction could be observed owing to consideration of stressful events in critical intervals (i.e. Model 2). Eventually, Model 3 considered the interactions between early (i.e. P300 and P600) and late

(i.e. P1000 and Pharv) ecoclimatic indicators. Our initial assumption was that the global effect of several stressing events did not equal the sum of the individual effects, either because of the alleviating effects of repetitive stress events that can prime/sensitize crops, and thus help them facing later stress exposure by means of the stress memory, or because of amplification of the impact of later stresses due to non-recovery from the first stress. The better predictive power of Model 3 compared to the other models, true for all the variables of interest, supports the idea that one stressing events interacts with another regarding the plant's responses, which means that their individual effects are not additive.

As observed in previous studies using the AIC approach (Akmouche et al., 2019; Ben-Ari et al., 2016; Chandio et al., 2020; Nasrullah et al., 2021; Wilcox and Makowski, 2014; Zhai et al., 2017), our results indicated that indicators-based models are accurate enough to estimate climatic risks throughout the crop season. Although our models were developed with past climatic datasets, our analysis provides insights about the critical periods to heat stress over the reproductive phase in winter oilseed rape, which should be helpful to predict the responses of plants under future climate conditions by both mechanistic and statistical modelling approaches. In mechanistic models, further implementation would be required to consider heat stress memory either by integrating lower mechanistic scales or by introducing forcing variables and parameters. In statistical models, the stress memory concept could be extended to the other environmental stresses for realistic purposes. The present approach is generic enough to be extended to other climatic risks (drought, frost), thus being useful to predict trends in crop performances under different future climate patterns. Indeed, the options for improving the models could rely on considering other abiotic stresses. For example, heat stress was selected amongst other abiotic stresses, so the ecoclimatic indicators were only related to high temperature events that can be easily measured and acquired by analyzing local weather datasets. Although a special attention was paid to remove any dataset that displayed other measured stressing features (e.g. nitrogen deficiency, water limitation), it can be assumed that some limitations remained due to the limited number of climate scenarios that were considered. Because our intention was to focus on the repetition of stresses of same nature, we did not intend to get powerful predictions. In the future, predictions could be improved by taking in account the effects of other climate variables (e.g. rainfall, radiation). Overall, this approach is presented as a proof of concept to further improve predictive models by considering more realistic climate conditions in relation to crop physiological stages of growth, as well as the non-additive effects of successive stressful events.

5.1.6. Conclusion

The initial assumption was that climate indicators measured within a specific crop physiological stage (i.e. ecoclimatic indicators) could be reliable parameters to better predict the final performance-related variables in oilseed rape (i.e. seed yield, seed number, thousand seed weight, seed lipid and protein concentrations), independent of genotype and locality. By measuring the number of high temperature days (Tmax > 25°C and Tmax > 30°C) in 26 different environments, and comparing the variations of the plant performance-related variables, contrasting performances were associated with specific combinations of early and late ecoclimatic indicators.

The results highlighted three major conclusions: (i) climate indicators calculated for a given physiological stage allow a better prediction of crop performances than cumulated indicators over the crop season; (ii) the effect of successive temperature stressing events are non-additive, which highlight stress memory and/or compensatory effects; and (iii) crop modelling approaches would benefit from refining models in the context of repeated stresses over the crop season. The prediction power of our models was satisfying bearing in mind that these models were focused on heat stress related indicators, without taking in account other climate parameters nor field management practices. In order to improve our models, an extensive characterization could be done (including additional ecoclimatic indicators linked to other climate variability parameters) to provide highly predictive models. This work is a proof of concept that demonstrates the potential of simple climate indicators (i.e. number of days with Tmax over to a given threshold) measured during the crop critical periods (i.e. flowering to harvest in the case of oilseed rape) to predict yield losses and seed quality degradation under climate change, in order to better consider the effects of repeated stresses.

Table 1 (Chap. 5.1.) : Range of variation of the original datasets, with maximum, minimum and average values for each performance-related variable (i.e. seed yield, seed number, thousand seed weight, lipid and protein concentrations) measured in the 26 environments (in rows, combination of location x harvest year). Values in columns represent the average of the three genotypes and the repetitions in each environment. The different colors indicate the largest (green) and smallest (yellow) values in each column. Missing values, for which measurements at the harvest time were not available, are indicated by a line and were not taken into account in the analysis. Min: minimum; Max: maximum; $q.ha^{-1}$: quintal per hectare; nb: number; DW: dry weight.

Reference	Seed Yield (q.ha-1)			Thousand Seed Weight (g)			Seed Number (nb.m-2)			Lipids (%DW)			Proteins (%DW)		
	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean
AU217	39,1	46,3	42,5	-	-	-	-	-	-	49,9	51,8	50,8	16,4	18,2	17,2
BLO17	38,9	39,2	39,1	5,2	5,5	5,4	-	-	-	48,0	48,3	48,2	20,6	21,0	20,8
BLO18	25,0	37,8	32,0	4,0	5,0	4,4	-	-	-	46,1	49,0	47,3	18,6	20,5	19,7
CH14	26,3	32,7	29,4	4,3	4,9	4,5	59702	68452	65350	48,4	50,9	49,4	17,7	18,8	18,4
CH218	27,7	32,3	29,6	-	-	-	-	-	-	44,7	45,4	45,1	15,9	16,7	16,3
CHR18	34,2	47,6	40,9	-	-	-	-	-	-	42,9	45,7	44,1	15,5	18,4	17,3
CHX17	28,3	30,1	29,2	4,1	4,5	4,3	-	-	-	50,9	51,9	51,4	16,6	17,4	17,0
CV18	22,3	32,6	26,7	3,9	4,2	4,1	-	-	-	46,7	48,0	47,4	18,3	20,9	19,5
DIJ17	42,8	50,1	46,4	-	-	-	-	-	-	49,5	53,6	51,6	15,2	20,1	17,7
LIV18	25,5	28,8	27,5	4,3	4,9	4,5	-	-	-	47,5	47,9	47,8	18,6	20,2	19,2
LOU18	29,7	43,1	35,6	-	-	-	-	-	-	49,9	52,2	50,7	16,7	19,2	18,0
LR11	37,8	55,1	42,8	3,9	4,5	4,2	84953	140813	101913	50,8	52,1	51,5	16,4	17,9	17,2
LR12	25,2	45,2	33,2	4,2	5,2	4,5	55531	103090	73739	42,7	49,8	46,5	20,0	24,3	21,9
LR13	27,5	41,6	33,6	4,0	5,6	4,8	55242	95679	71262	46,7	51,4	49,2	18,4	20,9	19,3
LR15	28,3	37,1	31,6	4,4	5,3	4,9	53466	77977	64805	47,7	52,3	50,1	17,2	19,2	18,0
LR16	28,3	38,5	32,6	3,9	4,9	4,4	59897	84833	73627	46,4	50,5	49,0	17,7	21,0	19,5
LR18	22,4	28,3	24,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MD11	25,3	34,9	29,2	2,5	3,0	2,8	83573	131367	104535	40,6	44,2	42,5	22,0	25,2	23,3
MD15	24,0	34,1	29,2	4,1	4,3	4,2	58745	83054	70242	49,2	50,2	49,8	17,6	19,3	18,5
PRE14	21,1	27,8	24,4	4,1	4,7	4,5	45935	56178	52176	49,3	50,2	49,7	20,9	21,9	21,4
PRE15	36,8	44,2	40,2	4,6	5,2	4,9	78253	85069	81993	48,7	51,5	50,2	18,1	19,8	19,0
SEL15	20,8	31,7	27,4	-	-	-	-	-	-	48,0	53,0	50,5	16,7	19,9	18,4
VER14	32,9	38,2	35,7	4,3	4,8	4,6	69911	85328	78203	46,5	47,2	46,8	14,0	14,4	14,2
VER15	35,2	37,6	36,0	4,1	4,7	4,4	74814	86463	80639	44,7	47,2	46,3	14,0	15,6	14,7
VER17	20,7	28,1	24,8	-	-	-	-	-	-	42,8	44,4	43,7	17,0	18,8	17,9
YEB15	36,5	39,7	38,2	4,2	4,7	4,4	78502	95357	87204	48,9	49,9	49,3	18,2	19,8	18,9

Table 2 (Chap. 5.1.) : Summary of the r-squared and p-value of the three fit models used to predict each of the five final performance-related variables (i.e. seed yield, seed number, thousand seed weight, lipid and protein contents). P300_30 and P600_30 were not taken into account in the composition of the models because their value was zero. Levels of significance were *p < 0.05*, p < 0.01*** and *p < 0.001****.

The tested models were the following ones:

Model 1: Final variable = Ptot_25 + Ptot_30

Model 2: Final variable = P300_25 + P600_25 + P1000_25 + P1000_30 + Pharv_25 + Pharv_30

Model 3: Final variable = Model 2 + interactions between early (i.e. P300 and P600) and late (i.e. P1000 and Pharv) ecoclimatic indicators

Variables	Model 1		Model 2		Model 3	
	r-squared	p-value	r-squared	p-value	r-squared	p-value
Seed yield	0.092	0.000 ***	0.134	0.000 ***	0.545	0.000 ***
Seed number	0.071	0.014 *	0.423	0.000 ***	0.652	0.000 ***
Thousand Seed Weight	0.244	0.000 ***	0.562	0.000 ***	0.658	0.000 ***
Seed lipid concentration	0.221	0.000 ***	0.458	0.000 ***	0.582	0.000 ***
Seed protein concentration	0.116	0.000 ***	0.380	0.000 ***	0.511	0.000 ***

Table 3 (Chap. 5.1.) : Tables (a) to (e) display the summary of the multiple linear regression models used to test the additive and/or interaction effects of the ecoclimatic indicators on final performance-related variables (i.e. seed yield, seed number, thousand seed weight, lipid and protein contents). Slots colored in gray correspond to parameters that were tested to each model. Parameters with a hyphen were rejected from the stepAIC selection process, due to non-significant effect. P300_30 and P600_30 were not taken into account in the composition of the models because their value was zero. The t-value is the estimate divided by its standard error. The p-value tests the null hypothesis that the coefficient is equal to zero (no significant effect). Levels of significance were *p<0.05*, p<0.01**, p<0.001**** and *non-significant (ns)*. Est: estimate; SE: standard error.

(a) Seed yield

Ecoclimatic indicators	Model 1				Model 2				Model 3			
	Est	SE	t-value	p-value	Est	SE	t-value	p-value	Est	SE	t-value	p-value
(Intercept)	32.981	0.832	39.622	0.000***	33.409	0.867	38.542	0.000***	37.392	0.834	44.852	0.000***
Ptot_25	-0.140	0.065	-2.170	0.031*								
Ptot_30	0.965	0.235	4.105	0.000***								
P300_25					-	-	-	ns	-6.082	1.887	-3.223	0.001**
P600_25					-	-	-	ns	-3.038	1.107	-2.743	0.007**
P1000_25					-0.414	0.179	-2.314	0.022*	-	-	-	ns
P1000_30					-	-	-	ns	9.818	1.733	5.665	0.000***
Pharv_25					-	-	-	ns	-1.292	0.147	-8.767	0.000***
Pharv_30					1.405	0.293	4.792	0.000***	4.112	0.386	10.662	0.000***
P300_25 : P1000_25									0.612	0.189	3.231	0.001**
P300_25 : P1000_30									-4.065	0.795	-5.115	0.000***
P300_25 : Pharv_25									0.832	0.134	6.200	0.000***
P300_25 : Pharv_30									-3.163	0.426	-7.416	0.000***
P600_25 : P1000_25									-	-	-	ns
P600_25 : P1000_30									-6.415	2.087	-3.073	0.002**
P600_25 : Pharv_25									-	-	-	ns
P600_25 : Pharv_30									-	-	-	ns

(b) Seed number

Ecoclimatic indicators	Model 1				Model 2				Model 3			
	Est	SE	t-value	p-value	Est	SE	t-value	p-value	Est	SE	t-value	p-value
(Intercept)	70866	2747	25.798	0.000***	7452	2330	31.973	0.000***	80869	3127	25.863	0.000***
Ptot_25	672	245	2.739	0.007**								
Ptot_30	-	-	-	ns								
P300_25					-	-	-	ns	-4634386	1439362	-3.220	0.001**
P600_25					-	-	-	ns	330059	107778	3.062	0.003**
P1000_25					3007	458	6.554	0.000***	-	-	-	ns
P1000_30					-	-	-	ns	19301	5784	3.337	0.001**
Pharv_25					-3282	574	-5.719	0.000***	-4067	1020	-3.988	0.000***
Pharv_30					11369	2160	5.263	0.000***	8528	3073	2.775	0.006**
P300_25 : P1000_25									397610	123548	3.218	0.001**
P300_25 : P1000_30									2367583	739541	3.201	0.001**
P300_25 : Pharv_25									1588359	493019	3.222	0.001**
P300_25 : Pharv_30									-6880768	2136684	-3.220	0.001**
P600_25 : P1000_25									-196690	61789	-3.183	0.001**
P600_25 : P1000_30									-	-	-	ns
P600_25 : Pharv_25									24565	7421	3.310	0.001**
P600_25 : Pharv_30									-	-	-	ns

(c) Thousand Seed Weight

Ecoclimatic indicators	Model 1				Model 2				Model 3			
	Est	SE	t-value	p-value	Est	SE	t-value	p-value	Est	SE	t-value	p-value
(Intercept)	4.716	0.088	53.244	0.000***	4.704	0.062	75.579	0.000***	4.585	0.077	59.196	0.000***
Ptot_25	-0.060	0.009	-6.290	0.000***								
Ptot_30	0.250	0.044	5.648	0.000***								
P300_25					-0.135	0.041	-3.292	0.001**	0.493	0.217	2.266	0.025*
P600_25					-	-	-	ns	-	-	-	ns
P1000_25					-0.124	0.021	-5.815	0.000***	-	-	-	ns
P1000_30					-	-	-	ns	0.316	0.159	1.986	0.049*
Pharv_25					-	-	-	ns	-	-	-	ns
Pharv_30					0.125	0.031	4.079	0.000***	-	-	-	ns
P300_25 : P1000_25									-0.086	0.022	-3.925	0.000***
P300_25 : P1000_30									-	-	-	ns
P300_25 : Pharv_25									-	-	-	ns
P300_25 : Pharv_30									0.209	0.093	2.256	0.026*
P600_25 : P1000_25									-	-	-	ns
P600_25 : P1000_30									-0.741	0.273	-2.718	0.007**
P600_25 : Pharv_25									-	-	-	ns
P600_25 : Pharv_30									-	-	-	ns

(d) Seed lipid concentration

Ecoclimatic indicators	Model 1				Model 2				Model 3			
	Est	SE	t-value	p-value	Est	SE	t-value	p-value	Est	SE	t-value	p-value
(Intercept)	48.688	0.357	136.369	0.000***	49.234	0.317	155.007	0.000***	49.174	0.351	140.110	0.000***
Ptot_25	-0.142	0.028	-5.099	0.000***								
Ptot_30	0.667	0.101	6.583	0.000***								
P300_25					-	-	-	ns	2.144	0.485	4.415	0.000***
P600_25					-	-	-	ns	-1.119	0.528	-2.118	0.036*
P1000_25					-0.639	0.065	-9.744	0.000***	-0.610	0.169	-3.594	0.000***
P1000_30					-	-	-	ns	-	-	-	ns
Pharv_25					-	-	-	ns	-	-	-	ns
Pharv_30					0.978	0.107	9.090	0.000***	0.820	0.150	5.464	0.000***
P300_25 : P1000_25									-0.207	0.072	-2.893	0.004**
P300_25 : P1000_30									-	-	-	ns
P300_25 : Pharv_25									-	-	-	ns
P300_25 : Pharv_30									-0.363	0.147	-2.476	0.0144*
P600_25 : P1000_25									0.285	0.072	3.977	0.000***
P600_25 : P1000_30									-	-	-	ns
P600_25 : Pharv_25									-	-	-	ns
P600_25 : Pharv_30									-	-	-	ns

(e) Seed protein concentration

Ecoclimatic indicators	Model 1				Model 2				Model 3			
	Est	SE	t-value	p-value	Est	SE	t-value	p-value	Est	SE	t-value	p-value
(Intercept)	20.309	0.313	64.810	0.000***	20.241	0.269	750.37	0.000***	19.572	0.354	55.308	0.000***
Ptot_25	-0.051	0.024	-2.069	0.040*								
Ptot_30	-0.184	0.089	-2.069	0.040*								
P300_25					0.388	0.117	3.304	0.001**	-1.667	0.413	-4.032	0.000***
P600_25					-	-	-	ns	2.055	0.534	3.850	0.000***
P1000_25					0.183	0.057	3.199	0.002**	-	-	-	ns
P1000_30					-	-	-	ns	-2.157	0.586	-3.680	0.000***
Pharv_25					-0.217	0.024	-9.058	0.000***	-	-	-	ns
Pharv_30					-	-	-	ns	-0.602	0.216	-2.781	0.006**
P300_25 : P1000_25									0.312	0.066	4.717	0.000***
P300_25 : P1000_30									-	-	-	ns
P300_25 : Pharv_25									-	-	-	ns
P300_25 : Pharv_30									-	-	-	ns
P600_25 : P1000_25									-	-	-	ns
P600_25 : P1000_30									2.288	0.755	3.030	0.003**
P600_25 : Pharv_25									-0.127	0.038	-3.323	0.001**
P600_25 : Pharv_30									0.288	0.109	2.641	0.009**

5.2. Prise en compte des stress répétés dans les modèles (semi-) mécanistes

5.2.1. Préambule

Ce chapitre présente les résultats obtenus suite à l'ajout de formalismes pour prédire le rendement, à la calibration, à l'évaluation et aux simulations avec le modèle (semi)-mécaniste SuMoToRI (Brunel-Muguet et al., 2015a). Le travail réalisé avec le modèle a visé à répondre à deux objectifs majeurs, à savoir (i) augmenter la période de prédiction du modèle en introduisant un module de rendement, et (ii) réaliser des simulations en conditions de stress thermiques, pour identifier les paramètres et/ou équations sensibles aux effets des stress thermiques répétés. Un jeu de données issu des expérimentations réalisées en 2011 (expé 2011) a été utilisé pour la calibration du module rendement. Le jeu de données issu de l'expérimentation *in planta* de l'Axe I (i.e. EXPE 3, 2019-2020) a été utilisé pour l'évaluation du module rendement (modalité contrôle) et pour réaliser les simulations en condition de stress thermiques répétés (modalités soumises aux stress thermiques). Ces travaux ont été conduits principalement en collaboration avec l'UMR ISPA (INRAE, Bordeaux).

Effets des stress répétés dans un modèle (semi-) mécaniste : principaux résultats

- Le modèle SUMO YIELD est capable de bien simuler les variables de sortie relatives aux siliques et celles relatives aux autres compartiments de la plante à l'issue de la calibration avec le jeu de données du génotype Yudal (expé 2011).

- L'évaluation du modèle avec des données indépendantes (génotype Aviso, expé 3, 2020) a mis en évidence d'une part la nécessité d'améliorer la formalisation de certains processus au sein du modèle (relatifs notamment à la croissance foliaire et aux règles d'allocation du C entre les siliques et les feuilles vertes), et d'autre part que les valeurs de certains paramètres sont potentiellement génotype-dépendants.

- Les simulations en conditions de stress thermiques répétés ont mis en évidence que (i) l'effet des stress répétés n'est pas égal à la somme des effets individuels de chaque évènement stressant, en raison d'un effet d'amplification ou d'atténuation des effets consécutifs lié au phénomène de mémoire du stress ; (ii) les modèles de culture sont capables de reproduire l'effet non additif des stress répétés, mais l'amplitude de la réponse simulée ne correspond pas aux observations, et (iii) les modèles de culture ne sont pas capables de prendre en compte les modulations fines des protocoles de stress thermique (ni les modulations du climat réel, par conséquent), du fait de l'utilisation des variables climatiques trop intégratives (e.g. moyenne de température journalière, temps thermique cumulé).

5.2.2. Fonctionnement du modèle SuMoToRI

Le modèle écophysiologique « Sulphur Model Towards Rapeseed Improvement » (SuMoToRI, Brunel-Muguet et al., 2015a) est un **modèle (semi)-mécaniste fondé sur des processus biologiques de croissance du colza d'hiver**. La version publiée en 2015 (collaboration UMR EVA et UMR ISPA) permet de prédire la croissance végétative du colza (i.e. biomasse des différents compartiments) et les variables indicatrices du potentiel de remobilisation du soufre (i.e. teneurs en S total, S organique et S minéral des différents compartiments) vers les siliques en début de formation. Ce modèle a été paramétré pour le colza d'hiver en utilisant des jeux de données issus des expérimentations avec le génotype Yudal (expé 2011). Il fonctionne à pas de temps journalier, à l'échelle de la plante et les variables d'entrée sont la température, le rayonnement photosynthétiquement actif (Photosynthetically Active Radiation, PAR) et le prélèvement en S. Ces variables combinées pilotent trois modules au sein du modèle, à savoir (i) le **potentiel de croissance du colza**, (ii) la **dynamique du C** et (iii) la **dynamique du S** dans chacun des compartiments de la plante avec des règles d'allocation fondées sur la confrontation de l'offre et de la demande. SuMoToRI, tel que publié en 2015, était focalisé sur la dynamique du S dans la culture du colza jusqu'à la floraison. Les prédictions de la croissance post-floraison et du rendement n'étaient pas incluses dans la version du modèle 2015.

Les principaux processus et règles sous-jacentes intégrées dans le modèle SuMoToRI sont indiquées dans la Figure 1 (Chap. 5.2). La production et la répartition des composés carbonés est déterminante pour la dynamique du C, tandis que la dynamique du S est déterminée par les besoins structurels en S (prioritaire aux feuilles) et la constitution du pool mobile de S (lequel est réparti entre les feuilles et le reste de la plante selon des règles d'allocation). Trois compartiments majeurs sont explicités : les **feuilles photosynthétiques** regroupées dans une seule structure dite « big leaf », les **feuilles chutées** suite à leur senescence et **l'ensemble des autres organes** de la plante (tiges, ramifications et inflorescences). La croissance effective des organes est calculée chaque jour sur la base du temps thermique cumulé pendant la journée i (dTTi) à partir de la croissance potentielle des organes (calculée en fonction du temps thermique), de la disponibilité en composés carbonés (offre en C) et de la disponibilité en souffre (offre en S). L'offre en S est calculée en additionnant les quantités de S prélevées quotidiennement et les quantités issues de la fraction mobile de S dans la plante. Dans SuMoToRI, la surface d'interception de la lumière (Leaf Area Index, LAI) et la totalité de l'activité photosynthétique sont attribuées aux feuilles vertes en appliquant le modèle de Monteith (Goudriaan and Monteith, 1990). L'augmentation journalière effective du LAI correspond au **minimum des trois augmentations journalières** calculées en fonction

des facteurs limitants (i.e. température, offre en C ou offre en S), selon la loi du minimum de von Liebig. Les règles d'allocation régissent les fonctions d'offre et de demande en C et S, avec une priorité accordée aux feuilles photosynthétiques. Ainsi, le modèle est capable de simuler le LAI et la biomasse des organes, l'allocation du S total aux organes et la répartition entre les fractions de S minérale et organique. Deux processus écophysiologiques majeurs pilotent le modèle, à savoir (i) la photosynthèse, par biais de l'assimilation du PAR pour la synthèse des composés carbonés, qui seront alloués aux différents organes en croissance, et (ii) l'assimilation, la remobilisation et l'allocation du S prélevé par la plante (Figure 1 (Chap. 5.2.)).

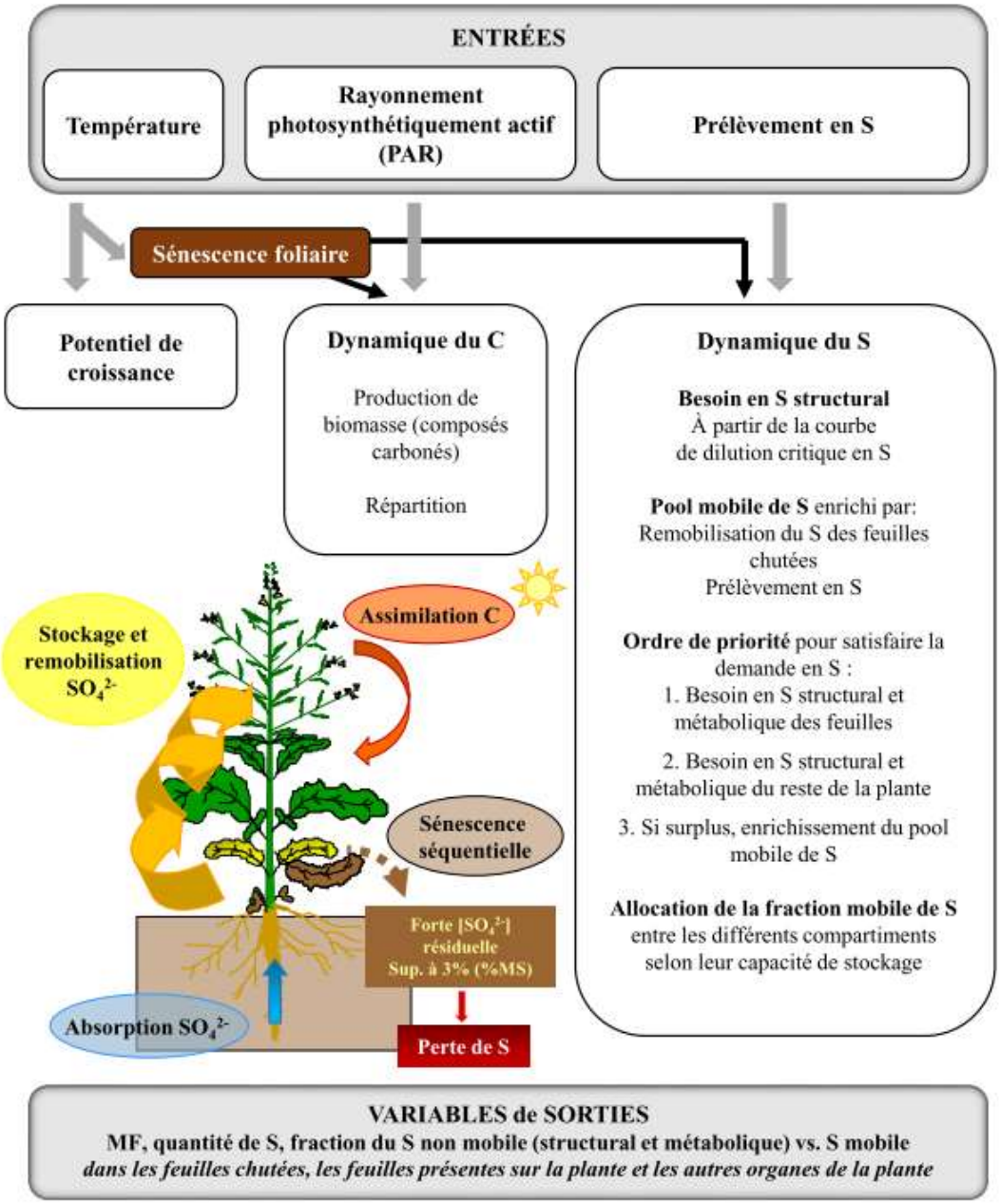


Figure 1 (Chap. 5.2.) : Représentation du fonctionnement du modèle SuMoToRI, version 2015 (Brunel-Muguet et al., 2015a). Paramètres et équations présentés dans l'Annexe 8.

Les étapes de développement et d'utilisation du modèle

La première étape de travail avec le modèle mécaniste SuMoToRI (Brunel-Muguet et al., 2015a) concerne l'introduction des formalismes de prédiction du rendement, en vue d'augmenter sa période de prédiction (i.e. développement de la version 2021, SUMO YIELD, Figure 2 (Chap. 5.2.)). L'objectif est de pouvoir prédire le rendement en siliques en partant des trois facteurs limitants initialement introduits dans SuMoToRI (i.e. l'assimilation de C, la température journalière et l'apport en S), et en modifiant les relations source-puits et les règles de priorité d'allocation. Le travail de thèse a consisté à (i) formaliser la croissance des siliques suivant ces règles ; (ii) calibrer le modèle SUMO YIELD en incluant des règles liées au rendement en siliques ; et (iii) évaluer la nouvelle version du modèle en confrontant les observations aux simulations.

La deuxième étape de travail vise à réaliser des simulations avec le modèle SUMO YIELD en conditions de stress thermiques répétés (Figure 2 (Chap. 5.2.)), dans l'objectif d'identifier des règles à modifier pour améliorer les capacités prédictives du modèle dans ces conditions climatiques particulières. Le postulat central fondé sur mes résultats expérimentaux *in planta* est que l'effet d'une succession d'événements stressants n'est pas égal à la somme des effets individuels de chaque événement individuel, en lien avec les effets de la mémoire du stress, ce qui doit donc être considéré dans les modèles de culture prédictifs. Le travail de thèse a consisté à confronter les observations aux simulations pour les quatre différents protocoles de stress thermique testés et à présenter une réflexion sur des potentiels ajustements.

2015 **Publication de SuMoToRI**	**2021 - Etape 1 :** **Calibration de SUMO YIELD**	**2022 - Etape 2 :** **Simulations avec stress T**
Modèle mécaniste prédictif de la biomasse et du statut soufré du colza	Extension de la période de prédiction jusqu'au rendement en siliques	Simulations avec le modèle en conditions de stress thermiques répétés
Compartiments :		
Feuilles sur la plante, feuilles chutées, reste de la plante	Feuilles sur la plante, feuilles chutées, **siliques**, reste de la plante	Feuilles sur la plante, feuilles chutées, siliques, reste de la plante
Apports en soufre :		
High S et Low S	High S	High S
Variable centrale :		
Leaf area index (LAI)	Leaf + **Pod area index** (LAI+**PAI**)	Leaf + Pod area index (LAI+PAI) + **stress T**
Jeux de données :		
Calibration : expé 2011 Evaluation : expé 2013	**Calibration : expé 2011** **Evaluation : expé 3 (2020)**	**Simulation : expé 3 (2020)**
Sorties du modèle :		
Biomasse, quantités de S, fraction en S organique et en S minéral	Biomasse, quantités de S, fraction en S organique et en S minéral, **rendement en siliques**	Toutes les sorties décrites auparavant telles qu'affectées par les stress thermiques répétés

Figure 2 (Chap. 5.2.) : Comparaison entre la version publiée du modèle SuMoToRI et les étapes de développement et utilisation proposées dans le cadre de cette thèse.

5.2.3. Extension de la période de prédiction du modèle

Ce sous-chapitre présente les règles conceptuelles et la calibration du module rendement lors de la première étape de travail avec modèle (semi-) mécaniste SuMoToRI, dans l'objectif de développer une nouvelle version du modèle (i.e. SUMO YIELD, Figure 2 (Chap. 5.2.)). Cette étape de développement et de calibration a été réalisée en utilisant un jeu de données issu d'expérimentations en conditions contrôlées conduites entre 2010-2011 à l'UMR EVA (i.e. expé 2011), avec le génotype Yudal. **L'implémentation du module rendement a impliqué la distinction d'un compartiment supplémentaire au sein du modèle original de façon à inclure les variables relatives aux siliques.** Ainsi, SUMO YIELD considère quatre compartiments, à savoir les feuilles vertes, les feuilles chutées, les siliques (regroupant les péricarpes et les graines) et le reste de la plante (tiges, ramifications, racines, inflorescences). Les entrées du modèle restent identiques à celles de SuMoToRI (i.e. le rayonnement, la température journalière et le prélèvement de S). Le modèle SUMO YIELD est capable de simuler les biomasses et les quantités de S total, minéral et mobile des compartiments de la plante, en incluant les siliques. En comparaison avec SuMoToRI, les principales modifications concernent l'introduction des processus physiologiques liés à la croissance des siliques (Figures 3 et 4 (Chap. 5.2.), ainsi que Tableaux 1 et 2 (Chap. 5.2.)), notamment :

- La prise en compte du temps thermique de **floraison** estimé à partir des observations de l'expé 2011. Cette expérimentation a indiqué la période de floraison étant entre 758 et 954°Cd après le semis (avec T_{base} = 4°C) pour le génotype Yudal, donc débutant à environ 376°Cd après la sortie de la vernalisation (Tableau 1 (Chap. 5.2.), paramètre TT.flowering). Le temps thermique de floraison est estimé dans des conditions d'approvisionnement nutritionnel non-limitant (notamment en azote et soufre). Une éventuelle variabilité génotypique et/ou l'effet de stress abiotiques (i.e. facteurs pédoclimatiques, limitation en nutriments) pourraient modifier l'initialisation de la floraison et/ou avoir un impact sur la phénologie et le développement post-floraison.

- La prise en compte de la **croissance potentielle des siliques,** dont la fonction est calculée à partir du temps thermique, en utilisant une équation de Hill (Tableau 1 (Chap. 5.2.), paramètres PA_{max}, aPA, bPA).

- La prise en compte **des surfaces photosynthétiques des siliques** dans le calcul de la contribution des surfaces d'interception du rayonnement pour l'activité photosynthétique : SUMO YIELD utilise l'indice de surface totale, en considérant à la fois les feuilles (LAI), mais aussi la surface des siliques (PAI, Tableau 1 (Chap. 5.2.), paramètres k.ext.PAI et RUE.PAI).

- La considération des phases d'**hétérotrophie et d'autotrophie des siliques**. Le calcul du temps thermique pour l'autotrophie des siliques a été estimé à partir des observations de l'expé 2011. La valeur de 350°Cd (T_{base} = 4°C) post-floraison a été retenue (Tableau 1 (Chap. 5.2.), paramètre TT.autotrophy.postflo), en se basant sur la littérature (Leterme, 1985).

- L'ajustement de **l'offre en carbone,** qui est calculée en considérant que les siliques deviennent photosynthétiquement actives lorsqu'elles deviennent autotrophes, et ainsi les feuilles ne sont pas la source unique de production de biomasse, donc leur contribution à l'offre de C est réduite. Lorsque les siliques sont hétérotrophes, leur contribution à l'offre totale de C ne représente qu'un faible pourcentage (Tableau 1 (Chap. 5.2.), paramètre contrib.pod.heterotrophy), car les feuilles vertes contribuent majoritairement à l'offre qui est consacrée à la respiration et à la croissance. A l'inverse, quand les siliques deviennent autotrophes, elles contribuent majoritairement à l'offre totale de C (Tableau 1 (Chap. 5.2.), paramètre contrib.LA.autotrophy), qui va principalement contribuer à satisfaire les demandes des nouveaux puits (i.e. siliques) au détriment des organes végétatifs. Les règles qui régissent la répartition de l'offre en C entre les siliques et les feuilles ont été définies de façon empirique, en se basant sur les observations expérimentales (expé 2011) et sur la littérature disponible (Leterme, 1985).

- L'ajustement de la **demande en soufre structural** prend en compte la compétition pour les besoins en S structurel entre les feuilles vertes et les siliques après la floraison. Le calcul de la demande en S est réalisé à partir des courbes de dilution critique (i.e. le S du SO_4^{2-}) en fonction du poids de chaque organe (feuilles vertes, siliques et le reste de la plante).

- L'ajustement du **pool de soufre mobile**, qui est calculé en considérant que les siliques deviennent photosynthétiquement actives lorsqu'elles deviennent autotrophes, ainsi les feuilles ne sont plus le premier puits à recevoir du S mobile. La quantité de S mobile dans les feuilles est égale à la quantité de S total moins les quantités de S structural (des feuilles, siliques, reste de la plante) et la quantité de S mobile alloué aux siliques. Ainsi, lorsque les siliques sont hétérotrophes, elles contiennent 60% du S mobile total (Tableau 1 (Chap. 5.2.), paramètre frac.SO4.pod.heterotrophy) et le reste appartient au pool mobile dans les feuilles vertes, qui peut être utilisé pour les besoins critiques de la plante (respiration et croissance). Quand les siliques sont autotrophes, elles contiennent 90% (Tableau 1 (Chap. 5.2.), paramètre frac.SO4.pod.autotrophy) du S mobile total et le reste appartient au pool mobile dans les feuilles vertes, dont la demande est fortement réduite à ce stade de développement. Les règles qui régissent la répartition du S mobile entre les siliques et les feuilles ont été définies de façon empirique, en se basant sur les observations expérimentales (expé 2011).

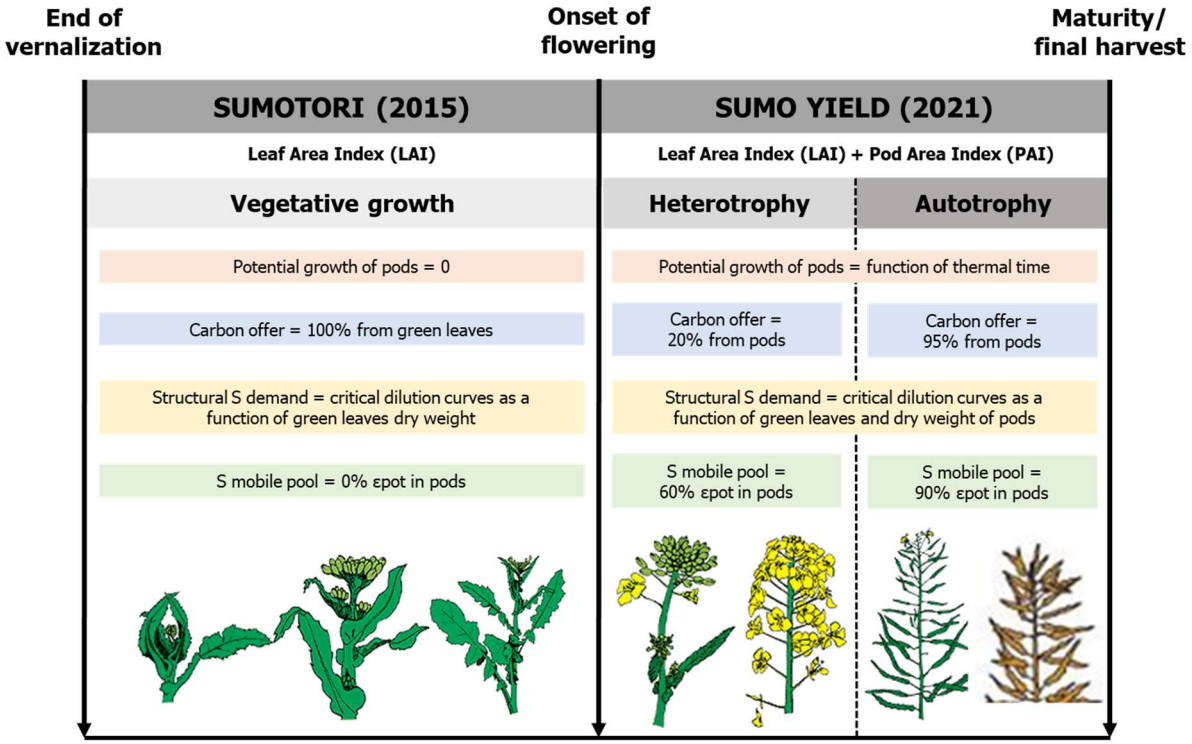


Figure 3 (Chap. 5.2.) : Schéma simplifié des modifications introduites pour la calibration du module rendement (SUMO YIELD), par rapport à la version 2015 du modèle SuMoToRI.

Tableau 1 (Chap. 5.2.) : Liste des paramètres ajoutés dans la version SUMO YIELD, par rapport à la version 2015 du modèle SuMoToRI (Annexe 8).

Symbol	Definition	Value	Unit	Equation
Plant growth stages				
TT.flowering	Cumulated thermal time to flowering	376	°Cd^{-1} post vernal.	Eq 8
TT.autotrophy.postflo	Cumulated thermal time to pods autotrophy	350	°Cd^{-1} post flowering	Eq 3
Dynamics of C				
PA_{max}	Pod area expansion parameter	0.025	m² plant^{-1}	Eq 1
aPA	Pod area expansion parameter	897	°Cd^{-1}	Eq 1
bPA	Pod area expansion parameter	3.48	dimensionless	Eq 1
k.ext.PAI	PAR extinction coefficient of pods	0.80	m^2 m^{-2}	Eq 2
RUE.PAI	Radiation use efficiency of pods	2.00	g DW MJ^{-1}	Eq 2
contrib.pod.heterotrophy	C offer of pods during heterotrophy	0.20	dimensionless	Eq 3
contrib.LA.autotrophy	C offer of leaves during autotrophy	0.05	dimensionless	Eq 3
beta.pods	Coefficient of dry weight allocation to pods	0.37	dimensionless	Eq 4
inv.SLA.pods	Inverse of the specific pod area	38.6	g DW m-²	Eq 5
Dynamics of S				
$\alpha_{S.crit.pods}$	Parameter to estimate critical S content in pods	5.85	mg S plant^{-1}	Eq 6
$\beta_{S.crit.pods}$	Parameter to estimate critical S content in pods	-0.144	dimensionless	Eq 6
$\alpha_{S.crit.rest}$	Parameter to estimate critical S content in rest	1.68	mg S plant^{-1}	Eq 7
$\beta_{S.crit.rest}$	Parameter to estimate critical S content in rest	-0.386	dimensionless	Eq 7
frac.SO4.pod.heterotrophy	Fraction of mobile S in pods during heterotrophy	0.60	dimensionless	Eq 12
frac.SO4.pod.autotrophy	Fraction of mobile S in pods during autotrophy	0.90	dimensionless	Eq 12

Tableau 2 (Chap. 5.2.) : Liste des variables et équations rajoutées dans le modèle SUMO YIELD, par rapport à SuMoToRI (Annexe 8). La croissance journalière effective des siliques correspond au minimum des trois croissances journalières calculées selon des facteurs limitants (i.e. température, offre en C ou offre en S), en s'appuyant sur la loi du minimum de von Liebig. Les règles d'allocation régissent les fonctions d'offre et de demande en C et S, avec une priorité accordée aux siliques, notamment suite à leur passage en phase d'autotrophie.

Process	Main variables and equations	Equation
Dynamics of C	**Main variables:** $dPAR_{abs.PAI}$: daily PAR absorbed by pods (Mj/m²/day) $dTDW_{PAI}$: daily potential increase in total dry weight of pods (g/pl/day) dPDW : daily increase in dry weight of pods (g/pl/day) $dPDW_{effect}$: daily effective increase in dry weight of pods (g/pl/day)	
	Main equations:	
	$dTDW_{PAI}[t] = dPAR_{abs.PAI} \times RUE.PAI$ with $dPAR_{abs.PAI} = PAR_i\,(1-e^{-k.ext.PAI})$	Eq 2
	If heterotrophy: $dDW_{TOT}[t] = (contrib.pod.heterotrophy \times dTDW_{PAI}) + dTDW_{LAI}$ If autotrophy: $dDW_{TOT}[t] = (contrib.LA.autotrophy \times dTDW_{LAI}) + dTDW_{PAI}$	Eq 3
	$dPDW[t] = dDW_{TOT} \times beta.pods$	Eq 4
	$dPA_{effect} = max\,(0, [min\,(dPA_{TT}, dPA_c, dPA_S)])$	Eq 9
	$dPDW_{effect}[t] = dPA_{effect} \times inv.SLA.pods$	Eq 10
Dynamics of S	**Main variables:** $dQS_{pods.SO4}$: daily amount of S-mobile in pods (mg S-SO4/pl/day) $dQS_{rest.SO4}$: daily amount of S-mobile in the rest (mg S-SO4/pl/day) $dQS_{rest.SO4}$: daily total amount of S-mobile in the plant (mg S-SO4/pl/day)	
	Main equations:	
	$dQS_{pods.SO4}[t] = [S]_{crit.pods}[t] \times dPDW_{effect}[t]$ with $[S]_{crit.pods}[t] = \alpha_{S.crit.pods} \times PDW_{effect}^{\beta S.crit.pods}$	Eq 6
	$dQS_{rest.SO4}[t] = [S]_{crit.rest}[t] \times dDW_{rest}[t]$ with $[S]_{crit.rest}[t] = \alpha_{S.crit.rest} \times DW_{rest}^{\beta S.crit.rest}$	Eq 7
	$dQS_{tot.SO4} = dQS_{uptake} + QS_{pot.remob.FL} - dQS_{FL.SO4} - \sum dQS_{struc}$	Eq 11
	Before flowering: $dQS_{pods.SO4} = 0$ If heterotrophy: $dQS_{pods.SO4} = dQS_{tot.SO4} \times frac.SO4.pod.heterotrophy$ If autotrophy: $dQS_{pods.SO4} = dQS_{tot.SO4} \times frac.SO4.pod.autotrophy$	Eq 12
Expansion rate according to:		
(i) Pod potential growth	$dPA_{TT} = \frac{PA_{max} \times TT_{cum}^{bPA}}{aPA^{bPA} + TT_{cum}}$	Eq 1
(ii) C offer and growth demand	$dPA_C = \frac{dPDW[t]}{inv.SLA.pods}$	Eq 5
(iii) S offer and growth demand	Before flowering: 0 After flowering: $dPA_S = \frac{dQS\,offer[t]}{\left(\frac{[S]_{crit.pods}[t]}{inv.SLA.pods}\right)}$	Eq 8

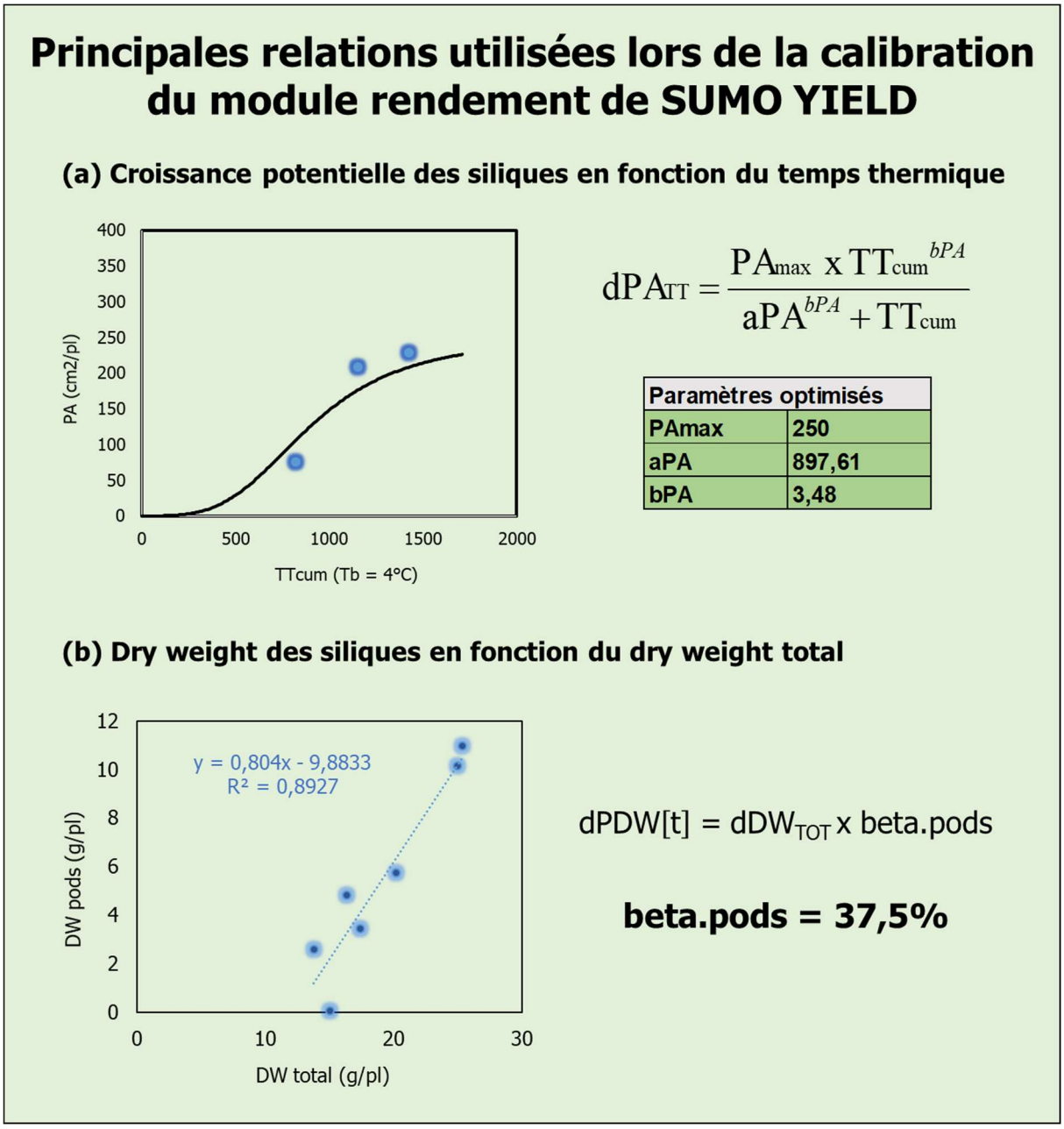


Figure 4 (Chap. 5.2.) : Illustration des principales relations utilisées pour la calibration du module rendement de SUMO YIELD, en se basant sur des observations issues de l'expérimentation de 2011. (a) La croissance potentielle des siliques est le résultat de l'augmentation graduelle de la surface des siliques en fonction du temps thermique, notamment pendant les stades de développement et remplissage. (b) Le poids relatif des plantes en fonction du poids des siliques met en évidence l'importance de ces derniers dans la détermination de la croissance des plantes, puisque les siliques représentent en moyenne 37,5% du poids total de la plante, l'ensemble des autres organes représentant donc environ 62,5% du poids total.

5.2.4. Implémentation du modèle et évaluation des performances

Le module rendement a été implémenté comme décrit auparavant sous R (version 4.0.2, R Core Team, 2020). Après les étapes de calibration, le comportement du modèle a été testé en comparant les observations issues du jeu de données de calibration (expé 2011) et les simulations effectuées avec les équations paramétrées pour chaque processus (Tableau 2 (Chap. 5.2.)). Ensuite, les enregistrements journaliers de PAR et de température de la modalité contrôle de l'expé 3 (2020) ont été utilisées comme variables d'entrées pour les simulations d'évaluation du modèle. La qualité prédictive des simulations avec les données de calibration (expé 2011) et avec les données servant à l'évaluation du modèle (expé 3, 2020) a été évaluée à l'aide de **l'erreur quadratique moyenne** (Root Mean Square Error, RMSE), qui calcule la différence moyenne entre les valeurs prédites et observées, et de **l'indice d'accord** (*d-values*), qui indique le degré d'accord entre les valeurs simulées et les valeurs observées correspondantes (Tableau 3 (Chap. 5.2.)). Des valeurs RMSE faibles et une *d-value* proche de 1 signifient une très bonne qualité prédictive du modèle.

La Figure 5 (Chap. 5.2.) illustre le comportement du modèle SUMO YIELD lors des **simulations avec le jeu de données de calibration du module rendement (génotype Yudal, expé 2011)**. Les biomasses de chaque compartiment de la plante (i.e. DW total, DW pods, DW green leaves et DW rest) simulés avec SUMO YIELD correspondent relativement bien aux valeurs observées, avec des valeurs RMSE faibles et des *d-values* proches de 1 (Tableau 3 (Chap. 5.2.)). Logiquement, le DW total a augmenté graduellement après la sortie de la vernalisation, résultant de la croissance foliaire intense avant floraison. Suite au début de la floraison (i.e. 376 °Cj après la sortie de vernalisation), le DW pods reste égal à zéro jusqu'à environ 500 °Cj (post-verna), quand la courbe de DW pods commence à croître, associée à la vitesse d'expansion de la surface des siliques (PA). La croissance des siliques post-floraison voit sa dynamique modifiée vers 726 °Cj (post-verna), lors de l'autotrophie.

Contrairement à la dynamique observée pour la croissance des siliques, la croissance des feuilles vertes (DW green leaves) augmente jusqu'à la pleine floraison, puis diminue drastiquement lors du passage en autotrophie des siliques. Ces tendances (observées et simulées) sont la conséquence de la chute séquentielle des feuilles sénescentes, qui n'est pas compensée par la production de nouvelles feuilles dans la fin du cycle de la culture. La quantité totale de soufre dans les siliques (QS pods) simulée avec SUMO YIELD correspond relativement bien aux valeurs observées (RMSE faible et *d-value* proche de 1, Tableau 3 (Chap. 5.2.)). Le soufre n'étant pas un facteur limitant dans les conditions testées ni le facteur central dans le travail de modélisation présenté dans la thèse, nous allons nous concentrer seulement sur la

quantité totale de S dans les siliques. Les simulations en condition non-limitante en S reproduisent bien l'augmentation exponentielle de la quantité de soufre dans les organes pendant la croissance végétative et le plateau à la pleine floraison, même si le processus d'allocation du S aux siliques semble plus rapide en comparaison avec les observations (i.e. le début de l'augmentation exponentielle en S des simulations arrive vers 500 °Cj post-vernalisation, tandis que dans les observations la quantité de S dans les siliques augmente à partir du passage en autotrophie, vers 726 °Cj post-vernalisation). Ce décalage cinétique pourrait s'expliquer par une moindre calibration des fonctions de répartition du pool de S (pourcentages d'allocation estimés de façon empirique et sur un unique jeu de données) entre les feuilles et les siliques pendant les phases d'hétérotrophie et d'autotrophie de ces derniers.

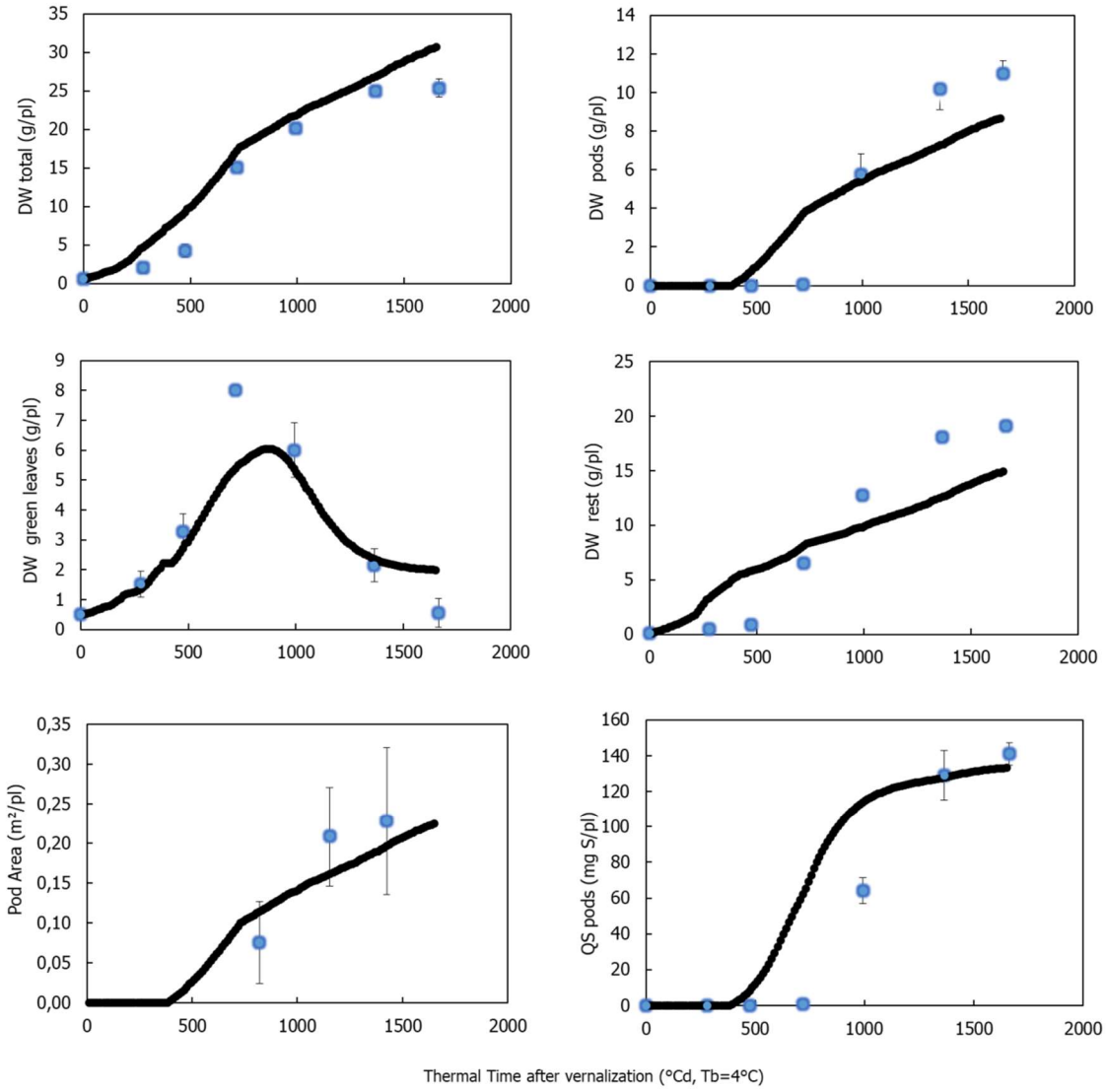


Figure 5 (Chap. 5.2.) : Test du comportement du modèle SUMO YIELD avec le jeu de données de calibration (expé 2011). Ces données incluent des variables mesurées sur les siliques, mais pas sur les graines. Observations (points bleus) et simulations (lignes noires).

La Figure 6 (Chap. 5.2.) illustre les **simulations avec le jeu de données indépendant d'évaluation (génotype Aviso, expé 3, 2020).** Globalement le modèle SUMO YIELD est capable de prédire des tendances de croissance des plantes, telles que l'augmentation graduelle de la biomasse totale (DW total) après la sortie de la vernalisation et la croissance accrue des feuilles vertes (DW green leaves) jusqu'à la pleine floraison, suivie par la croissance des siliques. Mais le modèle ne simule pas correctement les cinétiques des variables. Les biomasses des compartiments végétatifs (i.e. DW total, DW green leaves et DW rest) sont largement surestimées (valeurs RMSE élevées et des *d-values* non calculable). La biomasse des siliques est sous-estimée, notamment après le passage en autotrophie (i.e. 839 °Cj après la sortie de vernalisation), même si les simulations de DW pods restent acceptables avec les valeurs de RMSE faible et le *d-value* proche de 1 (Tableau 3 (Chap. 5.2.)).

Les observations indiquent des cinétiques de croissance des feuilles vertes différentes entre les données ayant servi à la calibration (génotype Yudal, expé 2011) et à l'évaluation (génotype Aviso, expé 3, 2020). En effet, les observations de l'expé 3 (2020) indiquent une forte croissance foliaire à partir de la sortie de la vernalisation en atteignant son maximum vers 500 °Cj (qui correspond au début de la floraison), tandis que le DW green leaves maximum est atteint vers 726 °Cj (qui correspond au passage en autotrophie) dans les observations de l'expé 2011. De plus, il a été observé au sein du modèle que le carbone est le facteur limitant pour la croissance des siliques, notamment à partir de la floraison. Par conséquent, une surestimation de la biomasse des compartiments végétatifs réduit l'offre en C pour la croissance journalière effective des siliques, puisque le module rendement s'appuie sur la loi du minimum entre la température, l'offre en C ou l'offre en S. Cette surestimation de biomasse végétative peut être la conséquence d'une approximation des règles d'allocation qui régissent les fonctions d'offre et de demande en C, du fait des proportions empiriques ajustées.

Les résultats observés lors de l'évaluation du modèle indiquent que certains paramètres au sein du modèle sont potentiellement génotype-dépendants et pourraient être améliorés par la suite, notamment avec des ajustements en considérant plusieurs jeux de données contrastants dans l'objectif de créer un modèle applicable à un large éventail de génotypes de colza d'hiver.

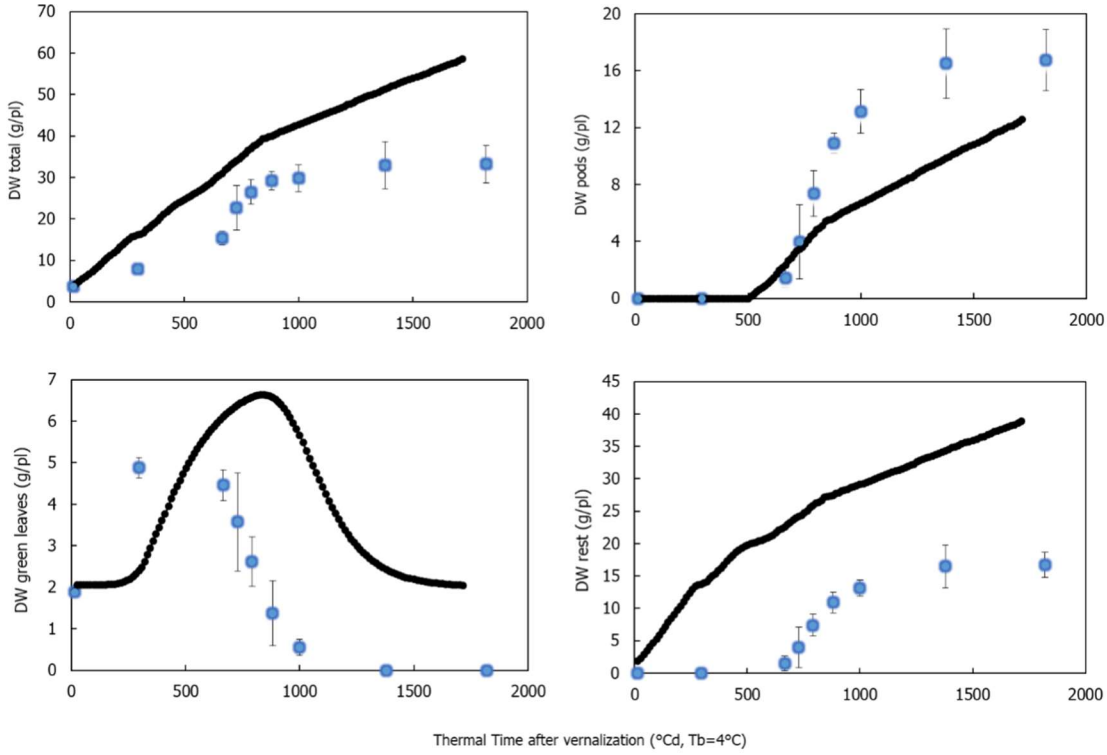


Figure 6 (Chap. 5.2.) : Evaluation du modèle SUMO YIELD avec le jeu de données indépendant (expé 3, 2020, modalité thermique contrôle). Observations (points bleus) et simulations (lignes noires). La quantité totale de soufre dans les siliques (QS pods) n'a pas pu être confrontée aux observations, puisque ces analyses n'étaient pas réalisées dans les siliques dans le cadre du projet.

Tableau 3 (Chap. 5.2.) : Valeurs des deux principaux critères de qualité prédictive du modèle. Root mean square (RMSE) et *d-values* des principales variables de sortie du modèle SUMO YIELD simulés avec (a) le jeu de données de calibration (expé 2011) et (b) le jeu de données d'évaluation (expé 3, 2020, modalité thermique contrôle). NA indique les valeurs manquantes dans expé 3 et les traits indiquent une impossibilité de calculer le critère.

Main variables	(a) Calibration		(b) Evaluation	
	RMSE	*d*	RMSE	*d*
DW total (g/pl)	3.17	0.90	14.71	-
DW pods (g/pl)	2.00	0.82	3.15	0.73
DW green leaves (g/pl)	1.18	0.80	3.26	-
DW rest (g/pl)	3.61	0.78	15.68	-
Pod Area (m²/pl)	0.04	0.66	0.12	0.34
QS pods (mg S/pl)	32.57	0.76	NA	NA

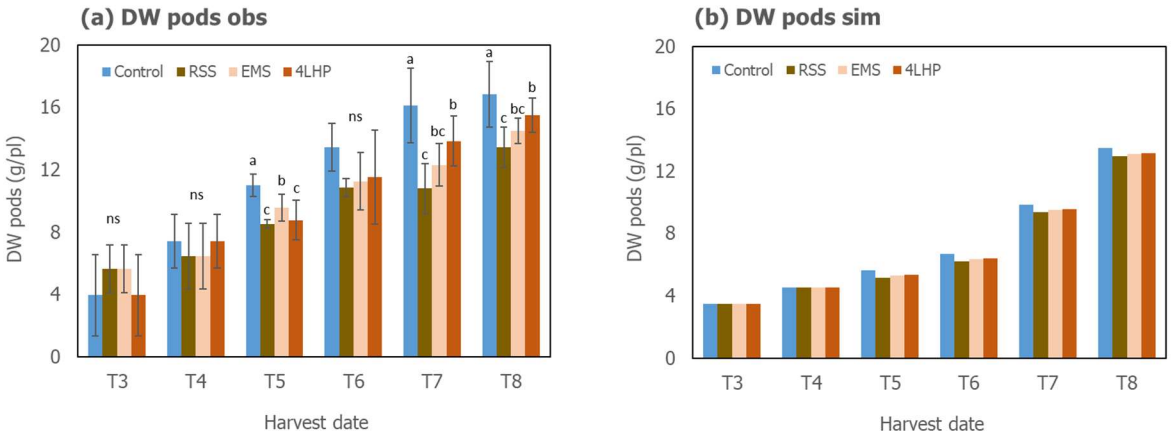
5.2.5. Simulations en conditions de stress thermiques répétés

L'objectif central de cette thèse étant de mieux comprendre les effets des stress thermiques répétés sur le rendement et la qualité grainière du colza, des simulations sous différents protocoles composés par des évènements chauds ont été réalisés avec le modèle SUMO YIELD, en s'appuyant sur les modalités stressées issues de l'expé 3 (2020, détails de l'expérimentation en conditions contrôlées et des protocoles de stress disponibles dans le Chapitre 3.2.). Ce chapitre présente les résultats concernant la biomasse des siliques (DW pods) des observations (expé 3, 2020) et des simulations avec le modèle SUMO YIELD pour chacune des modalités de stress. La Figure 7 (Chap. 5.2.) illustre l'évolution observée et simulée du DW pods au cours des récoltes successives pendant et après l'exposition aux stress (T3 à T8), ainsi que le temps thermique cumulé (°C) aux dates de récolte pour chacune des modalités. Le Tableau 4 (Chap. 5.2.) indique les différences relatives entre les résultats de DW pods observées et simulées pour chaque modalité thermique et ceux du contrôle, sous forme de pourcentages.

Concernant les observations (Figure 7a (Chap. 5.2.)), les résultats montrent une augmentation graduelle du DW pods entre T3 et T8, avec des différences significatives entre les modalités thermiques à T5 ($p<0.01$), T7 ($p<0.01$) et T8 ($p<0.05$). Les différences entre les modalités thermiques observées dans les autres temps de récolte (i.e. T3, T4 et T6) ne sont pas statistiquement significatives. De façon intéressante, à T3 les modalités CTL et 4LHP présentent des valeurs de DW pods plus faibles que celles les modalités qui ont subi le stress modéré pendant la floraison (RSS et EMS), ce qui indique que le stress modéré a probablement accéléré le développement des siliques en raison d'un cumul de thermique plus important. En effet, à la maturité physiologique des graines (T8), les différences de temps thermique cumulé par rapport au contrôle (CTL) ont atteint +123 °Cj pour RSS, +47 °Cj pour EMS et + 75 °Cj pour 4LPH. A partir de T4 et jusqu'à T8, la modalité CTL présente une valeur moyenne de DW pods plus importante que celles des modalités de stress, même si ces différences ne sont toujours pas statistiquement significatives. A T7 et T8 les tendances semblent fixées, et les modalités CTL et RSS présentent respectivement les plus fortes et plus faibles valeurs de DW pods. Tel qu'observé dans nos résultats précédents (Magno et al., 2021, 2022a), la modalité 4LHP est la moins pénalisante de toutes les modalités de stress concernant le rendement.

Concernant les simulations (Figure 7b (Chap. 5.2.)), le modèle SUMO YIELD est capable de prédire l'augmentation graduelle du DW pods entre T3 et T8, mais les différences entre les modalités stressées et le contrôle ne sont pas évidentes. Le modèle prédit bien la tendance plus haute des valeurs de DW pods pour le contrôle (CTL) à partir de T5, ainsi que la tendance

moins pénalisante de la modalité 4LHP, même si les variations entre modalités pour les valeurs observées sont beaucoup plus importantes que celles pour les valeurs simulées.



Harvest date	T3	T4	T5	T6	T7	T8
CTL	728	791	881	1000	1379	1820
RSS	776	852	1005	1123	1502	1943
EMS	776	839	929	1047	1426	1867
4LHP	728	804	957	1075	1454	1895

Figure 7 (Chap. 5.2.) : Comparaison entre (a) valeurs observées de poids sec (dry weight, DW) des siliques (g/pl) et (b) valeurs simulées de poids sec (dry weight, DW) des siliques (g/pl) avec le modèle SUMO YIELD, en utilisant le jeu de données indépendant (expé 3, 2020, modalités stressées). Le tableau indique le temps thermique cumulé (°Cj, Tb = 4°C) pour chaque modalité lors des récoltes. CTL: Control; RSS: Repeated Stress Sequence; EMS: Early Mild Stress; 4LHP: 4 Late Heat Peaks.

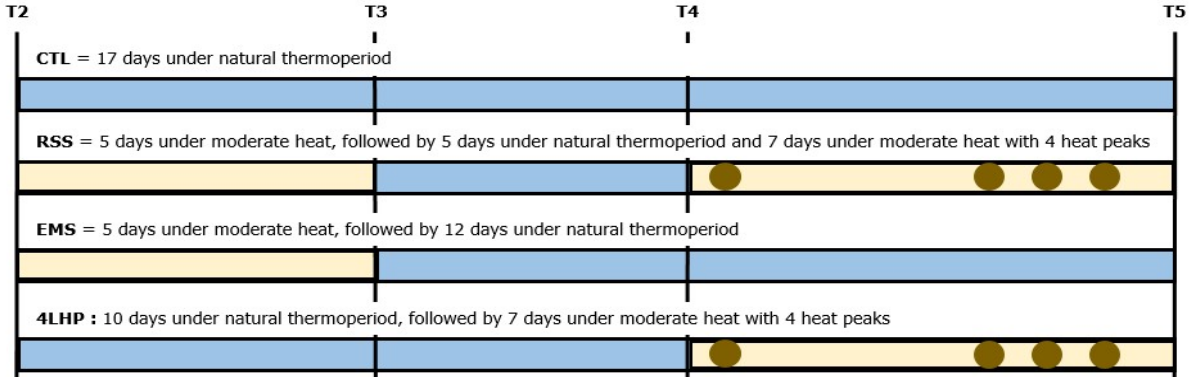
Le Tableau 4 (Chap. 5.2.) indique les effets relatifs de chaque modalité de stress (RSS, EMS et 4LHP) et les effets additionnés des modalités EMS et 4LHP, afin de les comparer à l'effet de RSS. Ces effets sont exprimés en pourcentage relatif du contrôlé (négatifs si diminution ou positifs si augmentation). L'objectif de cette analyse est d'observer si les effets des stress répétés sont additifs ou non, et le cas échéant dans quelle ampleur. Aux récoltes T3 et T4, étant donné que les plantes n'ont pas encore été exposées aux pics thermiques, les modalités RSS et EMS sont identiques (i.e. stress modéré uniquement). Logiquement, les observations indiquent donc que la somme des effets de EMS et de 4LHP (i.e. EMS+4LHP) correspond aux effets de RSS (+42% et -13% par rapport au contrôle, respectivement). Pour ces deux dates, le modèle ne simule aucune différence entre les modalités de stress et le contrôle. Par conséquent, la somme des effets simulés de EMS et de 4LHP correspond également aux effets

simulés de RSS. Les différences entre toutes les modalités thermiques sont observées à partir de T5, date qui coïncide avec la fin des modalités de stress (17 jours au total entre T2 et T5).

A partir de T5, qu'ils s'agissent des observations ou des simulations, la somme des effets de EMS et de 4LHP (i.e. EMS+4LHP) est différente des effets de RSS, ce qui indique donc que les effets individuels des événements successifs (EMS et 4LHP) ne sont pas additifs. L'hypothèse sous-jacente de la non additivité est qu'il y a une mémoire du stress thermique qui se traduit soit par une amplification de l'effet négatif des pics tardifs (4LHP) suite au stress précoce modéré (EMS), soit par un effet bénéfique d'atténuation du stress tardif (4LHP) suite au stress précoce modéré (EMS). Dans les deux cas, l'impact cumulé des effets respectifs de chaque stress diffère de l'effet des stress répétés. Il est également intéressant d'observer que à partir de T5 les différences relatives **observées** entre le RSS et le contrôle sont toujours plus faibles (-22.4%, -19.2%, -32.9%, -20.2%, respectivement à T5, T6, T7 et T8) que les différences relatives observées entre EMS+4LHP et le contrôle (-30.6%, -28.3%, -34.4%, -20.9% respectivement à T5, T6, T7 et T8). Ces tendances sont également vraies pour les différences relatives **simulées**, mais avec une moindre ampleur de l'impact du stress (-8.5%, -7.3%, -5.1%, -3.8% respectivement à T5, T6, T7 et T8 pour RSS ; et -10.3%, -8.9%, -6.1% et -4.6% respectivement à T5, T6, T7 et T8 pour EMS+4LHP).

Ces résultats mettent en évidence trois points importants à considérer lors de l'ajustement des modèles de culture pour la prise en compte des effets des stress thermiques répétés, à savoir (i) l'effet des stress répétés **n'est pas égal à la somme** des effets de chaque évènement stressant individuel, en conséquence d'un effet d'amplification ou d'atténuation des effets consécutifs liés au concept de mémoire du stress ; (ii) les modèles de culture **sont conceptuellement capables de rendre compte des effets non additifs des stress répétés**, mais l'amplitude des variations ne correspond pas aux observations, avec les impacts des stress étant sous-estimés ; et (iii) les modèles de culture **ne sont pas capables de simuler les modulations fines des schémas de stress thermique**, en raison notamment du fait que les données thermiques d'entrée sont des moyennes de la température journalière et que les processus de développement de la plante sont pilotés par le temps thermique cumulé, les évènements stressants étant par conséquent « dilués » dans l'ensemble de données journalières.

Tableau 4 (Chap. 5.2.) : Calculs des effets relatifs de chaque modalité de stress (RSS, EMS et 4LHP) et les effets additionnés des modalités EMS et 4LHP (EMS+4LHP), pour le DW pods à plusieurs dates de récolte (T3 à T8). Le tableau présente les valeurs de DW pods pour la modalité contrôle, et la différence relative entre les modalités stressées et le contrôle pour les observations (OBS EXPE 3) et les simulations (SIM SUMO YIELD). Les effets EMS+4LHP (en gris) ont été calculés en multipliant les deux effets individuels pour tenir compte de l'effet séquentiel (qui théoriquement devrait correspondre aux effets de RSS si les effets successifs des stress répétés étaient égaux à la somme des effets individuels). CTL: contrôle; RSS: Repeated Stress Sequence; EMS: Early Mild Stress; 4LHP: 4 Late Heat Peaks.



obs/sim	Harvest date	T3	T4	T5	T6	T7	T8
OBS EXPE 3 (2019-20)	**CTL**	**3,9**	**7,4**	**11,0**	**13,5**	**16,1**	**16,8**
	RSS	+42,0%	-13,0%	-22,4%	-19,2%	-32,9%	-20,2%
	EMS	+42,0%	-13,0%	-13,0%	-16,3%	-23,6%	-13,9%
	4LHP	0,0%	0,0%	-20,2%	-14,3%	-14,1%	-8,1%
	EMS + 4LHP	+42,0%	-13,0%	-30,6%	-28,3%	-34,4%	-20,9%
SIM SUMO YIELD	**CTL**	**3,5**	**4,6**	**5,6**	**6,7**	**9,9**	**13,5**
	RSS	0,0%	0,0%	-8,5%	-7,3%	-5,1%	-3,8%
	EMS	0,0%	0,0%	-5,8%	-4,9%	-3,3%	-2,5%
	4LHP	0,0%	0,0%	-4,8%	-4,2%	-2,8%	-2,2%
	EMS + 4LHP	0,0%	0,0%	-10,3%	-8,9%	-6,1%	-4,6%

5.2.6. Conclusions et pistes d'amélioration

Ce chapitre a présenté les travaux réalisés avec le modèle (semi-) mécaniste SuMoToRI (Brunel-Muguet et al., 2015a) avec pour objectif d'étendre la période de prédiction du modèle en intégrant un module prédictif du rendement (Etape 1 : calibration de SUMO YIELD) et de tester le comportement du modèle SUMO YIELD en réalisant des simulations sous conditions de stress thermiques répétés (Etape 2, Figure 2 (Chap. 5.2.)).

Concernant la calibration du module rendement, le modèle est capable de bien simuler les sorties relatives aux siliques (i.e. DW pods et QS pods), ainsi que celles relatives aux autres compartiments de la plante, lors des tests de comportement avec le jeu de données de calibration (expé 2011). Cependant, l'évaluation avec un jeu de données indépendantes (expé 3, 2020) a mis en évidence notamment que (i) le modèle surestime la croissance des feuilles vertes (DW green leaves) pendant la période de floraison, ce qui génère une forte demande en C des feuilles au détriment du C alloué pour la croissance des siliques ; (ii) la répartition de biomasse entre siliques et feuilles est médiocre, notamment pendant la période d'autotrophie des siliques, indiquant le besoin d'améliorer les règles d'offre et demande de C entre les siliques et feuilles. L'analyse de ces résultats de simulation démontre la nécessité d'améliorer certains processus inclus dans le modèle et d'identifier les paramètres, variables et équations qui sont potentiellement génotype-dépendants, dans l'objectif d'ajuster le modèle de façon plus généraliste par rapport la variabilité génétique du colza d'hiver.

En effet, les calibrations initiales du modèle SuMoToRI et du modèle SUMO YIELD ont été réalisées avec un jeu de données issus des expérimentations avec le génotype Yudal, une variété coréenne printanière qui se comporte comme un type hivernal à floraison précoce dans les climats tempérés (Delourme et al., 2006). Sa floraison précoce comparée aux autres variétés d'hiver (e.g. Aviso, génotype utilisé lors des expérimentations qui ont servi à l'évaluation du modèle, expé 3, 2020), peut expliquer en partie les différences dans les processus simulés au sein du modèle, notamment en ce qui concerne la date d'entrée en floraison (e.g. 376 °Cj et 498 °Cj après la fin de la vernalisation pour Yudal et Aviso, respectivement). De plus, il a été démontré que la variété Yudal répond différemment aux stress abiotiques (e.g. limitation en azote, Laperche, 2021) et biotiques (e.g. attaques de pathogènes, Hackenberg et al., 2020). Ces informations suggèrent donc que certains processus écophysiologiques calibrés pour Yudal peuvent présenter des différences significatives par rapport d'autres génotypes d'hiver. Ceci met en évidence la nécessité de tester le modèle sur un panel de génotypes plus large pour mieux identifier les paramètres génotype-dépendants.

Au-delà des améliorations potentielles des formalismes du module rendement, il serait envisageable de **prévoir la formalisation future d'un module qualité au sein du modèle**, dans l'objectif de prédire les critères majeurs de la qualité de la graine du colza (e.g. teneurs en huile et protéines, profils d'acides gras). Ce module qualité de la graine pourrait se baser sur les concepts et formalismes développés chez le colza, le tournesol et/ou le soja par exemple, en se focalisant dans un premier temps sur la teneur en huile et les profils d'AG (Aguirrezábal et al., 2015, 2003; Baux et al., 2008; Durruty et al., 2016; Gauthier et al., 2017; Pereyra-Irujo and Aguirrezábal, 2007). Des travaux précédents ont mis en évidence des règles envisageables pour la formalisation d'un module qualité au sein du modèle, comme par exemple des relations empiriques entre la variation naturelle du rayonnement solaire et de la température avec la concentration en acide alpha-linolénique (C18:3) des graines du colza à différents stades de croissance (Gauthier et al., 2017) ; les courbes de teneur en huile et teneur en acide linoléique (C18:2) dans les graines du colza en fonction du temps thermique cumulé (T_{base} = 0 °C) à partir du début de la floraison (Baux et al., 2008) ; ou encore les courbes de teneur en huile dans les graines du tournesol en fonction de la température, de la radiation intercepté ou du temps thermique cumulé (T_{base} = 6 °C) à partir du début de la floraison (Aguirrezábal et al., 2015). Par ailleurs, l'intérêt de développer un formalisme robuste de la teneur en huile est de pouvoir extrapoler la teneur en protéines de façon empirique, puisque la corrélation négative entre la teneur en huile et la teneur en protéines des graines chez le colza est bien documentée (Aksouh-Harradj et al., 2006; Aksouh et al., 2001; Brunel-Muguet et al., 2015b; Elferjani and Soolanayakanahally, 2018; Hammac et al., 2017; Magno et al., 2021, 2022a). Il serait donc potentiellement possible de prédire la teneur en protéines des graines sans la nécessité d'introduire un module azote dans le modèle (Hammac et al., 2017; Piper and Boote, 1999).

Concernant les simulations sous conditions de stress thermiques répétés, on observe que le modèle n'est pas assez sensible à des modulations de température relativement faibles en ampleur et durée (quelques heures, jours), puisque les données d'entrée du modèle comprennent des températures moyennes journalières et que la majorité des processus de développement de la plante sont pilotés par le cumul du temps thermique. Ces résultats incitent à mener une réflexion sur la prédiction des effets des évènements climatiques ponctuels (e.g. exposition de quelques heures par jour à une température létale, qui ne peut pas être particulièrement identifiée par des cumuls de temps thermique calculés avec des données thermiques journalières). Le fait de mal prendre en compte les effets des stress répétés (y compris les effets de mémoire du stress) dans les modèles de culture a deux impacts majeurs : (i) la sous- ou surestimation des effets du stress, avec des gammes de variations

simulées peu cohérentes avec celles des variations observées ; et (ii) les performances finales (telles que le rendement) des plantes soumises plusieurs fois aux stress thermiques au cours de leur cycle ne peuvent pas être prédites avec précision, puisque les effets des stress successifs n'est pas égal à la somme de chaque stress individuel. Dans l'objectif d'améliorer la prise en compte des effets des stress répétés dans les modèles mécanistes, il serait intéressant d'introduire des lois de réponse avec des seuils plus fins (e.g. liés aux valeurs limites de température et/ou aux stades critiques de croissance tels que les indicateurs écoclimatiques, Magno et al., 2022b), avec des « fonctions/indices de stress » qui soient capables de reproduire les effets des stress sur des processus particuliers.

L'intégration d'un grain d'analyse plus fin de la température dans le modèle pourrait également être utile pour le développement du module qualité, avec la possibilité de prendre en compte des processus physiologiques impliqués dans la cinétique des composées de la graine (e.g. synthèse des lipides, désaturation des acides gras, synthèse des protéines). Enfin, il est néanmoins important de souligner que l'introduction d'une échelle plus fine dans le modèle implique aussi une augmentation de son niveau de complexité. D'un point de vue écophysiologique, il serait intéressant d'envisager l'intégration des relations complexes qui restent le plus mécanistes possibles. Le défi repose donc sur la construction d'un modèle qui soit suffisamment fin pour rendre compte des variations ponctuelles de la température, mais qui reste compréhensible et manipulable par une communauté scientifique large (agronomes, modélisateurs, écophysiologistes).

5.3. Analyses exploratoires avec des modèles de fouille de données

5.3.1. Préambule

La fouille de données est une discipline qui vise à extraire des informations pertinentes d'un ensemble de données. Différentes méthodes sont possibles pour réaliser ce processus d'extraction de connaissances, en incluant des étapes préalables de traitement des jeux de données et de sélection des algorithmes appropriés pour les exploiter. Dans l'objectif de mieux comprendre les effets des stress thermiques répétés au cours du cycle de culture, nous nous sommes prioritairement tournés vers des méthodes cognitives, plutôt que des méthodes prédictives. Ainsi, les méthodes de Causal Formal Concept Analysis (CFCA) et biclustering ont été utilisées en parallèle, à partir des jeux de données RAPSODYN prétraités comme décrit précédemment (i.e. Chapitres 2 et 5.1.). Notre objectif central a été d'identifier et de regrouper des séquences thermiques constituées d'une combinaison spécifique d'évènements thermiques chauds, dont les effets sur les critères de performance des cultures étaient similaires. Les analyses de CFCA ont été réalisées en utilisant des algorithmes d'inférences causales multivariées publiées par Bazin et al. (2022), tandis que les analyses de biclustering ont utilisé le logiciel BicPAMS (Henriques and Madeira, 2014). Les analyses par fouilles de données réalisées dans le cadre de cette thèse possèdent un caractère exploratoire et représentent une première ouverture de l'UMR EVA à des travaux de « big data » appliqué à l'agriculture. Ces travaux ont été réalisés principalement en collaboration avec le LORIA (INRIA, Nancy).

Méthodes exploratoires de fouille de données : principaux résultats

- Plusieurs tendances observées dans les résultats issus de la fouille de données sans *a priori* indiquent les mêmes comportements observés lors des caractérisations écophysiologiques du colza soumis aux stress thermiques répétés avec des mesures *in planta*, tel que la sensibilité des composantes de rendement aux stress thermiques arrivant en début de floraison et les interactions entre la teneur en huile et protéines dans les graines.

- Ces travaux exploratoires ouvrent un nouveau champ d'analyse de données agronomiques sans *a priori* complémentaire aux analyses écophysiologiques plus conventionnelles fondées sur des cadres conceptuels élaborés à partir de l'accumulation de connaissances scientifiques sur les processus élémentaires. La fouille de données peut faire émerger des relations complexes entre certaines variables difficiles à mettre en place expérimentalement. Inversement, les approches expérimentales ou de modélisation mécaniste peuvent aider à écarter certaines relations non réalistes issues de la fouille de données, engendrées notamment par une structure de données particulière ou restreinte.

5.3.2. Préparation des données et méthodologie

Dans l'objectif de découvrir des tendances par les méthodes CFCA et biclustering, les jeux de données prétraités de RAPSODYN (i.e. sous forme de matrice, en considérant les indicateurs écoclimatiques) ont été utilisés en tant que jeu de données d'entrée. La première version de ce jeu de données était constituée de 174 objets (lignes, représentant chaque parcelle d'expérimentation) et 17 attributs (colonnes, représentant les caractéristiques spécifiques à chaque objet, e.g. génotype, conditions climatiques formalisées par les indicateurs écoclimatiques et variables de performance des plantes). Pour augmenter la finesse des résultats, une deuxième version de ce jeu de données a été créée avec un nombre plus important de subdivisions des indicateurs écoclimatiques, qui ont été définis en utilisant la même méthodologie décrite auparavant, mais avec des nouveaux seuils de température (i.e. comptage du nombre de jours avec Tmax<20°C, Tmax entre 20-25°C, Tmax>25°C, Tmax entre 25-30°C et Tmax>30°C dans chaque intervalle critique de croissance de la plante, c'est--à-dire P300, P600, P1000 et Pharv, Chapitre 5.1.). La deuxième version du jeu de données comptait 174 objets et 30 attributs. Ainsi, les analyses réalisées en collaboration avec le LORIA ont consisté à extraire des relations de causalité entre les **variables « climat »** (i.e. sous forme d'indicateurs écoclimatiques dans la matrice) et les **variables « plante »** (i.e. rendement total, nombre de graines, PMG, teneur en lipides et protéines). La méthodologie utilisée dans le cadre des deux méthodes testées est résumée dans la Figure 1 (Chap. 5.3.).

Objectif : Extraction de règles de causalité
Entrée : Un tableur ayant les observations pour lignes et les indicateurs pour colonnes
Sortie : Une liste de règles de la forme $X \rightarrow Y$,
avec X un ensemble d'indicateurs "climat" et Y un ensemble d'indicateurs "plante"

```
1 pour chaque des deux versions des indicateurs faire
2     pour chaque des deux méthodes de fouille de données faire
3         Pré-traiter le classeur pour l'algorithme ;
4         Extraire un ensemble de règles ;
5         Éliminer les règles dont la direction n'est pas valide
      fin
  fin
6 retourner les règles inférées par plusieurs méthodes ;
```

Figure 1 (Chap. 5.3.) : Résumé des étapes réalisées pour les analyses avec les méthodes de fouille de données. À partir d'un jeu de données sous forme de matrice, plusieurs algorithmes d'exploration de données ont été testés dans le but de rechercher de potentielles règles causales de la forme X → Y. Chacune des deux méthodes fourni une liste d'implications X → Y, qui doit ensuite être épurée pour s'assurer de la bonne direction de la causalité (i.e. « climat » → « plante »). Schéma adapté d'après Assoumani (rapport de stage, 2022).

5.3.3. Méthode CFCA : concept et résultats

De façon générale, l'inférence causale englobe des méthodes permettant **d'établir des relations entre causes et effets**. La méthode CFCA repose particulièrement sur l'inférence de relations causales à partir de données d'observation, même si cela reste est une tâche assez complexe (Bazin et al., 2022). La CFCA rejoint la méthode de biclustering dans la mesure où les deux méthodes essaient de **trouver des sous-matrices ayant des similitudes entre les objets et leurs attributs**. Il est important de souligner que la plupart des travaux sur la causalité publiés jusqu'à présent se concentrent sur l'inférence causale univariée, c'est-à-dire en démontrant une relation causale existante entre deux variables X et Y dans une direction spécifique (i.e. relation cause et effet), la structure causale étant alors représentée par un graphe couramment appelé diagramme causal (Bazin et al., 2022). Cependant, l'analyse des effets nécessite souvent d'introduire l'interaction de plusieurs causes dans la pratique, c'est pourquoi Bazin et al. (2022) ont développé et publié des algorithmes basés sur la Formal Concept Analysis (FCA) appliqués à l'inférence causale (i.e. Causal FCA), permettant ainsi de découvrir de relations causales multivariées.

Dans l'exemple de la Figure 2 (Chap. 5.3.), la ligne « 4 12 -> 10 » indique que les attributs n°4 (P600_25) et n°12 (PMG) ont une inférence causale sur l'attribut n°10 (seed_yield). D'un point de vue écophysiologique, cette relation s'explique du fait que l'intervalle P600 correspond à la période d'allocation des réserves pour la croissance des siliques et graines (Corlouer et al., 2019; Magno et al., 2022b), la chaleur impactant ainsi la masse des graines et par conséquent le rendement. Dans la même logique, la ligne « 10 12 14 -> 13 » indique que les attributs n°10 (seed_yield), n°12 (PMG) et n° 14 (proteins) ont une inférence causale sur l'attribut n°13 (lipids). Cette relation s'explique par le fait que les lipides représentent une fraction importante du poids individuel des graines (environ 43%, Terres Univia, 2021) et par la corrélation négative entre les teneurs en lipides et protéines dans les graines du colza. De façon intéressante, cette dernière inférence concerne seulement les variables « plante », pas les variables « climat ». Il est important de souligner que les méthodes de CFCA infèrent un nombre important de relations causales (environ 40 dans le cadre de notre étude), ce qui implique un travail postérieur de sélection des inférences les plus pertinentes par les agronomes et écophysiologistes. La majorité des algorithmes permet également d'orienter des arêtes de diagramme causal, dans l'objectif de visualiser une structure causale dans sa globalité. La Figure 3 (Chap. 5.3.) illustre un diagramme causal de type « forward-backward » avec des résultats d'analyse très exploratoires car les liaisons entre nœuds et arêtes retrouvés ne présentent pas des directions de causalité logiques et restent donc peu conclusifs.

11 -> 9	
10 12 14 -> 13	**seed_yield, PMG, proteins -> lipids**
10 12 13 -> 0 4	
9 -> 7	
8 13 -> 12 4	**Pharv_25, lipids -> PMG**
8 12 -> 4	
8 10 -> 4	
7 -> 11	**P1000_30 -> seed_nb**
9 11 12 7 -> 4	
7 9 10 11 13 14 -> 4	
13 6 -> 4	
12 6 -> 4	
6 7 9 10 11 -> 13	**P1000_25, P1000_30, Pharv_30, seed_yield, seed_nb -> lipids**
4 -> 12	**P600_25 -> PMG**
4 12 -> 10	**P600_25, PMG -> seed_yield**
10 4 12 -> 0 13	
2 12 -> 4	
1 12 -> 4	
0 13 -> 12 4	**Ptot_25, lipids -> PMG**
0 12 -> 4	
0 10 -> 4 12	**Ptot_25, seed_yield -> PMG**
0 8 14 -> 12	

Liste d'attributs

0 = Ptot_25
1 = Ptot_30
2 = P300_25
3 = P300_30
4 = P600_25
5 = P600_30
6 = P1000_25
7 = P1000_30
8 = Pharv_25
9 = Pharv_30
10 = seed_yield
11 = seed_nb
12 = PMG
13 = lipids
14 = proteins

Figure 2 (Chap. 5.3.) : Exemple des résultats obtenus par les analyses CFCA. Les relations de causalité en vert ont été sélectionnés en étant les plus intéressantes et cohérentes d'un point de vue écophysiologique. Les chiffres indiquent le numéro de la colonne de chaque attribut dans le jeu de données d'entrée (en gris).

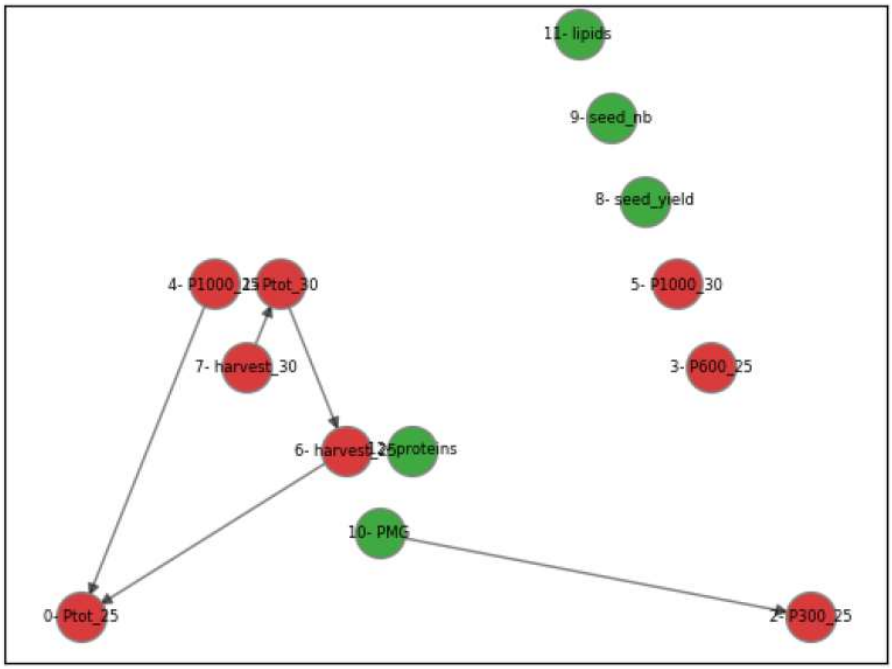


Figure 3 (Chap. 5.3.) : Diagramme causal. Les nœuds rouges sont des variables « climat », les verts sont des variables « plante » et les flèches représentent les liens de causalité inférés. Figure d'après les travaux d'Assoumani (rapport de stage, 2022).

5.3.4. Méthode biclustering : concept et résultats

Le clustering (ou classification non supervisée) est une méthode d'apprentissage qui a pour objectif **d'identifier des classes homogènes dans les données, par le biais des regroupements par similarité ou par proximité entre leurs attributs** (Bellon-Maurel et al., 2022). Cette méthode peut parfois être problématique, car certains objets peuvent partager des similarités avec d'autres objets à travers un sous-ensemble d'attributs seulement. Ce problème a conduit à l'émergence du biclustering, méthode appliquée initialement pour des jeux de données d'expression génétique (Cheng and Church, 2000).

De façon simplifiée, le biclustering est un regroupement simultané de lignes (objets) et de colonnes (attributs) dans une matrice, en suivant une relation spécifique prédéfinie (e.g. addition, multiplication, binaire, etc ; Figure 4 (Chap. 5.3.)). L'objectif est de trouver des sous-matrices, c'est-à-dire des **sous-groupes d'objets et des sous-groupes d'attributs**, dans lesquelles les données sont fortement corrélées pour chaque condition (Madeira and Oliveira, 2004). Dans le cadre de la thèse, l'objectif central a été d'identifier et de regrouper des séquences thermiques constituées d'une combinaison spécifique d'évènements thermiques chauds, ayant des effets similaires (i.e. bénéfiques ou pénalisants) sur des critères de performance ciblés (Figure 5 (Chap. 5.3.)). Ainsi, ces séquences pourraient indiquer des relations additives, multiplicatives et/ou d'autres relations selon la méthode de biclustering choisie. Ces séquences thermiques pourraient ainsi être utilisées en tant que pistes pour l'amélioration de la prise en compte des stress répétés au sein des modèles de culture.

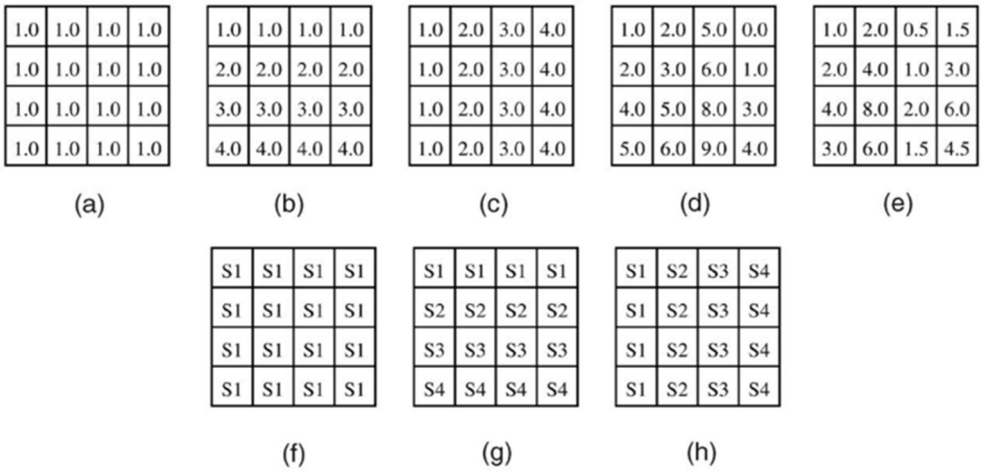


Figure 4 (Chap. 5.3.) : Exemples de différents types de biclusters : (a) valeur constante, (b) lignes constantes, (c) colonnes constantes, (d) additif, (e) multiplicatif, (f) évolution cohérente globale, (g) évolution cohérente des lignes et (h) évolution cohérente des colonnes (Madeira and Oliveira, 2004).

Plant feature T°C sequence	Seed Yield	Seed Oil content	Seed Protein content	Seed Storage capacity	...	Feature *n*
T°C seq 1	SY1	SO1	SP1	SSc1	...	Fn1
T°C seq 2	SY2	SO2	SP2	SSc2	...	Fn2
T°C seq 3	SY3	SO3	SP3	SSc3	...	Fn3
T°C seq 4	SY4	SO4	SP4	SSc4	...	Fn4
T°C seq 5	SY5	SO5	SP5	SSc5	...	Fn5
...	...	...	...	...	...	...
T°C seq *n*	SYn	SOn	SPn	SScn	...	Fnn

- **Bi-cluster ({T°Cseq 2, T°C seq 3}, {SO})** → effets similaire de deux séquences thermiques sur une caractéristique spécifique des plantes (ici teneur en lipides des graines, SO)
- **Bi-cluster ({T°C seq 2, T°C seq 5}, {SSc, Feature n})** → effets similaires de deux séquences thermiques sur deux caractéristiques des plantes (ici capacité de stockage, SSc et caractéristique n)

Figure 5 (Chap. 5.3.) : Illustration de la méthode de biclustering basée sur l'identification de séquences d'évènements thermiques chauds ayant des effets similaires sur des critères de performance ciblés. Les séquences d'évènements thermiques chauds sont nommées « T°C seq n », et les caractéristiques de performance des plantes sont le rendement en graines (SY), la teneur en huile des graines (SO), la teneur en protéines des graines (SP), la capacité de stockage des graines (SSc), d'entre autres caractéristiques (n).

Analyses avec le logiciel BicPAMS

Le logiciel BicPAMS permet des analyses de biclustering basées sur des motifs constants, additifs, multiplicatifs ou symétriques. A la différence des méthodes classiques de clustering, cette approche permet de détecter les biclusters qui se chevauchent et de traiter les valeurs manquantes. L'ensemble des processus de BicPAMS a été résumé en trois étapes (Juniarta, thèse de doctorat, 2019) : **cartographie, exploration et fermeture**. Dans l'étape de cartographie, la normalisation (i.e. définition d'une valeur moyenne nulle entre les biclusters) et la discrétisation (i.e. proposition des classes en fonction de la valeur de l'écart-type et de la moyenne des données) sont effectuées. L'étape d'exploration lors de laquelle les biclusters sont définis, est la partie principale. Lors de cette étape, BicPAMS utilise la paramétrisation par défaut ou celle sélectionnée par l'utilisateur dans l'interface du logiciel (Annexe 9). L'étape finale est une étape de post-traitement dans BicPAMS, avec l'extension des biclusters découverts sous certains critères d'homogénéité. Ensuite, une fusion de biclusters combine ceux ayant de nombreuses lignes et colonnes partagées. La dernière étape consiste en un filtrage, où certains biclusters qui sont contenus dans d'autres biclusters plus grands sont

éliminés. Chaque bicluster identifié par BicPAMS est composé d'une liste X de lignes du tableau (objets) et une liste Y de colonnes (attributs). La liste de lignes est principalement utile par sa taille, qui représente le nombre de parcelles expérimentales concernées par cette variation conjointe. Les colonnes répertorient les attributs concernés par les corrélations du bicluster. Il est important de souligner que les méthodes de biclustering infèrent un nombre important de biclusters (plus de 700 dans le cadre de notre étude), ce qui implique un travail de sélection des inférences les plus pertinente réalisé par les agronomes et écophysiologistes.

Deux types de biclusters sont illustrés dans la Figure 6 (Chap. 5.3.), à savoir les biclusters à colonne constante (a et b) et les biclusters multiplicatifs (c et d). Les **biclusters à colonne constante** (a et b) sont utilisés dans l'objectif de trouver un ensemble d'objets (ici d'essais expérimentaux) qui partagent des attributs constants (ici d'indicateurs écoclimatiques et variables de performance des plantes). Le bicluster (a) indique un nombre d'objets X = 35 pour un ensemble de 5 attributs constants (Y = [P300_25, P600_25, P1000_25, P1000_30, proteins]). Ceci indique que, dans l'ensemble de notre jeu de données d'entrée, 35 observations avaient des résultats similaires pour ces 5 attributs, qui sont reliés par des relations causales. Dans la même logique, le bicluster (b) indique un nombre d'objets X = 42 pour un ensemble de 4 attributs constants (Y = [P300_25, P1000_25, P1000_30, PMG]), qui sont reliés par des relations causales. Les biclusters à colonne constante pourraient être utiles dans l'objectif de définir des protocoles thermo-sensibilisants avec une échelle de variation précise d'une variable de performance des plantes (le taux de protéine ou le PMG par exemple), mais son utilisation dans l'objectif de mieux comprendre les effets des stress thermiques répétés reste assez limitée.

Les **biclusters multiplicatifs** (c et d) sont utilisés dans l'objectif de trouver des modifications proportionnelles dans l'ensemble des attributs appartenant à un nombre représentatif d'objets. Le bicluster (c) indique un nombre d'objets relativement faible (X = 6) pour un ensemble de 3 attributs (Y = [P600_25, P1000_25, proteins]), qui ont une relation causale multiplicative. Ce bicluster indique que, en gardant l'indicateur P600_25 égal à zéro, si le nombre de jours avec Tmax>25°C dans l'intervalle P1000 augmente de 8 à 11 (+ 38%), il est possible d'espérer que le taux de protéines dans les graines de colza augmente de 16,7% à 23,0% (+ 38%, en moyenne), ce qui indique un effet d'ampleur proportionnelle entre l'augmentation de la température et l'augmentation de la teneur en protéines. Dans la même logique, le bicluster (d) indique que si le nombre de jours avec Tmax>25°C dans l'intervalle P1000 augmente de 9 à 11 (+7%), il est possible d'espérer que le PMG augmente de 2,7 à 2,9 g (+ 7%, en moyenne), effet observé pour un nombre d'objets X = 11.

Biclusters à colonnes constantes – sorties de BicPAMS

(a) **(5,35)** X=[43, 46, 47, 49, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 64, 66, 73, 83, 84, 85, 86, 88, 89, 90, 117, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129]
Y=[P300_25, P600_25, P1000_25, P1000_30, proteins]

(b) **(4,42)** X=[1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 74, 81, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129]
Y=[P300_25, P1000_25, P1000_30, PMG]

Biclusters multiplicatifs – illustration du concept

(c) 6 x 3 bicluster

	P600_25	P1000_25	proteins
129	0	8	16.40
132	0	8	16.90
133	0	8	17.00
9	0	11	23.17
10	0	11	22.94
11	0	11	22.99

(d) 11 x 5 bicluster

	Ptot_30	P600_25	P1000_25	harvest_30	PMG
6	1	0	11	1	3.04
7	1	0	11	1	2.90
8	1	0	11	1	2.51
9	1	0	11	1	3.00
10	1	0	11	1	2.87
11	1	0	11	1	3.03
12	1	0	9	1	2.79
14	1	0	9	1	2.77
15	1	0	9	1	2.61
16	1	0	9	1	2.68
17	1	0	9	1	2.66

Figure 6 (Chap. 5.3.) : Exemples de biclusters à colonnes constantes (a et b) et de biclusters multiplicatifs (c et d) inférés à partir des analyses avec BicPAMS.

5.3.5. Conclusions et pistes d'amélioration

La CFCA et le biclustering ont été les méthodes cognitives retenues pour ces analyses, dans l'objectif de d'apporter des éléments de réflexion et de compréhension des effets des stress thermiques répétés complémentaires, pouvant également améliorer la prédiction par les autres approches de modélisation. Ces méthodes de fouilles de données sont particulièrement utiles pour **identifier des relations qui ne sont pas encore prises en compte dans les approches de modélisation classiques** (i.e. modèles empiriques et/ou mécanistes). L'objectif n'étant pas de prédire les variables de performance des plantes à partir du jeu de données, le choix des méthodes cognitives été basé sur l'objectif central de mieux comprendre notre jeu de données.

Quel que soit la méthode de fouille de données choisie, les étapes en amont de **nettoyage et préparation des données** semblent être essentielles pour garantir la qualité des analyses. Au cours de cette étape, les défis le plus importants ont été (i) d'identifier des données aberrantes et/ou peu fiables, puisque les données collectées lors des expérimentations au champ sont nombreuses et donc sujettes à de multiples sources d'hétérogénéité ; (ii) de créer

une matrice à partir de notre jeu de données brutes, puisque les deux méthodes utilisées nécessitent une structuration des données spécifique; et (iii) d'établir une relation cohérente entre les connaissances extraites des jeux de données et le savoir des experts. Concernant le jeu de données d'entrée, un gros travail de prétraitement a été fait avant (e.g. tri des données aberrantes, définition des indicateurs écoclimatiques) et pendant les analyses de fouille de données (e.g. traitement des valeurs manquantes). Cependant, la **taille du jeu de données a constitué un frein pour l'ensemble des méthodes** que nous n'avons pas pu lever, n'ayant eu accès qu'aux jeux de données d'un unique projet (regroupant pourtant 10 ans d'expérimentation avec le colza dans plusieurs localités géographiques). De plus, peu de biclusters ont inféré des relations causales par rapport aux indicateurs écoclimatiques avec Tmax>30°C, probablement du fait que ces analyses ont été réalisées avec des jeux de données passés (2011-2018) et acquis dans de localités géographiques principalement situées dans la moitié Nord de la France, pour lesquelles le nombre de jours avec Tmax>30°C était souvent faible dans la période considerée lors de la définition des indicateurs écoclimatiques (et donc pas assez représentatifs du nombre d'objets au sein du jeu de données).

De façon intéressante, plusieurs tendances observées dans les résultats issus des analyses par méthodes de fouille de données indiquent les mêmes tendances observées dans les travaux publiés auparavant concernant les expérimentations *in planta* (Magno et al., 2021) et *in silico* (Magno et al., 2022b), notamment les conséquences du stress thermique en début de floraison (i.e. intervalle P300) sur les composantes de rendement ; les effets compensatoires de la chaleur sur le rendement en résultant des effets bénéfiques sur le nombre de graines et pénalisants sur le poids individuels des graines ; ou encore la corrélation négative entre la teneur en huile et protéines dans les graines du colza. **Ceci démontre le potentiel des approches de « big data » dans la compréhension des effets des stress dans la perspective d'optimiser les protocoles de stress thermique et/ou d'introduire des règles de stress dans les modèles de culture mécanistes pour améliorer la prise en compte des stress répétés**. D'un point de vue des applications, il semblerait que les biclusters multiplicatifs sont les résultats les plus intéressants, puisqu'ils sont capables de rendre compte de coefficients multiplicatifs directs entre les variables « climat » et les variables « plante », ceci pouvant être utile pour définir des fonctions avec des seuils de température au sein des modèles mécanistes.

Les résultats trouvés dans le cadre de ma thèse sont exploratoires et peu conclusifs pour le moment, mais le développement de ces méthodes autour de la problématique des stress répétés chez les végétaux aura servi à créer une culture scientifique commune entre des

agronomes et des mathématiciens/statisticiens/informaticiens. Ceci m'a permis de me confronter à plusieurs défis : (i) scientifiques, tels que la limitation de la taille du jeu de données, l'organisation des données sous forme de matrice, le manque d'expertise et de pratique par rapport aux méthodes utilisées ; et (ii) de communication, en ce qui concerne l'interaction avec un nouveau domaine de connaissances et la mise en relation avec des membres extérieurs à ma thèse. Ces échanges étaient très riches et les résultats obtenus, même si peu conclusifs en l'état, fournissent des pistes pour des travaux dans la continuité de la collaboration avec le LORIA, dans le cadre de nouveaux projets. Ainsi, ces résultats serviront de base pour des analyses futures qui pourront potentiellement inclure d'autres espèces végétales (sorgho, blé, soja) et d'autres variables (radiation, pluviométrie, caractéristiques du sol) dans une gamme de conditions agro-pédo-climatiques plus large.

Chapitre 6 :
Discussion générale et perspectives

Discussion générale et perspectives

Dans l'objectif d'approfondir les connaissances sur les effets des stress thermiques répétés (inhérents au réchauffement climatique) sur le rendement et la qualité grainière du colza, cette thèse a proposé une démarche intégrative comprenant deux axes de recherche complémentaires (Figure 19) : (i) une **analyse écophysiologique des effets intra- et intergénérationnels** des stress thermiques répétés sur le colza fondée sur des caractérisations issues d'expérimentations *in planta* conduites en conditions contrôlées, et (ii) l'exploration de **trois approches de modélisation numérique** reposant sur l'utilisation d'indicateurs écoclimatiques, d'un modèle (semi-) mécaniste calibré pour le colza et de différentes méthodes de fouille de données.

Les trois expérimentations en conditions contrôlées conduites dans l'**Axe I** nous ont fourni une vision complète des effets de nos protocoles de stress thermiques répétés à l'échelle d'un cycle de culture avec des récoltes à maturité physiologique des graines (Chapitre 3.1.), mais aussi des récoltes cinétiques au cours du stade reproducteur (Chapitre 3.2.). De plus, nous avons également étudié ces effets sur deux générations consécutives de plantes stressées (Chapitre 4). Comme précisé dans la synthèse bibliographique (Chapitre 1), peu de travaux sur les effets des stress thermiques répétés existent chez le colza, et aucune étude n'a porté sur les effets intergénérationnels des stress thermiques auparavant, ce qui justifie l'intérêt d'approfondir cette caractérisation écophysiologique en étudiant finement les effets de différentes séquences thermiques. De plus, une partie des données issues de ces expérimentations *in planta* a été utilisée pour l'évaluation du modèle SUMO YIELD et pour les simulations en conditions des stress thermiques répétés dans le cadre de l'Axe II.

Les différentes approches de modélisation utilisées dans l'**Axe II** nous ont permis à la fois de mieux comprendre la prise en compte des effets des stress thermiques répétés dans les modèles, mais elles ont également mis en évidence la nécessité d'améliorer certains formalismes pour rendre compte des effets des stress successifs. Les expérimentations conduites au champ dans le cadre du projet RAPSODYN nous ont fourni des profils thermiques divers, du fait que les essais au champ ont été conduits sur plusieurs localités du territoire français (sud-ouest, nord-ouest, nord-est) entre 2011-2018. Ces jeux de données ont d'abord été traités pour définir des indicateurs écoclimatiques, ce qui a permis d'analyser les effets d'événements thermiques à des stades de développement spécifiques sur des variables de performance observées au champ (Chapitre 5.1.). Les indicateurs écoclimatiques issus du traitement de ces jeux de données ont également servi aux analyses reposant sur les méthodes de fouille de données (Chapitre 5.3.). Enfin, le travail réalisé avec le modèle (semi-) mécaniste

SuMoToRI a consisté à étendre sa calibration pour prédire le rendement en siliques du colza, à valider cette calibration et à réaliser de nouvelles simulations pour explorer les effets de conditions de stress thermiques qui miment des scénarios climatiques futurs (Chapitre 5.2.).

Les apports cognitifs et méthodologiques de mes travaux, ainsi que leurs limites et perspectives, seront discutées dans les deux parties suivantes : **6.1. Les stress répétés et la mémoire du stress** et **6.2. Apports et applications de la modélisation**.

Figure 19 : Synthèse des principaux résultats, limites et perspectives associées.

6.1. Les stress répétés et la mémoire du stress

Tel que présenté dans les Chapitres 3 et 4, **le premier objectif** de cette thèse a visé à évaluer en conditions contrôlées les effets des stress thermiques répétés s'approchant de conditions climatiques réalistes, et ce en interaction avec des apports en S contrastés susceptibles de moduler les effets mémoires (Axe I). Les expérimentations et analyses *in planta* réalisées dans l'Axe I ont été proposées pour répondre à deux questions majeures :

- Quels sont les impacts intra- et intergénérationnels de protocoles thermiques constitués de séquences d'évènements chauds différant par leur intensité, durée, période et fréquence, sur le rendement et la qualité grainière du colza ?
- Existe-t-il des protocoles thermo-sensibilisants indiquant un effet bénéfique de la mémoire du stress, avec ou sans implication du statut soufré du colza ?

6.1.1. Effets intra- et intergénérationnels des stress thermiques

L'ensemble de nos résultats acquis sur les effets intragénérationnels des différents protocoles thermiques testés dans le cadre de la thèse suggère des effets importants sur la qualité des graines du colza, mais peu significatifs sur le rendement total.

Concernant les composantes de rendement, nous avons mis en évidence des capacités de compensation du colza à différentes échelles dans des conditions de stress thermiques répétés (Magno et al., 2022c). Ces effets compensatoires semblent être mis en place après l'exposition aux stress thermiques via deux stratégies principales : (i) la compensation entre les composantes de rendement au sein d'une même cohorte de siliques (e.g. le stress induit une réduction du poids individuel des graines, compensée par une augmentation du nombre de graines), et/ou (ii) la compensation entre les différentes cohortes de siliques qui n'ont pas subi le stress dans le même stade de développement (e.g. le stress impacte le rendement en graines de la cohorte qui était en cours de remplissage pendant la période de stress, mais pas le rendement de la cohorte qui était en cours de maturation pendant la période de stress). L'ampleur de ces tendances n'était pas forcement attendue au début des travaux, il a été donc intéressant de mettre en évidence cette résilience du colza face aux stress thermiques printaniers en termes de rendement, du fait notamment de sa forte plasticité (Jullien et al., 2011; Labra et al., 2017).

Concernant la qualité nutritionnelle, les effets le plus intéressants du stress thermique concernent la réduction de la teneur en lipides et l'augmentation de la teneur en protéines

dans les graines issues des plantes stressées (Magno et al., 2021). En effet, la teneur totale en huile dans ces graines a toujours été inférieure à la teneur en huile des graines des plantes contrôle. De plus, une augmentation des proportions d'AG saturés et mono-insaturés (i.e. acide oléique, C18:1) au détriment des AG polyinsaturés, et plus spécifiquement de l'acide linolénique (C18:3), a été observée en conditions de stress thermique, ce qui a conduit à une augmentation défavorable du ratio ω6:ω3, selon les préconisations pour une alimentation équilibrée (Simopoulos, 2006). A l'inverse, la teneur en N et/ou en protéines des graines stressées a toujours été supérieure à la teneur en N/protéines des plantes contrôle. Ces résultats mettent en évidence non seulement la corrélation négative connue (Elferjani and Soolanayakanahally, 2018; Hammac et al., 2017; Kambhampati et al., 2020) entre les teneurs en lipides et protéines dans la graine du colza, mais aussi l'impact des stress thermiques récurrents sur le changement de la composition standard des graines du colza.

Dans un scénario où les vagues de chaleur sont de plus en plus fréquentes, on pourrait imaginer que ces modifications systématiques, i.e. la réduction de la teneur en huile et l'augmentation de la teneur en protéines, pourraient impliquer des **changements dans la valorisation des filières** « huile » et « protéine » des graines du colza, potentiellement en privilégiant certains débouchés au détriment d'autres. Par exemple, l'augmentation des teneurs en AG monoinsaturés des graines sous l'effet de la chaleur permettrait d'avoir des huiles avec une meilleure stabilité oxydative à la chaleur et par conséquent plus adaptées à la friture (Gauthier et al., 2017). Ainsi, l'utilisation de variétés « high-oleic low-linolenic » (HOLL) connues pour leur forte teneur en acide oléique et leur faible teneur en acide linolénique serait moins justifiée, puisque les variétés conventionnelles auraient le même comportement dans un climat futur. Une caractérisation écophysiologique approfondie en considérant d'autres génotypes de colza pourrait être réalisée à titre complémentaire pour confirmer les tendances observées. De plus, du fait que les températures élevées peuvent également modifier la composition des protéines en induisant la formation des heat shock proteins (HSP) et perturber l'intégrité structurale de la membrane des vacuoles de stockage des protéines (tel que démontré pour le soja, Krishnan et al., 2020), il serait intéressant de réaliser des analyses portant aussi sur la qualité de ces protéines, pas uniquement sur la quantité.

Concernant la qualité physiologique, les effets le plus importants de la chaleur sur les graines concernent la réduction de leur aptitude à la conservation, caractérisée par une augmentation de la perméabilité membranaire et une diminuition des ratios de sucres solubles (i.e. [stachyose and raffinose]:sucrose), qui traduisent une moindre tolérance à la dessiccation (Bailly et al., 2001). Par ailleurs, nos travaux portant sur la mémoire intragénérationnelle ont

indiqué peu d'**effets bénéfiques de la mémoire du stress**, ces effets étant significatifs uniquement sur la tolérance à la dessiccation et la teneur en N des graines (Magno et al., 2021). De plus, les résultats mettent en évidence une accélération des cinétiques de germination et des fortes teneurs en acide abscissique, une phytohormone impliquée dans le contrôle de la dormance (Ali et al., 2022) et la résistance aux stress abiotiques (Bita and Gerats, 2013; Wahid et al., 2007; Wang et al., 2021b). Tels que décrits dans d'autres études (Fan et al., 2018; Serrano et al., 2019; Tankari et al., 2021; Wang et al., 2019), les effets bénéfiques de la mémoire du stress intragénérationnelle semblent être souvent identifiés sur des variables relatives à la qualité physiologique des graines en lien avec la concentration en sucres solubles, hormones et/ou également sur d'autres changements métaboliques en réponse au stress.

Enfin, nos travaux portant sur la **mémoire intergénérationnelle** ont indiqué des effets des stress thermiques que se transmettent entre les générations. Bien que les effets sur les plantes mères ne soient pas prépondérants sur les effets sur les plantes filles, nous avons pu montrer qu'ils modifiaient l'ampleur de la réponse au stress au cours de la deuxième génération des plantes stressées (Magno et al., 2022a). Peu de travaux se sont emparés de la question de la **transmissibilité de la mémoire du stress aux générations suivantes** (i.e. mémoire inter- ou transgénérationnelle) chez les espèces de grandes cultures dans un contexte de dérèglement climatique. Les résultats publiés sont souvent contradictoires notamment à cause des différences de protocoles thermiques testés, ce qui souligne l'importance des caractéristiques des schémas thermiques pour observer des effets thermo-sensibilisants. En effet, alors que certains travaux illustrent des **effets intergénérationnels bénéfiques** de la mémoire de stress abiotiques (e.g. Wang et al., 2016 : rendement, photosynthèse, activité antioxydant des membranes chez le blé sous stress thermique ; Hatzig et al., 2018 : vigueur germinative chez le colza sous stress hydrique), d'autres sont davantage mitigés sur la **persistance de ces effets bénéfiques entre générations** (e.g. Groot et al., 2016 : Arabidopsis sous stress salin ; Suter and Widmer, 2013 : Arabidopsis sous stress thermique). Ces résultats contrastants conduisent également à une réflexion sur les mécanismes de transmission de la mémoire du stress, ainsi que sa persistance, au cours des générations. Ces questions doivent être approfondies dans l'objectif de développer des protocoles potentiellement thermo-sensibilisants.

6.1.2. Caractéristiques des protocoles thermo-sensibilisants

Les caractérisations et les interprétations des réponses des plantes aux stress thermiques répétés ne sont pas évidentes, notamment pour les espèces à croissance indéterminée comme indique l'ensemble de nos résultats sur les effets intra- et intergénérationnels des stress thermiques sur le colza. En effet, au-delà des caractéristiques de tolérance/sensibilité aux stress de chaque espèce (e.g. périodes critiques du développement, seuils de température), l'impact des stress répétés sur le rendement et la qualité des graines dépend aussi des caractéristiques intrinsèques aux séquences d'évènements chauds en termes d'intensité, de durée et de fréquence. Ces **caractéristiques de l'événement stressant** (e.g. modéré ou intense, court ou long, fractionné ou continu) combinées à la **période d'exposition** (en lien avec la phénologie de la plante et donc ses phases sensibles) sont à prendre en compte lors de la définition des protocoles de stress thermo-sensibilisants potentiellement applicables en conditions contrôlées pour la création de lignées en sélection végétale, ou pour la production d'espèces horticoles et maraichères.

Nos résultats portant sur le **développement cinétique des graines** nous ont permis de démontrer qu'il n'existait pas un protocole thermo-sensibilisant unique, tel que présenté dans nos hypothèses initiales, et ainsi de soulever la question de la spécificité des schémas ther mo-sensibilisants aux composés de réserve de la graine, du fait du synchronisme nécessaire entre les événements thermo-sensibilisants et les processus de synthèse/maturation des composés de réserve au sein de la graine, eux même séquentiels. Ainsi, un stress modéré précoce pourrait arriver avant que la synthèse/maturation d'un composé « x » débute, ce qui ne produirait donc aucun effet de mémoire du stress pour ce composé « x ». Ou encore, un stress intense tardif pourrait arriver après la fin des processus de synthèse/maturation du composé « y », n'ayant donc aucun effet puisque la teneur du composé « y » serait déjà établie.

De plus, nos résultats confirment que les **valeurs seuils des températures stressantes et sensibilisantes** sont également spécifiques au composé de réserve, même si nous ne pouvons pas comparer directement le stress modéré et le stress intense, puisqu'ils n'étaient pas appliqués au même stade de développement dans les protocoles testés dans le cadre de la thèse. Ainsi, il serait intéressant d'approfondir ces travaux en testant des nouveaux protocoles avec d'autres seuils de températures et/ou d'autres séquences d'évènements chauds (en variant leur intensité, durée et fréquence), qui soient appliqués à des stades phénologiques identiques ou différents. Cependant, si l'objectif est d'identifier des protocoles thermo-sensibilisants pour permettre au colza de s'acclimater, il serait pertinent de définir

plusieurs protocoles en visant spécifiquement chacun des débouchés de la filière (e.g. des protocoles thermo-sensibilisants spécifiques pour les lipides ou les protéines).

Ainsi, la construction des protocoles thermo-sensibilisants doit s'appuyer sur les **caractéristiques des évènements stressants, les exigences en termes de température de l'espèce végétale considérée et les critères de valorisation de la filière**. La construction de ces protocoles thermo-sensibilisants est encore peu formalisée et débattue dans la littérature disponible, du fait que (i) la période de stress est normalement accompagnée d'une période de « récupération », qui peut durer de quelques heures à quelques jours ; (ii) une première période de stress modéré peut préparer la plante pour une période de stress ultérieure plus intense (effet mémoire bénéfique) ; (iii) lorsque les plantes ne parviennent pas à récupérer après une première période de stress, les effets d'un stress ultérieur peuvent être amplifiés par rapport au premier (effet mémoire pénalisant) ; et (iv) certaines études montrent qu'une augmentation graduelle des conditions abiotiques stressantes peut aussi induire l'acclimatation (Aksouh et al., 2001; Mareri and Cai, 2022), même si cela reste complexe à interpréter d'un point de vue moléculaire.

De façon plus générale, il serait intéressant de considérer que **le stress thermique est souvent concomitant à d'autres stress** dans des conditions normales de production végétale (Jagadish et al., 2020), notamment ceux liés aux facteurs abiotiques (e.g. d'ordre nutritionnel, hydrique et/ou lumineux), mais également associés à des facteurs biotiques (e.g. la multiplication des cycles de ravageurs avec l'augmentation de température). En prenant la fertilisation comme exemple, Ostmeyer et al. (2020) ont montré que les effets pénalisants d'un stress hydrique pouvaient être partiellement atténués par des itinéraires techniques améliorés, tandis que les effets pénalisants du stress thermique seraient davantage atténués par la sélection végétale et l'utilisation de variétés thermotolérantes. Des interactions entre température et limitation en S ont été mises en évidence (Brunel-Muguet et al., 2015b; Magno et al., 2021), avec le stress S amplifiant certains effets pénalisants du stress thermique. Tout comme l'augmentation de la température, les stress nutritionnels peuvent décaler la phénologie des plantes et par conséquent les fenêtres de sensibilisation à des stress biotiques et abiotiques. Ces résultats mettent en évidence l'impact de divers stress sur la phénologie des plantes et donc sur la modification de la coïncidence entre les périodes critiques de croissance et des épisodes de stress. Concernant le colza, des apports adéquats en S doivent aussi garantir la qualité des graines en termes de protéines, en augmentant la proportion relative en napines (protéines de réserve des graines riches en S).

6.1.3. Perspectives sur l'étude de la mémoire du stress

Nos travaux sur la caractérisation des effets des stress thermiques répétés sur le colza par des expérimentations *in planta* en conditions contrôlées ont un caractère pionnier, du fait (i) du suivi cinétique des caractéristiques et composés pendant les séquence de stress au cours du cycle (effets intragénérationnels), et (ii) de l'analyse sur deux générations successives de plantes stressées (effets intergénérationnels). Ces travaux nous ont permis d'une part de mieux comprendre les effets des séquences de chaleur sur le rendement et la qualité grainière du colza, mais aussi d'améliorer la compréhension de la mémoire du stress sur une espèce de grande culture. Cependant, du fait d'un nombre limité de séquences thermiques testées et sur un seul génotype, il est difficile de conclure sur des actions pratiques à mettre en place pour réduire les effets négatifs des stress thermiques répétés, d'une part dans des conditions de production contrôlées ou semi contrôlées pour étudier les processus de réponse au stress, ou encore en modulant l'itinéraire technique et le choix variétal dans un contexte de production agricole au champ.

Une des priorités suite à ce travail de thèse serait **d'approfondir les caractérisations des réponses des végétaux aux stress répétés à des échelles moléculaires**, i.e. métabolomiques, transcriptomiques et épigénétiques afin d'identifier les processus métaboliques et les régulations transcriptomiques et épigénétiques associées à la mémoire du stress, pouvant expliquer les modifications observées. En effet, la caractérisation écophysiologique menée dans le cadre de cette thèse s'est concentrée principalement sur les résultats en termes de rendement et de qualité grainière en conditions de stress thermiques répétés. A cette échelle d'étude, les effets bénéfiques ou pénalisants de la mémoire du stress ont été observés directement sur les variables de performance des plantes (i.e. nombre et poids des graines, rendement total, teneurs en lipides et protéines), sans information sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'acquisition de la mémoire du stress. Par exemple, dans la perspective de développer des variétés thermotolérantes, l'analyse des modifications épigénétiques impliquées dans les effets bénéfiques de la mémoire du stress induite par des protocoles thermiques spécifiques permettrait d'identifier des marqueurs épigénétiques utilisables en sélection végétale (Bilichak et al., 2015; Brzezinka et al., 2019; Byeon et al., 2019; Song et al., 2021). Par ailleurs, les expérimentations conduites en combinant le stress thermique et la limitation en S pourraient être utilisées pour mieux définir et mesurer l'ampleur du rôle de la SAM (S-Adénosyl-Méthionine) dans les processus de méthylation de l'ADN, l'une des principales marques épigénétiques, en tant que donneur de groupes méthyle ($-CH_3$).

Ces analyses soulèvent plus largement la question des interactions entre les leviers d'acquisition de la tolérance au stress, puisque si des modifications épigénétiques s'avèrent contribuer à l'acquisition d'une mémoire bénéfique du stress, les interactions avec les pratiques culturales pourraient les promouvoir ou les annuler. Ainsi, même si les modifications épigénétiques induites par l'environnement s'avèrent être une nouvelle source de diversité favorisant la plasticité environnementale (Gallusci et al. (2017), les conditions environnementales dans lesquelles elles sont induites doivent être très bien connues et/ou maîtrisées pour induire une mémoire bénéfique. En parallèle à ces caractérisations acquises à des échelles plus fines, il pourrait être envisageable d'intégrer de nouveaux modules liés aux régulations épigénétiques dans les modèles de culture mécanistes, ceci étant aussi lié au Axe II de cette thèse. Gallusci et al. (2017) ont démontré la faisabilité du couplage entre un modèle écophysiologique mécaniste et un modèle de contrôle épigénétique en utilisant comme exemple un modèle simulant la production de Lycopène chez la tomate, en incluant des régulations épigénétiques. Cette approche de modélisation pourrait aider à évaluer et à quantifier les impacts de ces régulations épigénétiques sur les performances des cultures, dans l'objectif de guider la décision de les induire ou de les réprimer dans des stratégies de sélection. Cependant, ceci relève d'un niveau supplémentaire de complexité dans les modèles qui reste discutable, et qui pourrait être envisagée uniquement sur le long terme puisqu'il serait d'abord nécessaire de réaliser des analyses épigénétiques dans les échantillons issus des plantes stressées.

6.2. Apports et applications de la modélisation

Tel que présenté dans le Chapitre 5, le **deuxième objectif** de cette thèse a visé à explorer différentes approches de modélisation pour mieux comprendre et prédire les effets des stress thermiques répétés sur le rendement et la qualité grainière du colza (Axe II). Les expérimentations et analyses *in silico* de l'Axe II ont été réalisées pour répondre à deux questions majeures :

- Les modèles de cultures sont-ils capables de rendre compte de l'effet des stress thermiques répétés au cours d'un cycle de culture sur le rendement et la qualité grainière du colza ?
- Quelles sont les voies d'amélioration des modèles et/ou les approches de modélisation à privilégier pour prédire les effets des stress thermiques répétés ?

6.2.1. Effets des stress répétés au sein des modèles de culture

Il est évident que l'augmentation de la fréquence des épisodes de stress thermique résultante des changements globaux représente un défi pour la production agricole. Cependant, jusqu'à présent **peu de travaux se sont intéressés sur la façon dont les stress répétés impactent la croissance et la production des grandes cultures**. Au cours des dernières décennies, l'amélioration des modèles de culture a fait l'objet de plusieurs initiatives (e.g. AgMIP au niveau international, MACSUR au niveau européen), notamment dans l'objectif d'améliorer les fonctions de réponse à la température afin de réduire l'incertitude des simulations de rendement combinant plusieurs stress environnementaux (e.g. température élevée, sécheresse et CO_2 élevé, Holzworth et al., 2014; Vanuytrecht and Thorburn, 2017). En revanche, à notre connaissance aucun formalisme spécifique prenant en compte les effets des stress répétés n'a encore été développé, alors que les modèles de culture sont connus pour être particulièrement peu performants dans la prédiction des rendements des cultures soumises à des stress thermiques répétés au cours de leur cycle.

Tel qu'illustré par les simulations réalisées sous plusieurs séquences de stress thermique avec SUMO YIELD dans le cadre de cette thèse, les formalismes classiquement employés dans modèles de culture dans leur forme actuelle permettent de rendre compte des effets non additifs de stress successifs. Néanmoins, l'ampleur des variations simulées reste encore très approximative des valeurs observées dans les expérimentations *in planta*. Ceci peut être lié à la complexité des stratégies d'adaptation mises en place pour les plantes, notamment en ce qui concerne les modifications dans leur phénologie, les rapports source-puit de carbone et/ou

les divers mécanismes de réponse aux stress (e.g. modifications morpho-anatomiques, production d'hormones, capacité antioxydant). La mise en place de ces stratégies lors d'un stress précoce et pendant la phase de récupération rend encore plus complexe l'interprétation des effets des stress tardifs. A ce jour, les modèles de culture n'intègrent pas de processus à des échelles fines qui permettraient d'introduire de façon mécaniste les effets d'atténuation (bénéfique) ou d'amplification (pénalisant) d'un stress lorsque celui-ci arrive plusieurs fois dans le cycle de la culture et au cours de plusieurs cycles, ce qui contribue aux biais importants entre simulations et observations dans des conditions de stress thermiques récurrents.

6.2.2. Amélioration de la prédiction des effets des stress répétés

Avant de proposer des changements dans les formalismes des modèles de culture mécanistes, il semble important d'acquérir des **jeux de données testant davantage de séquences d'évènements chauds** (variant en termes d'intensité, période, durée et fréquence) par des expérimentations *in planta* avec des protocoles contrastants. Cette caractérisation en amont est indispensable pour améliorer notre compréhension de certaines lois de réponse à la température (par exemple les seuils de température qui sont stressants pour des variables d'intérêt spécifiques), ou encore des lois de réponse qui semblent être modifiées dans des conditions de stress répétés, qui incluent des phases de récupération pendant lesquelles la mémoire du stress peut être consolidée ou effacée (Crisp et al., 2016).

Dans le cadre de cette thèse, nous avons testé des schémas couvrant un plus large spectre de conditions climatiques via les approches de modélisation basées sur l'utilisation des jeux de données du projet RAPSODYN. La modélisation empirique (i.e. indicateurs écoclimatiques) et la fouille de données (i.e. CFCA et biclustering) sont intéressantes d'un point de vue exploratoire, puisque ces approches permettent d'analyser une quantité importante de données complexes, sans la nécessité de formuler des hypothèses *a priori*. Ainsi, il est possible de faire émerger des lois/hypothèses de réponse encore non rencontrées (e.g. l'augmentation de la fréquence des stress thermiques précoces), qui peuvent potentiellement être intégrées dans les modèles mécanistes et/ou guider des expérimentations pour les tester. Cependant, certaines limites sont inhérentes à ces approches, notamment la disponibilité de données nombreuses, la complexité des interactions entre plusieurs facteurs biotiques et abiotiques au champ et le besoin d'un expert pour la sélection des inférences pertinentes.

Les **étapes d'amélioration des modèles de culture** consisteraient alors (i) à tester leur robustesse en comparant les observations acquises dans ces conditions contrastées de stress

répétées avec les simulations réalisées dans ces mêmes conditions thermiques ; (ii) à évaluer l'ampleur des écarts en identifiant les formalismes et processus sous-jacents à l'origine des différences entre simulations et observations; et (iii) à implémenter les modèles, en incluant de nouveaux formalismes, notamment des « fonctions/indices de stress ». Ces fonctions ou indices de stress doivent rendre compte des périodes critiques de développement de la plante et des températures seuils inhérentes aux processus ciblés. La difficulté de cette approche repose sur la nécessité d'acquérir de nouveaux jeux de données climatiques contrastés en conditions contrôlées et/ou au champ, mais aussi sur la nécessité de gérer simultanément les différentes échelles de temps de réponse des plantes dans les modèles (e.g. réponse ponctuelle à un évènement de stress intense, réponse à plus long terme conditionnée par la répétition des stress).

6.2.3. Perspectives sur la modélisation des stress répétés

Nos travaux sur la caractérisation des effets des stress thermiques répétés chez le colza par expérimentations numériques ont un caractère pionnier, puisqu'il n'existe pas de travaux de modélisation ayant cherché à remettre en question les formalismes de réponse à la température pour rendre compte de effets des stress répétés jusqu'à présent. Dans le cadre de cette thèse, trois approches de modélisation ont été testées (i.e. indicateurs écoclimatiques, modèle de culture (semi-) mécaniste et fouille de données), chacune fournissant des informations sur les périodes critiques de développement de la plante, ou encore sur les différences de performances des plantes en réponse aux divers schémas de stress thermiques testés. **Du fait d'un nombre limité de jeux de données disponibles et testés par ces trois approches, il est difficile de proposer des implémentations prioritaires.** Néanmoins, la définition des « fonctions/indices de stress » au sein des modèles mécanistes, ainsi que la calibration de paramètres du modèle pour rendre compte des caractéristiques de variétés thermotolérantes s'avèrent des pistes pour améliorer les modèles dans ces contextes de stress thermiques répétés. Tel que discuté dans le Chapitre 6.1., il serait également possible d'améliorer les modèles en introduisant d'autres échelles analyses (e.g. régulations épigénétiques, Gallusci et al., 2017), mais ceci reste discutable du fait de rendre les modèles plus complexes (et donc plus difficiles à construire et à comprendre).

Dans la continuité de l'objectif d'améliorer la performance de prédiction des modèles de culture en conditions de stress thermiques répétés, il serait intéressant de transférer nos connaissances acquises sur le colza et sa réponse à la température à d'autres modèles agronomiques. En effet, **l'utilisation des modèles de culture plus holistiques** (e.g.

STICS, APSIM) permettrait (i) d'améliorer notre compréhension des interactions entre les stress thermiques répétés et d'autres facteurs de stress concomitants (inclus dans ces modèles, e.g. limitation en nutriments, sécheresse, stress biotiques) ; et (ii) de tester différentes pratiques culturales/systèmes de cultures pour identifier d'éventuels effets atténuateurs du stress thermique (e.g. successions de cultures, culture associées, utilisation de variétés précoces ou tardives).

Liste des activités scientifiques

ResearchGate : www.researchgate.net/profile/Lethicia-Magno

LinkedIn : www.linkedin.com/in/lethicia-magno/

Liste des publications et communications

Articles dans des journaux internationaux à comité de lecture

Magno, L., Coquemont-Guyot, M., Elie, N., Morvan-Bertrand, A., Avice, J.-C., Mollier, A., and Brunel-Muguet, S. (2022c). Repeated heat stress events during the reproductive phase impact the dynamic development of seeds in Brassica napus L. Article soumis le 05 septembre 2022 dans Plant Science.

Magno, L., Corlouer, E., Laperche, A., Nesi, N., Mollier, A., and Brunel-Muguet, S. (2022b). To what extent can ecoclimatic indicators assist crop performance predictions in oilseed rape upon repeated heat stresses? European Journal of Agronomy, EJA, 141, 126622. DOI: /10.1016/j.eja.2022.126622.

Magno, L., Coulon, M., Avice, J.-C., Morvan-Bertrand, A., Bessoule, J.-J., Le Guédard, M., Kim, T.H., Niare, A., Mollier, A., Bertin, N., and Brunel-Muguet, S. (2022a). Effects of two-generational heat stress exposure at the onset of seed maturation on seed yield and quality in Brassica napus L. Environmental and Experimental Botany, EEB, 195, 104788. DOI : 10.1016/j.envexpbot.2022.104788.

Magno, L., Avice, J.C., Morvan-Bertrand, A., Wagner, M.H., González-Centeno, M.R., Teissedre, P.L., Bessoule, J.J., Le Guédard, M., Kim, T.H., Mollier, A., and Brunel-Muguet, S. (2021). High temperature patterns at the onset of seed maturation determine seed yield and quality in oilseed rape (Brassica napus L.) in relation to sulphur nutrition. Environmental and Experimental Botany, EEB, 185. DOI : 10.1016/j.envexpbot.2021.104400.

Communications dans des colloques internationaux

Magno et al. (2022), oral. To what extent can ecoclimatic indicators assist crop performance predictions in oilseed rape upon repeated heat waves?. European Society for Agronomy Congress (ESA 2022), Potsdam, Allemagne.

Magno et al. (2022), oral. Impacts of heat stress on seed quality in oilseed rape : analysis of the dynamic development of seed storage compounds. 31st International Horticultural Congress (IHC 2022), Angers, France.

Magno et al. (2022), poster (Annexe 10). The use of ecoclimatic indicators as a strategy to take into account the effects of repeated heat waves in crop performance predictions. Phenology at the crossroads Congress (PHENOLOGY 2022), Avignon, France.

Magno et al. (2021), oral. High temperature patterns determine seed yield and quality in oilseed rape in relation to sulphur nutrition. Plant Biology Europe 2021 (PBE 2021), en distanciel.

Magno et al. (2020), poster (Annexe 10). Memory Modelling: do crop models need to become nostalgic?. Crop Modelling for Agriculture and Food Security under Global Change Congress (iCROPM 2020), Montpellier, France.

Communications dans des colloques nationaux

Magno et al. (2022), oral. New insights into plant stress memory : a case study in oilseed rape. Journées de la SFR Normandie Végétal (NORVEGE), Saint-Malo, France.

Magno et al. (2022), oral. What are the impacts of heat waves on the dynamic development of seed storage compounds in oilseed rape?. Journées de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (JED nBISE 2022), en distanciel.

Magno et al. (2021), poster (Annexe 10). Impact du stress thermique sur le développement cinétique des composés dans la graine de colza. Colloque GRAINES 2021, INRAE, en distanciel.

Magno et al. (2021), poster (Annexe 10). High temperature patterns determine seed yield and quality in oilseed rape in the context of climate change. Journées de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (JED nBISE 2021), en distanciel.

Autres communications

Magno et al. (2022), oral. Les indicateurs écoclimatiques peuvent-ils aider à prédire la performance des cultures exposées à des stress répétés?. Yield under Abiotic Challenges Labmeeting, Le Rheu, France. Communication dans le cadre d'une visite à l'IGEPP.

Magno et al. (2021), oral. Crop modelling : how can numbers help us better understand the effects of climate change?. Séminaire de MAthématique et LOgique pour l'exTraction et le traitEment de Connaissances (MALOTEC), Nancy, France. Communication dans le cadre d'un séjour au LORIA, INRIA.

Magno et al. (2021), oral. Impact du stress thermique sur le rendement et la qualité grainière du colza en interaction avec la fertilisation soufrée : caractérisation écophysiologique et modélisation, Caen, Feance. Communication lors des « Séminaires du Jeudi » à l'UMR EVA.

Liste des activités complémentaires

Actions scientifiques

2022 : Finaliste du concours « Ma Thèse en 180 secondes » (MT180) en Normandie. Présentation disponible sur < https://www.youtube.com/watch?v=-rRowgeCJ5Y >.

2022 : Participation au projet « Equations » par Olivia Gay, projet de recherche-création sur l'image du travail, à travers la pratique d'une photographie compréhensive. Projet disponible sur < https://www.oliviagay.com/index/G0000BUsU1nBy6XM >.

2019-2022 : Membre du CSI de Mélanie Fortier, doctorante au laboratoire Glycomev (Rouen).

Missions d'enseignement

2022-2023 : 2h de CM et 4h de TD de modélisation au Master 2 « Biosciences, Agrosciences, Ecoproduction, Biotechnologies végétales et Biovalorisation » (EcoBioValo), Université de Caen Normandie. Total de 7 HETD.

2021-2022 : 4h de CM et 4h de TD de modélisation au Master 2 « Biosciences, Agrosciences, Ecoproduction, Biotechnologies végétales et Biovalorisation » (EcoBioValo) + 10h de CM d'agronomie au Master 2 « Agrosciences, Environnement, Territoires, Paysage, Forêt, parcours Gestion et Valorisation Agri-environnementales » (Ecocaen) + 34h de cours de portugais au Carré International (LANSAD), Université de Caen Normandie. Total de 61 HETD.

2020-2021 : 10h de CM d'agronomie au Master 2 « Agrosciences, Environnement, Territoires, Paysage, Forêt, parcours Gestion et Valorisation Agri-environnementales » (Ecocaen), Université de Caen Normandie. Total de 15 HETD.

Mission de conseil et expertise

2021 : Analyse des impacts des systèmes agrivoltaïques sur 13 cultures de fruits et légumes en France pour l'entreprise Technique Solaire. La mission consistait en une veille bibliographique, la création de fiches techniques et la restitution des résultats auprès de l'entreprise.

Encadrement de stagiaires

2022 : Apport d'expertise en agronomie et écophysiologie dans le cadre du stage M2 de Zachary Assoumani sur la Causal Formal Concept Analysis (LORIA, INRIA, Nancy).

2022 : Apport d'expertise en modélisation dans le cadre du stage M2 de Guillaume Serafin sur les effets des stress abiotiques sur le soja (UMR EVA, INRAE, Caen).

2021 : Encadrement de Candice Kerdreux pour son stage de M1 sur la germination des graines du colza et sur les sucres solubles (UMR EVA, INRAE, Caen).

Prix et distinctions

2022 : Lauréate d'une bourse de voyage pour la participation des jeunes chercheurs aux congrès nationaux de la Société Française de Biologie Végétale (SFBV) et lauréate du financement de l'inscription du congrès 31st International Horticultural Congress (IHC 2022) par le Réseau Français de Biologie des Graines (RFBG).

2021 : Lauréate d'une bourse de mobilité pour un déplacement au LORIA (Nancy) de l'École doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (EDnBISE) et lauréate d'une bourse de mobilité pour un déplacement à l'UMR ISPA (Bordeaux) de l'Organisation pour les docTorants Interdisciplinaires de Caen (OPTIC).

2020 : Lauréate d'une bourse de voyage pour la participation des jeunes chercheurs aux congrès internationaux de la Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB).

Engagement bénévole

Mai 2022 – présent : Membre du Young Scientists Group (YSG), initiative globale de la part du World Food Forum (WFF) et de la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, ONU). Participation active dans la rédaction du rapport « Transforming crises into opportunities on agri-food systems ». Informations disponibles sur < https://www.world-food-forum.org/youth-action/young-scientists-group/en/ >.

Mai 2019 – Juin 2022 : Membre actif de l'ONG Thought For Food (TFF), occupant les rôles d'Ambassadrice, Coordinatrice Régionale Europe et Lider Stratégique Europe. Organisation des webinaires, mise en place des partenariats au niveau européen et participation au Global Summit à Rome, en Italie. Informations disponibles sur < https://thoughtforfood.org/ >.

Annexes

Annexe 1 : Fiche informative sur les chiffres de la production du colza.

Annexe 2 : Protocole général de la culture du colza d'hiver en serre à l'UMR EVA.

Annexe 3 : Composition des solutions nutritives Hoagland 1/4 et Hoagland 1/4 sans N et S.

Annexe 4 : Protocole des apports manuels en N et S à la sortie de la vernalisation.

Annexe 5 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2021 EEB (Chapitre 3.1.)

Annexe 6 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2022 PSL (Chapitre 3.2.)

Annexe 7 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2022 EEB (Chapitre 4.1.)

Annexe 8 : Variables, paramètres et équations de la version publiée de 2015 du modèle SuMoToRI (Brunel-Muguet et al., 2015b).

Annexe 9 : Interface interactive du logiciel BicPAMS (Henriques and Madeira, 2014).

Annexe 10 : Ensemble des posters présentés lors des congrès nationaux et internationaux dans le cadre de la thèse (voir « Liste des activités scientifiques »).

Annexe 1 : Fiche informative sur les chiffres de la production du colza.

Chiffres-clés de la production du colza 2020 - 2021

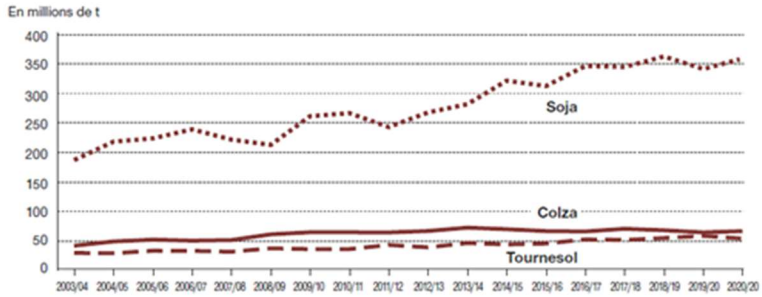
MONDE

2ème oléagineux
Derrière le soja

Production totale
64,78 Mt (2021)

Principaux producteurs
Canada, UE, Inde, Chine

Evolution de la production mondiale de colza, soja et tournesol



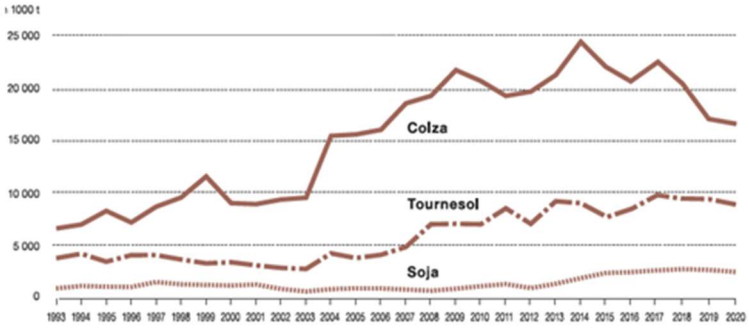
EUROPE

1er oléagineux
Avant le tournesol et le soja

Production totale
16,61 Mt (2021)

Principaux producteurs
Allemagne, France, Pologne

Evolution de la production de colza, soja et tournesol dans l'UE



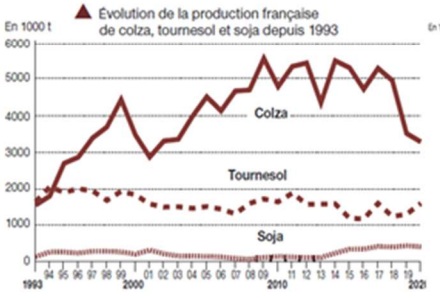
FRANCE

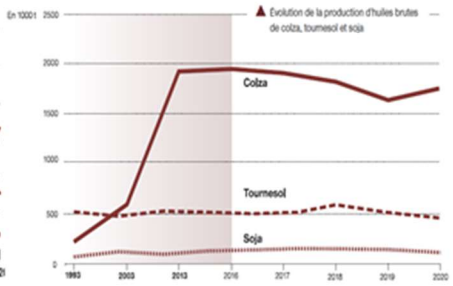
Production totale
3,29 Mt (2021)

Superficie moyenne
1,1 Mha (2021)

Rendement moyen
29,5 q/ha (2021)

Production des graines et d'huile de colza en France





Source des données et des graphiques : Terres Univia (2021). Statistiques Oléagineux & Plantes riches en protéines.

Annexe 2 : Protocole général de la culture du colza d'hiver en serre à l'UMR EVA.

Colza *Brassica napus* jusqu'au stade graines matures, sur substrat inerte, avec vernalisation

Stérilisation des graines : cf protocole de culture de colza sur substrat inerte

Semis – Germination

Pour un semi en vue de vernalisation, utiliser les terrines de vernalisation (24 alvéoles/terrine) au moment du semi, semi sur vermiculite pure.

Matériel : 1 poubelle de 80 litres, terrines de vernalisation de (24 plantes), grosses grilles plastiques, vermiculite, masques, eau osmosée, bacs gris 60/40/8, bacs gris 60/40/16, micro-pilons, pinces et graines.

Disposer les gros grillages au fond de chaque alvéole des terrines (24 trous/terrine).

- Remplir les plaques de semis avec la vermiculite humidifiée dans la poubelle à l'eau osmosée (et non détrempée). Bien tasser le fond puis tasser normalement jusqu'en haut, puis enfoncer le micro-pilon en entier, recouvrir un peu les trous avant de placer les graines stérilisées (ou non) au milieu de chaque alvéole. Les recouvrir légèrement sans tasser avec un peu de vermiculite, pulvériser de l'eau osmosée et recouvrir par un bac gris.

- Mettre à l'obscurité pendant 4 à 6 jours (évité l'étiolement). Chaque jour aérer et pulvériser de l'eau osmosée sur les graines, maintenir le fond du bac humide. Les racines peuvent avoir besoin d'être enfoncées délicatement dans le substrat.

- Une fois les cotylédons et la radicule développés, mettre à la lumière, remplacer l'eau par de la solution nutritive. Le lendemain allumer les lampes HP sodium. Chaque matin drainer le substrat en égouttant les terrines sur les bacs (1 heure), puis la première semaine changer la solution nutritive 1 fois, ensuite 3 fois par semaine et rincer les bacs.

Repiquage

Prévoir bien en avance la construction du système d'arrosage
Le repiquage s'effectue lorsque la 4ème feuille vraie est apparue (j10 à j15)

Matériel : 3 poubelles de 80 L, Pots noirs de 2 L, soucoupes, grillages, vermiculite, perlite, masques, portoirs bas (ou caillebotis)

- Dans une première poubelle, mouiller la perlite avec l'eau osmosée. (veiller à ajouter la même quantité d'eau pour le même volume de substrat). Dans la seconde, mouiller la vermiculite avec l'eau osmosée. (''). Les substrats doivent se tenir lorsque l'on forme une boule mais ne doivent pas être trempés. Faire le mélange dans la 3ème à raison d'1/3 de Vermiculite pour 2/3 de Perlite (en volume).Brasser régulièrement le mélange pour qu'il soit homogène, jusqu'au remplissage de la poubelle.

- Remplir à la moitié les pots avec le mélange et bien tasser, puis compléter le pot et tasser moins fortement.

- Creuser un trou pour accueillir la plante, puis rajouter du substrat et tasser délicatement depuis les côtés du pot vers la plante la surface doit-être plate à 1cm du haut du pot. Placer les pots sur les portoirs avec l'arrosage automatique (69 pots maxi / portoir).

Annexe 2 : Protocole général de la culture du colza d'hiver en serre à l'UMR EVA (cont.).

Colza *Brassica napus* jusqu'au stade graines matures, sur substrat inerte, avec vernalisation

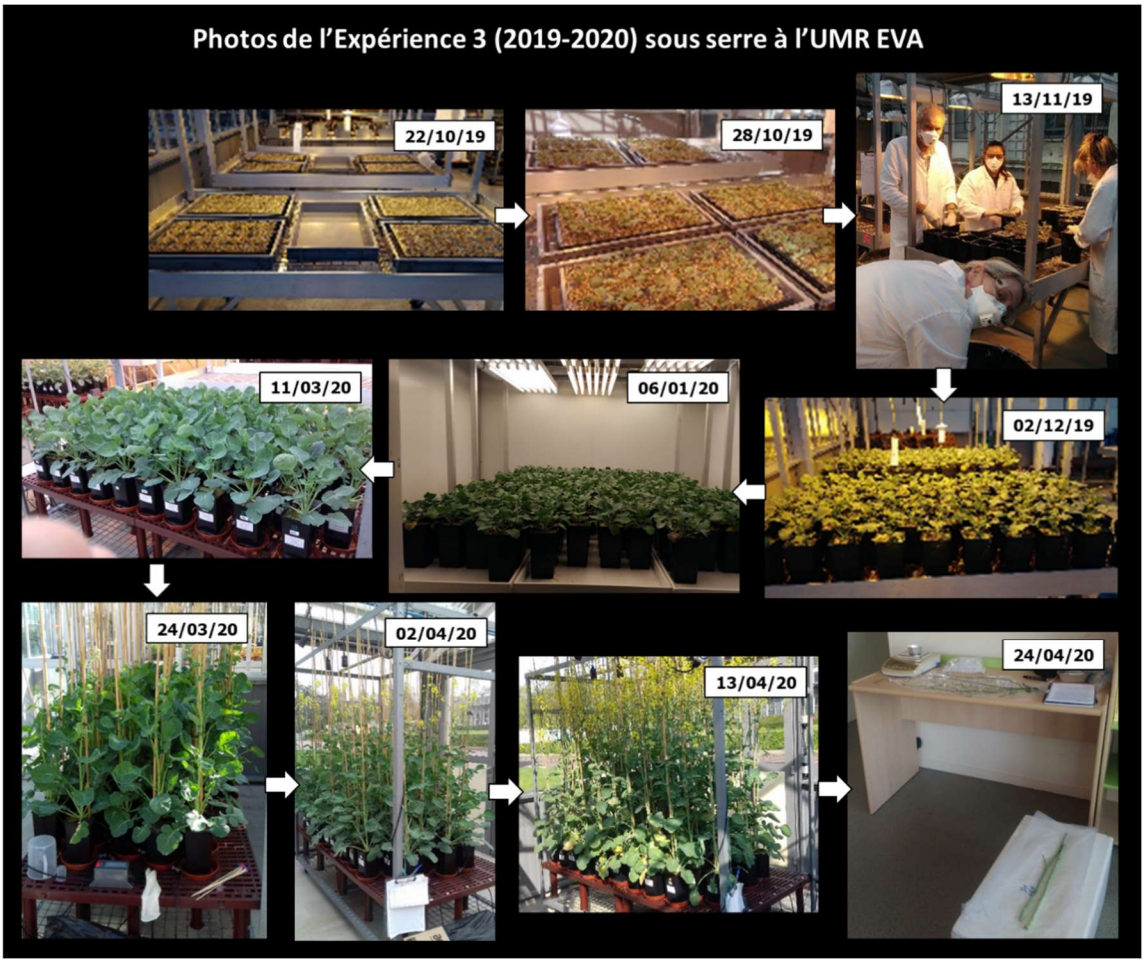
Vernalisation Prévoir la préparation de la chambre froide

Matériel : 6 bacs blancs, 6 pompes, 2 programmateurs, tuyaux souples, cales sous les bacs, 2 sceaux.

- Lorsque les rosettes sont bien développées (stade 7 à 8 feuilles) entre 1.5 et 2 mois de pré-culture, placer les pots (35 maxi /bac blanc) en chambre de vernalisation à 5° C (chambre IR 034 IRBA Est). Changer le niveau nutritif des solutions si nécessaire pour l'expérimentation.

- Mettre l'éclairage (néons) sur Horloge afin d'avoir des jours courts soit 8 h de jour / 16 h de nuit. Mettre 7 L de solution /bac blanc. 3 fois par semaine (lundi mercredi et vendredi) procéder à un égouttage des pots durant 2 heures, en vidangeant la solution grâce aux pompes, puis renouveler la solution.

- NB : La vernalisation dure 10 à 12 semaines. Ramasser régulièrement les feuilles chutées. Avant la sortie de vernalisation, prévoir en serre les portoirs (ou caillebotis) bas adaptés à la culture du colza jusqu'à maturité.



Annexe 3 : Composition des solutions nutritives Hoagland 1/4 et Hoagland 1/4 sans N et S.

Solution: Semis jusqu'à l'entrée en Vernalisat°

Hoagland 1/4 KNO3 (3,75 mM NO3)

sels	masse molaire	[conc finale] mM	[conc mère] mol.L-1	[conc mère] g.L-1	vol. solut° mère en ml/ 20 L
Ca (NO3)2, 4 H2O	236,1	1,25	1,25	295,13	20
KNO3	101,1	1,25	0,5	50,55	50
KH2PO4	136,1	0,25	0,5	68,05	10
MgSO4	246,37	0,5	1	246,37	10
EDTA, NaFe, 3 H2O	421	0,2	0,08	33,68	50
Oligoéléments	cf. ci-dessous	cf. ci-dessous	cf. ci-dessous	cf. ci-dessous	10

détails oligo-éléments normaux	masse molaire	[conc finale] µM	[conc mère] mM	[conc mère] g.L-1	vol. en ml / 20L
H3BO3	61,83	14	28	1,731	cf.ci-desssus
MnSO4, H2O	169,01	5	10	1,69	
ZnSO4, 7 H2O	287,5	3	6	1,725	
CuSO4, 5 H2O	249,68	0,7	1,4	0,35	
(NH4)6 Mo7O24	1235,6	0,7	1,4	1,729	
CoCl2	237,93	0,1	0,2	0,0475	

Solution: Vernalisat° jusqu'à la fin de culture

Hoagland 1/4 modifiée: sans N et ss S (avec oligo-éléments normaux) + NiCl2

sels	masse molaire	[conc finale] mM	[conc mère] mol.L-1	[conc mère] g.L-1	vol. solut° mère en ml/ 20 L
Ca (NO3)2, 4 H2O	236,1	0	1,25	295,13	0
KNO3	101,1	0	2	202,20	0
KH2PO4	136,1	0,25	0,5	68,05	10
MgSO4	246,37	0	1	246,37	0
CaCO3	100,8	1,25	0,36	36,29	69,4
KCl	74,54	1,25	1	74,54	25
MgCl2, 6H2O	203,31	0,5	1	203,31	10
EDTA, 2 NaFe, 3 H2O	421	0,2	0,08	33,68	50
NiCl2 6H2O	237,7	0,00004	7,29912E-05	0,01735	10,96022534
Oligoéléments	cf. ci-dessous	cf. ci-dessous	cf. ci-dessous	cf. ci-dessous	10

détails oligo-éléments normaux	masse molaire	[conc finale] µM	[conc mère] mM	[conc mère] g.L 1	vol. en ml / 20L
H3BO3	61,83	14	28	1,731	cf.ci-dessus
MnSO4, H2O	169,01	5	10	1,69	
ZnSO4, 7 H2O	287,5	3	6	1,725	
CuSO4, 5 H2O	249,68	0,7	1,4	0,35	
(NH4)6 Mo7O24	1235,6	0,7	1,4	1,729	
CoCl2	237,93	0,1	0,2	0,0475	

Annexe 4 : Protocole des apports manuels en N et S à la sortie de la vernalisation.

APPORTS DE N (densité de plantes de 40/m²)

- À la sortie de la vernalisation :

100U de N = 0,710 g de NH_4NO_3 (poudre/plante)

Préparer 1.5 L de solution de NH_4NO_3, en diluant 107.1 g de NH_4NO_3 (poudre) dans 1.5 L de H_2O. Apporter 10ml de cette solution dans chaque pot.

- Au stade boutons fermées :

50U de N = 0,355 g de NH_4NO_3 (poudre/plante)

Préparation deux fois moins concentré que la solution ci-dessus. Préparer 1.5 L de solution de NH_4NO_3, en diluant 53.55 g de NH_4NO_3 (poudre) dans 1.5 L de H_2O. Apporter 10ml de cette solution dans chaque pot.

APPORTS DE S (densité de plantes de 40/m²)

- À la sortie de la vernalisation :

Pour le traitement High Sulphur (HS) :

75 U de SO_3 = 75 mg S/plante, soit 2.34 ml de $MgSO_4$, 7 ml H_2O à 1M soit 246.37 g/L

Préparer 1L de solution pour HS avec 234.37 ml de solution mère de $MgSO_4$ + 765.63 ml de H_2O. Apporter 10 ml dans chaque pot HS.

Pour le traitement Low Sulphur (LS) :

25 U de SO_3 = 25 mg S/plante soit 0.78 ml de $MgSO_4$, 7 ml H_2O + compensation avec 1.56 ml de $MgCl_2$, 6 ml H_2O à 1M

Préparer 600 ml de solution HS avec 46.9 ml de solution mère de $MgSO_4$ + 93.7 ml de solution de $MgCl_2$, 6 ml de H_2O à 203.31 g/L + 439.4 ml de H_2O. Apporter 10 ml dans chaque pot LS.

NB: la solution de $MgCl_2$ a été apportée à la condition LS pour compenser les apports de Mg (dans $MgSO_4$) par rapport à la condition HS.

Annexe 5 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2021 EEB (Chapitre 3.1.)

Table S1 (Chap. 3.1.) : Daily incident Photosynthetically Active Radiation values (PARi, MJ/day) in the heated unit and in the control unit throughout the 17 days of Temp- modality application (from the 27th of April until the 15th of May).

Period covering the 17 day of heat treatment	Daily PARi in the heated unit (MJ/day)	Daily PARi in the control unit (MJ/day)	Ratio
April 27th	5.1	7.4	1.4
April 28 th	5.2	7.2	1.4
April 29 th	3.3	3.7	1.1
April 30 th	5.0	5.9	1.2
May 1st	5.5	7.1	1.3
May 2nd	6.7	7.1	1.0
May 3rd	5.3	5.3	1.0
May 4 th	5.8	5.8	1.0
May 5 th	3.5	3.4	1.0
May 6 th	6.5	7.5	1.1
May 7 th	4.4	5.0	1.1
May 8 th	4.4	10.1	2.3
May 9 th	4.8	9.8	2.0
May 10 th	4.8	4.5	0.9
May 11 th	5.7	5.5	1.0
May 12 th	6.7	5.4	0.8
May 13 th	6.1	9.4	1.5
May 14 th	5.1	7.4	1.4
May 15th	5.2	7.2	1.4

Table S2 (Chap 3.1.) : Mean individual seed (n) fresh weight (FW, mg/seed) at the beginning (Harvest 1, n=212) and at the end of Temp-modality exposure (Harvest 2, n=250) over 17 days. FWs are given for Temp-control plants. Standard deviation into brackets. Level of significance of the ANOVA test for the date effect: $p<0.05$*.

Harvest date	**Harvest 1**	**Harvest 2**
Mean Seed FW	3.31 (0.76)	5.98 (0.99)
p-value	**0.02***	

Annexe 5 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2021 EEB (Chapitre 3.1., cont.)

Table S3 (Chap. 3.1.) : Summary of the mean value ± se of the all measured variables for each of the 10 treatments in order to provide reference values in a given combination "Sulphur supply/Temperature modality". Standard deviation into brackets. P-values and levels of significance are given for Temp, Sulphur and Temp x Sulphur interaction effects. Levels of significance: ns non-significant, p<0.05*, p<0.01**, p<0.001***. DW: dry weight.

Sulphur condition	**High Sulphur**					**Low Sulphur**							
Temp-modality	**Control**	**Early Mild Stress**	**3 Late Heat Peaks**	**4 Late Heat Peaks**	**Priming**	**Control**	**Early Mild Stress**	**3 Late Heat Peaks**	**4 Late Heat Peaks**	**Priming**	**Temp effect**	**Sulphur effect**	**Temp x Sulphur**
Yield components (per plant)													
Total Seed Yield (g)	9.92 (0.57)	8.82 (0.82)	9.55 (0.74)	9.61 (0.55)	7.52 (0.91)	9.70 (1.35)	8.71 (0.64)	8.77 (1.61)	8.95 (0.46)	8.78 (1.87)	**0.04***	0.77	0.34
Total Seed Number	2774 (203)	2672 (184)	2802 (249)	2882 (192)	2519 (168)	2794 (328)	2457 (253)	2643 (183)	2565 (121)	2474 (124)	0.07	**0.04***	0.57
Thousand Seed Weight (g)	3.53 (0.29)	3.21 (0.34)	3.42 (0.34)	3.35 (0.28)	2.85 (0.65)	3.36 (0.46)	3.40 (0.34)	3.17 (0.62)	3.31 (0.15)	3.54 (1.51)	0.87	0.98	0.09
Seed C. N and S concentrations (%DW)													
Carbon	59.8 (0.7)	58.1 (0.9)	57.9 (1.7)	57.3 (1.6)	55.4 (1.3)	58.7 (1.8)	58.3 (1.2)	58.4 (1.9)	57.0 (1.0)	56.6 (1.8)	**0.00*****	0.83	0.61
Nitrogen	3.36 (0.23)	3.44 (0.22)	3.22 (0.34)	3.32 (0.24)	3.97 (0.19)	3.11 (0.50)	3.51 (0.09)	3.18 (0.20)	3.46 (0.25)	3.79 (0.33)	**0.00*****	0.55	0.57
Sulfur	0.39 (0.05)	0.38 (0.05)	0.39 (0.05)	0.40 (0.04)	0.42 (0.02)	0.24 (0.04)	0.27 (0.03)	0.26 (0.01)	0.24 (0.01)	0.33 (0.04)	**0.01***	**0.00*****	0.30
Oil contents and fatty acids (%DW)													
Total Fatty Acid	39.3 (4.5)	36.4 (1.1)	37.3 (1.1)	31.2 (4.8)	30.1 (3.2)	39.2 (8.1)	44.5 (1.0)	45.1 (4.1)	42.6 (5.0)	35.0 (1.9)	**0.00****	**0.00*****	0.11
ω6:ω3 ratio	2.03 (0.12)	1.83 (0.10)	2.05 (0.11)	2.08 (0.20)	2.29 (0.21)	2.07 (0.29)	1.91 (0.08)	2.11 (0.14)	2.33 (0.21)	2.19 (0.09)	**0.00****	0.22	0.38
Protein concentration (mg/g DW)													
Seed Storage Protein	91.0 (15.2)	149.9 (55.6)	79.9 (48.7)	93.2 (13.0)	118.3 (16.6)	208.3 (48.4)	186.3 (66.7)	192.5 (36.2)	153.7 (38.2)	182.6 (33.7)	0.28	**0.00 *** **	0.23
Soluble sugars concentrations (%DW)													
Sucrose	6.52 (0.80)	2.95 (0.25)	6.42 (2.17)	5.04 (1.76)	3.69 (0.82)	8.28 (0.84)	2.99 (0.88)	5.80 (2.10)	4.14 (1.06)	3.02 (0.38)	**0.00*****	0.85	0.25
Raffinose	0.44 (0.08)	0.21 (0.02)	0.41 (0.13)	0.30 (0.13)	0.25 (0.07)	0.50 (0.05)	0.21 (0.05)	0.35 (0.15)	0.21 (0.05)	0.17 (0.02)	**0.00*****	0.85	0.38
Stachyose	2.35 (0.38)	1.15 (0.15)	2.09 (0.52)	1.51 (0.58)	1.40 (0.41)	2.71 (0.25)	1.14 (0.32)	2.11 (0.76)	1.21 (0.31)	1.00 (0.10)	**0.00*****	0.62	0.43
[raff+stach]:sucr	0.43 (0.02)	0.46 (0.02)	0.40 (0.03)	0.35 (0.03)	0.44 (0.04)	0.39 (0.02)	0.45 (0.03)	0.42 (0.02)	0.34 (0.01)	0.39 (0.02)	**0.00*****	0.05	0.06
Seed conductivity (µS/mg DW)													
Seed Conductivity	0.87 (0.45)	1.28 (0.73)	1.19 (0.55)	0.97 (0.50)	2.86 (1.57)	0.78 (0.16)	0.66 (0.13)	0.81 (0.27)	1.08 (0.78)	3.01 (0.93)	**0.00*****	0.34	0.66
Hormone concentrations (ng/g DW)													
Indole-3-Acetic Acid	134.3 (1.2)	121.7 (1.1)	278.2 (6.6)	380.3 (1.8)	268.9 (4.3)	160.1 (6.9)	211.5 (1.9)	164.6 (1.2)	279.5 (3.6)	192.7 (1.9)	**0.00*****	**0.00*****	**0.00*****
Salicylic Acid	40.8 (0.6)	42.6 (0.3)	96.6 (1.6)	135.6 (0.5)	103.1 (2.5)	59.3 (2.6)	76.1 (0.7)	73.5 (0.9)	82.5 (0.9)	96.1 (1.1)	**0.00*****	**0.00*****	**0.00*****
ABA:GA3 ratio	0.28 (0.01)	0.41 (0.00)	0.42 (0.01)	0.49 (0.01)	0.74 (0.01)	0.79 (0.03)	0.60 (0.01)	0.95 (0.00)	0.91 (0.01)	0.63 (0.02)	**0.00*****	**0.00*****	**0.00*****
Phenolic content and antioxidant capacity													
Polyphenols	3.96 (0.15)	4.12 (0.18)	3.79 (0.23)	3.44 (0.49)	3.76 (0.30)	3.34 (0.48)	4.26 (0.20)	3.35 (0.26)	3.71 (0.36)	4.11 (0.15)	**0.00****	0.60	**0.01***
ABST	18.70 (1.04)	19.14 (0.87)	18.18 (1.93)	15.66 (1.97)	17.72 (0.76)	15.29 (1.31)	18.68 (1.91)	15.47 (0.96)	16.40 (1.75)	18.17 (0.84)	**0.00****	**0.01***	**0.00****

Annexe 5 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2021 EEB (Chapitre 3.1., cont.)

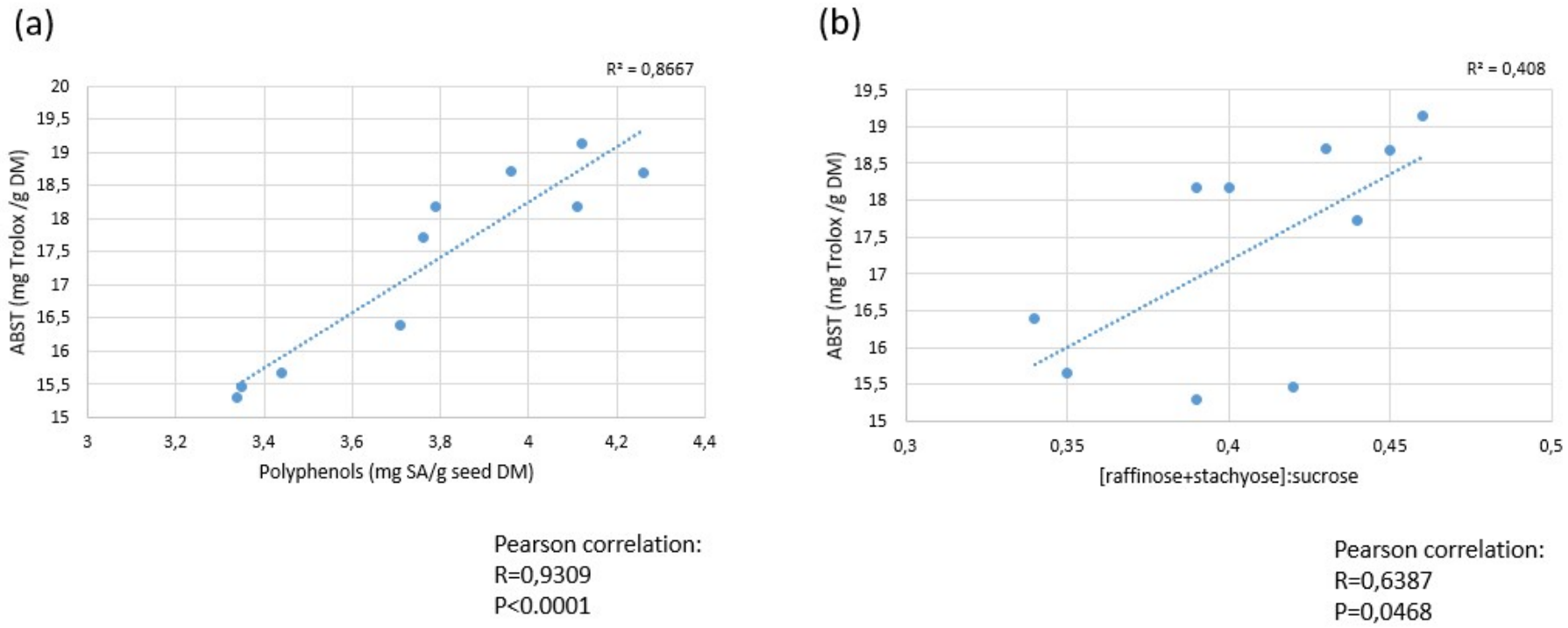


Figure S1 (Chap. 3.1.) : Illustration of the correlation between ABTS value related to (a) polyphenols and (b) soluble sugars ratio. SA: synaptic acid, ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

Annexe 6 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2022 PSL (Chapitre 3.2.)

Table SD1 (Chap. 3.2.) : Yield components and quality related variables measured in **seeds from pods$_{L\geq5cm}$, pods$_{L<5cm}$** and **pods$_{Flo}$** (i.e. inflorescences at the beginning of stress exposure or that appeared after the whole stress sequence), at an intermediate harvest (60 days after vernalization, DAV). Temperature modalities were Ctrl: Control, RSS: Repeated Stresses Sequence, EMS: Early Mild Stress, and 4LHP: 4 Late Heat Peaks. Letters indicate the ranking among the temperature modalities when the Tukey tests were significant for a given date of harvest. The p-values indicate the level of significance of the temperature effect, i.e. *ns: non-significant, p < 0.05*, p < 0.01**, p < 0.001****. se: standard error; nb: number; TSW: thousand seed weight; DW: dry weight; FA: fatty acids; UFA: unsaturated FA; SFA: saturated FA.

	Yield components			**Oil content and fatty acids**				**Seed C, N and S concentrations**			**Soluble sugars**			
60 DAV	**Seed yield** (g.plant^{-1})	**Seed nb** (per plant)	**TSW** (g)	**Total FA** (%DW)	**UFA** (%DW)	**SFA** (%DW)	**ω6:ω3 ratio**	**Carbon** (%DW)	**Nitrogen** (%DW)	**Sulphur** (%DW)	**Raffinose** (%DW)	**Stachyose** (%DW)	**Sucrose** (%DW)	**Sugars ratio**
Seeds from pods$_{Flo}$														
Ctrl/4LHP	0.09	377	0.22 b	1.57	0.69	0.88	3.81	41.69	2.47	0.24	0.31 a	na	1.35	0.23
RSS/EMS	0.09	289	0.31 a	1.74	0.89	0.85	3.66	45.88	2.64	0.28	0.08 b	na	0.46	0.18
se	*0.09*	*332*	*0.02*	*0.02*	*0.01*	*0.01*	*0.13*	*3.12*	*0.03*	*0.01*	*0.00*	*na*	*0.08*	*0.02*
p-value	*0.94 ns*	*0.74 ns*	*0.02**	*0.21 ns*	*0.11 ns*	*0.51 ns*	*0.72 ns*	*0.68 ns*	*0.27 ns*	*0.33 ns*	*0.03 **	*na*	*0.14 ns*	*0.54 ns*
Seeds from pods L$_{<5cm}$														
Ctrl/4LHP	0.71	871	0.80	3.02	2.02	1.00	3.31	36.88	2.42	0.24	0.22	na	1.34	0.18
RSS/EMS	0.67	850	0.79	5.36	4.05	1.31	2.82	36.36	2.80	0.31	0.23	na	1.24	0.18
se	*0.33*	*360*	*0.09*	*1.19*	*1.06*	*0.15*	*0.21*	*0.99*	*0.25*	*0.04*	*0.11*	*na*	*0.69*	*0.02*
p-value	*0.87 ns*	*0.93 ns*	*0.87 ns*	*0.09 ns*	*0.09 ns*	*0.09 ns*	*0.05 ns*	*0.63 ns*	*0.14 ns*	*0.14 ns*	*0.98 ns*	*na*	*0.87 ns*	*0.98 ns*
Seeds from pods L$_{\geq5cm}$														
Ctrl/4LHP	0.56	301	1.86 a	7.96	6.20	1.75	3.04	41.79	2.78	0.31	0.10 b	na	0.39 b	0.27
RSS/EMS	0.74	473	1.57 b	13.02	11.05	1.97	2.58	40.70	3.01	0.41	0.16 a	na	0.73 a	0.21
se	*0.43*	*264*	*0.10*	*3.91*	*3.49*	*0.60*	*0.38*	*1.85*	*0.12*	*0.08*	*0.02*	*na*	*0.07*	*0.05*
p-value	*0.66 ns*	*0.51 ns*	*0.01 **	*0.31 ns*	*0.28 ns*	*0.69 ns*	*0.22 ns*	*0.55 ns*	*0.10 ns*	*0.21 ns*	*0.02 **	*na*	*0.00***	*0.19 ns*

Annexe 6 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2022 PSL (Chapitre 3.2., cont.)

Table SD2, (Chap. 3.2.) : Yield components and quality related variables measured in **seeds from pods$_{L\geq5cm}$, pods$_{L<5cm}$** and **pods$_{Flo}$** (i.e. inflorescences at the beginning of stress exposure or that appeared after the whole stress sequence), at an intermediate harvest (76 days after vernalization, DAV). Temperature modalities were Ctrl: Control, RSS: Repeated Stresses Sequence, EMS: Early Mild Stress, and 4LHP: 4 Late Heat Peaks. Letters indicate the ranking among the temperature modalities when the Tukey tests were significant for a given date of harvest. The p-values indicate the level of significance of the temperature effect, i.e. *ns: non-significant, p < 0.05*, p < 0.01**, p < 0.001****. se: standard error; nb: number; TSW: thousand seed weight; DW: dry weight; FA: fatty acids; UFA: unsaturated FA; SFA: saturated FA.

76 DAV	Yield components			Oil content and fatty acids				Seed C, N and S concentrations			Soluble sugars			
	Seed yield (g.plant^{-1})	**Seed nb** (per plant)	**TSW** (g)	**Total FA** (%DW)	**UFA** (%DW)	**SFA** (%DW)	**ω6:ω3 ratio**	**Carbon** (%DW)	**Nitrogen** (%DW)	**Sulphur** (%DW)	**Raffinose** (%DW)	**Stachyose** (%DW)	**Sucrose** (%DW)	**Sugars ratio**
Seeds from pods$_{Flo}$														
Ctrl	1.16	860	1.30	14.43 b	12.21 b	2.22 b	2.62 a	52.82	2.89	0.32 c	0.49 a	na	2.17 a	0.24 a
RSS	0.90	596	1.54	24.96 a	22.13 a	2.83 ab	2.05 b	49.47	3.54	0.45 ab	0.12 b	na	2.57 a	0.05 b
EMS	1.10	738	1.46	22.07 a	19.36 a	2.71 ab	2.32 ab	42.82	3.08	0.48 a	0.15 b	na	1.45 ab	0.08 b
4LHP	1.06	736	1.23	25.91 a	22.76 a	3.15 a	2.14 b	54.70	2.99	0.35 bc	0.07 b	na	0.70 b	0.11 b
se	*0.67*	*459*	*0.21*	*3.46*	*3.12*	*0.34*	*0.20*	*8.87*	*0.36*	*0.06*	*0.07*	*na*	*0.65*	*0.04*
p-value	*0.95 ns*	*0.88 ns*	*0.40 ns*	*0.02 **	*0.01 **	*0.08 ns*	*0.04 **	*0.50 ns*	*0.24 ns*	*0.04 **	*0.00 ****	*na*	*0.05 ns*	*0.00 ****
Seeds from pods L$_{<5cm}$														
Ctrl	3.28	1225	2.70	31.19	27.80	3.37	2.39 a	40.90	2 .36 b	0.26	0.05	0.01	0.58	0.09
RSS	3.72	1402	2.66	32.27	29.13	3.13	1.90 b	41.24	3.04 a	0.30	0.11	0.00	0.91	0.12
EMS	2.60	981	2.69	32.14	28.96	3.18	1.93 b	41.35	3.07 a	0.32	0.11	0.00	1.50	0.08
4LHP	3.19	1247	2.55	28.78	25.71	3.10	2.36 a	40.72	2.98 a	0.29	0.11	0.03	1.54	0.11
se	*1.08*	*435*	*0.14*	*1.91*	*1.81*	*0.15*	*0.19*	*1.09*	*0.25*	*0.07*	*0.05*	*0.01*	*0.69*	*0.02*
p-value	*0.66 ns*	*0.68 ns*	*0.56 ns*	*0.25 ns*	*0.22 ns*	*0.22 ns*	*0.04 **	*0.90 ns*	*0.05 **	*0.79 ns*	*0.43 ns*	*0.51 ns*	*0.41 ns*	*0.86 ns*
Seeds from pods L$_{\geq5cm}$														
Ctrl	1.66	444	3.76 a	37.94 a	34.37 a	3.57 a	2.03 bc	44.52	2.65 b	0.25	0.14	0.01 c	1.26	0.14 b
RSS	0.79	269	2.69 b	25.63 b	23.07 b	2.56 c	2.31 ab	41.65	3.43 a	0.43	0.46	0.26 a	2.13	0.33 a
EMS	1.10	358	2.58 b	29.98 b	27.24 b	2.73 bc	1.80 c	41.23	2.98 ab	0.38	0.41	0.06 bc	1.95	0.18 ab
4LHP	1.31	435	2.97 ab	32.37 ab	29.07 ab	3.30 ab	2.41 a	42.50	2.97 ab	0.38	0.38	0.18 ab	1.84	0.32 a
se	*0.91*	*283*	*0.57*	*3.52*	*3.28*	*0.29*	*0.18*	*2.02*	*0.24*	*0.11*	*0.20*	*0.06*	*0.86*	*0.08*
p-value	*0.64 ns*	*0.83 ns*	*0.07 ns*	*0.03 **	*0.03 **	*0.01 **	*0.01 **	*0.40 ns*	*0.06 ns*	*0.33 ns*	*0.38 ns*	*0.00 ***	*0.67 ns*	*0.07 ns*

Annexe 6 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2022 PSL (Chapitre 3.2., cont.)

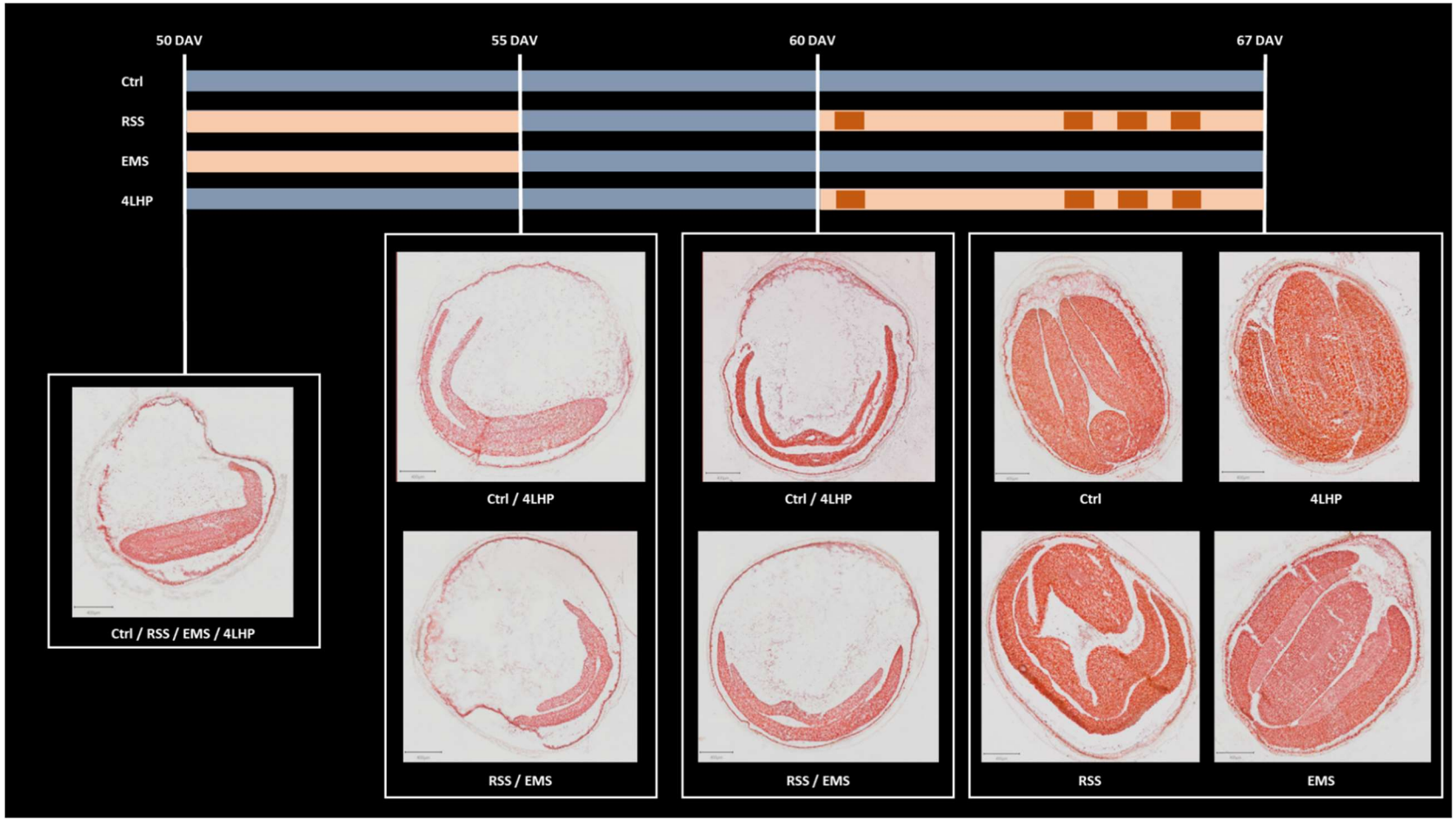


Figure SD1, (Chap. 3.2.) : Histological sections of seeds from pods$_{L \geq 5cm}$ stained with Oil Red O (ORO) for visualization of lipids storage in different temperature modalities, collected in four different harvest dates (i.e. 50, 55, 60, and 67 DAV). DAV: days after vernalization; Ctrl: Control; RSS: Repeated Stresses Sequence; EMS: Early Mild Stress; 4LHP: 4 Late Heat Peaks.

Annexe 6 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2022 PSL (Chapitre 3.2., cont.)

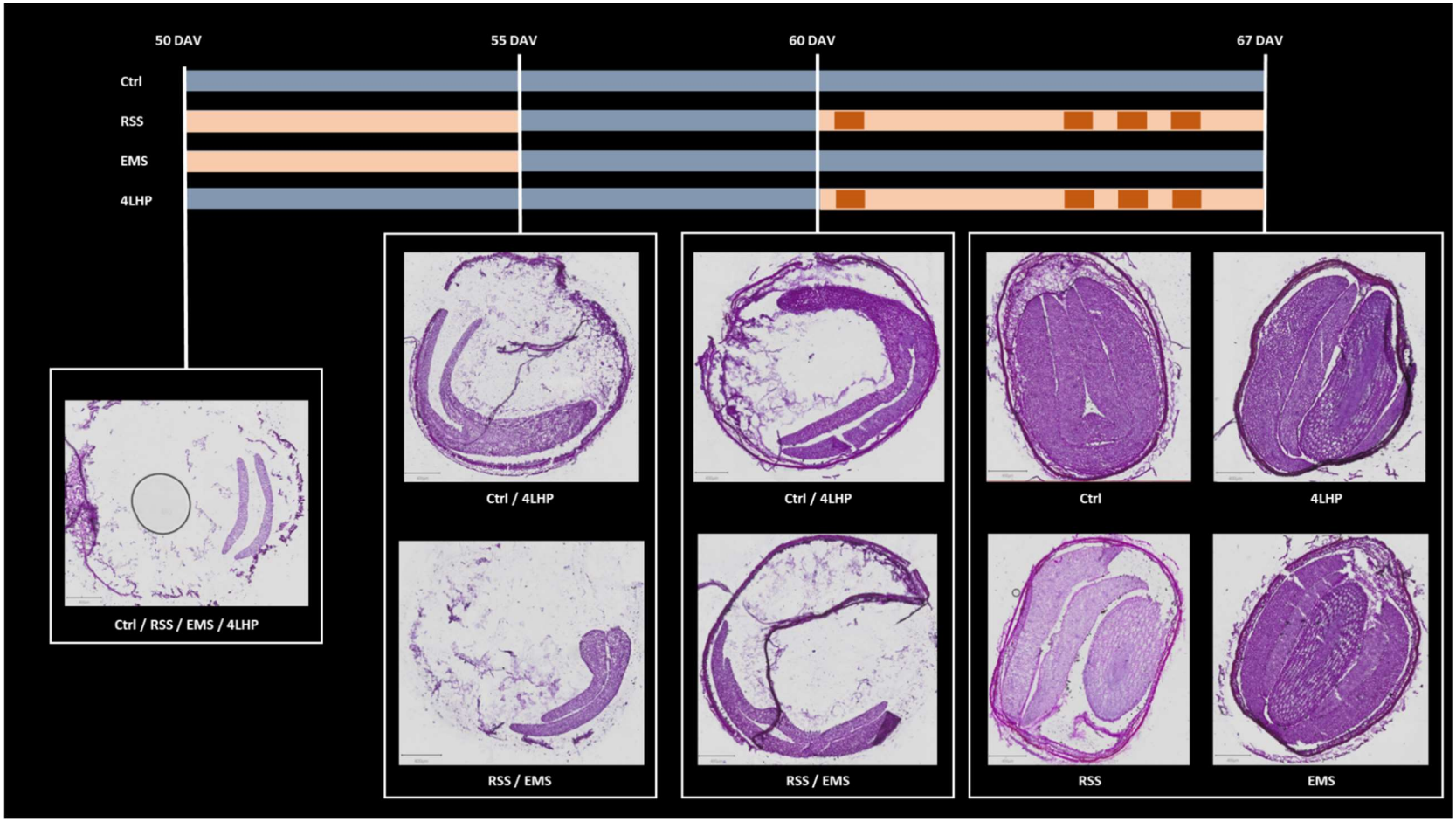


Figure SD2, (Chap. 3.2.) : Histological sections of seeds from pods$_{L \geq 5cm}$ stained with Periodic acid-Schiff (PAS) for visualization of polysaccharides in different temperature modalities, and collected in four different harvest dates (i.e. 50, 55, 60, and 67 DAV). DAV: days after vernalization; Ctrl: Control; RSS: Repeated Stresses Sequence; EMS: Early Mild Stress; 4LHP: 4 Late Heat Peaks.

Annexe 7 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2022 EEB (Chapitre 4.1.)

SD, Table 1 (Chap. 4.1.) : Values of each Mother-modality x Progeny-modality combination for the measured variables in the High Sulphur condition. Letters indicate the ranking among Progeny-modalities for a given Mother-modality (mean pairwise comparison test, LSD test). TSW: Thousand Seed Weight, DW: dry weight, FA: fatty acid, UFA: unsaturated FA, SFA: saturated FA, C: carbon, N: nitrogen, S: Sulphur, ABA: abscisic acid, GA3: gibberellic acid.

Mother-modalities	**Control**	**Priming**					**EMS**					**3LHP**				
Progeny-modalities	**Control**	**Control**	**Priming**	**EMS**	**4LHP**	**3LHP**	**Control**	**Priming**	**EMS**	**4LHP**	**3LHP**	**Control**	**Priming**	**EMS**	**4LHP**	**3LHP**
Seed yield - pods $L_{\geq 5cm}$ (g/pl)	1.77	2.05 a	2.69 a	2.02 a	2.98 a	1.35 a	3.07 a	2.21 a	2.73 a	3.72 a	3.07 a	2.11 b	1.97 b	2.27 b	3.49 ab	4.06 a
Seed number - pods $L_{\geq 5cm}$ (per pl)	347	402 a	791 a	467 a	701 a	312 a	751 a	704 a	691 a	1017 a	770 a	464 b	568 ab	525 ab	810 ab	935 a
TSW - pods $L_{\geq 5cm}$ (g)	5.10	5.16 a	3.54 b	4.46 ab	4.82 a	4.50 ab	4.20 a	3.28 a	4.17 a	3.72 a	4.40 a	4.58 a	3.64 b	4.31 a	4.38 a	4.37 a
Seed yield - pods $L_{<5cm}$ (g/pl)	6.15	5.90 a	2.47 b	4.26 ab	4.09 ab	5.95 a	5.62 a	3.28 b	4.79 ab	2.98 b	4.37 ab	5.0 a	3.97 a	4.45 a	3.48 a	3.79 a
Seed number - pods $L_{<5cm}$ (per pl)	1394	1333 a	1155 a	1086 a	1079 a	1562 a	1438 a	1088 a	1265 a	904 a	1126 a	1222 a	1224 a	1100 a	927 a	1029 a
TSW - pods $L_{<5cm}$ (g)	4.42	4.57 a	2.38 b	3.90 a	3.74 ab	3.91 a	3.93 a	3.08 a	3.76 a	3.44 a	3.85 a	4.07 a	3.29 b	4.05 a	3.76 ab	3.60 ab
Total seed yield (g/pl)	7.92	7.98 a	5.16 b	6.28 ab	7.07 ab	7.29 a	8.69 a	5.49 c	7.52 ab	6.69 bc	7.45 ab	7.11 ab	5.93 b	6.72 ab	6.97 ab	7.85 a
Total seed number (per pl)	1741	1735 a	1946 a	1552 a	1780 a	1875 a	2190 a	1792 a	1956 a	1921 a	1896 a	1686 a	1792 a	1625 a	1738 a	1965 a
Total TSW (g)	4.55	4.66 a	2.75 b	4.07 a	4.09 a	3.97 a	3.97 a	3.16 b	3.91 ab	3.59 ab	3.97 a	4.19 a	3.39 b	4.14 a	4.05 a	3.99 a
Fatty acids (%DW)	29.15	28.99 a	16.73 b	25.11 a	27.25 a	26.75 a	28.71 a	14.68 b	29.14 a	24.36 a	28.11 a	27.83 a	19.61 b	25.77 a	26.55 a	29.12 a
UFA (%DW)	26.74	26.55 a	14.87 b	22.97 a	24.66 a	24.29 a	26.23 a	12.92 b	26.64 a	21.97 a	25.56 a	25.52 a	17.54 b	23.55 a	24.05 a	26.60 a
SFA (%DW)	2.41	2.43 ab	1.86 c	2.14 bc	2.59 a	2.46 ab	2.48 a	1.76 b	2.50 a	2.39 a	2.55 a	2.31 ab	2.07 b	2.21 ab	2.50 a	2.52 a
ω6:ω3 ratio	1.72	1.72 b	2.51 a	1.70 b	2.13 b	1.91 b	1.76 cd	2.57 a	1.68 d	2.29 b	1.88 c	1.68 c	2.32 a	1.68 c	2.06 b	1.84 bc
C concentration (%DW)	48.5	47.2 a	45.2 a	47.6 a	47.3 a	47.9 a	44.2 c	44.8 bc	49.0 a	46.2 abc	47.8 ab	50.2 a	44.9 b	47.8 ab	47.2 ab	47.5 ab
N concentration (%DW)	3.21	3.11 b	4.00 a	3.71 ab	3.51 ab	3.51 ab	3.26 b	4.37 a	3.18 b	3.59 b	3.45 b	3.62 ab	3.91 a	3.69 ab	3.59 ab	3.21 b
S concentration (%DW)	0.35	0.33 a	0.49 a	0.38 a	0.39 a	0.37 a	0.33 b	0.43 a	0.34 b	0.36 b	0.36 b	0.35 ab	0.43 a	0.38 ab	0.36 ab	0.32 b
Protein (mg/g DW)	176.7	170.8 b	220.3 a	204.1 ab	192.9 ab	193.3 ab	179.3 b	240.5 a	174.9 b	197.3 ab	189.6 ab	199.0 ab	215.2 a	203.0 ab	197.4 ab	176.6 b
[Raff+stach] : suc ratio	0.41	0.39 a	0.2 b	0.35 a	0.32 a	0.33 a	0.37 b	0.2 d	0.46 a	0.26 cd	0.31 bc	0.31 ab	0.25 b	0.37 a	0.28 ab	0.33 ab
ABA:GA3 ratio	0.67	1.21 ab	2.09 a	0.87 ab	0.63 b	0.24 b	0.31 b	1.68 a	0.66 b	0.79 ab	0.79 ab	0.25 a	0.99 a	0.75 a	0.53 a	0.28 a

Annexe 7 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2022 EEB (Chapitre 4.1., cont.)

SD, Table 2 (Chap. 4.1.) : Values of each Mother-modality x Progeny-modality combination for the measured variables in the Low Sulphur condition. Letters indicate the ranking among Progeny-modalities for a given Mother-modality (mean pairwise comparison test, LSD test). TSW: Thousand Seed Weight, DW: dry weight, FA: fatty acid, UFA: unsaturated FA, SFA: saturated FA, C: carbon, N: nitrogen, S: Sulphur, ABA: abscisic acid, GA3: gibberellic acid.

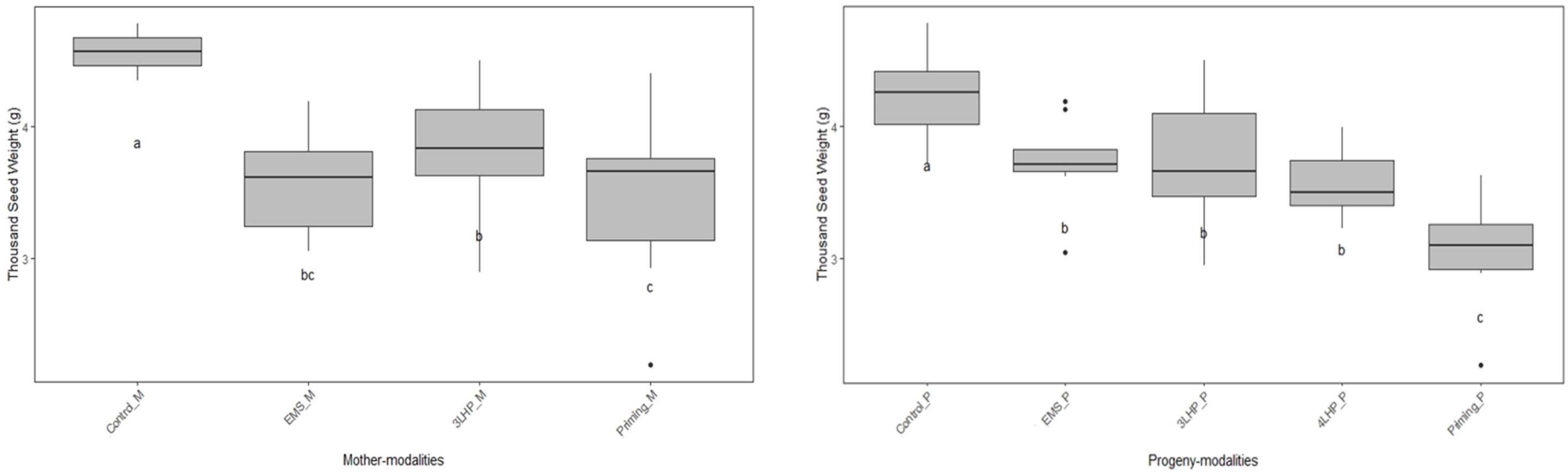
Mother-modalities	**Control**	**Priming**					**EMS**					**3LHP**				
Progeny-modalities	**Control**	**Control**	**Priming**	**EMS**	**4LHP**	**3LHP**	**Control**	**Priming**	**EMS**	**4LHP**	**3LHP**	**Control**	**Priming**	**EMS**	**4LHP**	**3LHP**
Seed yield - pods $L_{\geq 5cm}$ (g/pl)	2.29	2.48 a	2.88 a	3.54 a	3.01 a	3.17 a	2.50 abc	1.32 c	2.36 bc	3.02 ab	3.69 a	2.02 a	2.22 a	2.72 a	2.90 a	2.84 a
Seed number - pods $L_{\geq 5cm}$ (per pl)	465	574 a	862 a	871 a	818 a	844 a	593 bc	400 c	629 bc	805 ab	1063 a	434 a	689 a	696 a	771 a	631 a
TSW - pods $L_{\geq 5cm}$ (g)	4.92	4.60 a	3.40 b	4.06 ab	3.77 ab	3.96 ab	4.30 a	3.32 b	3.79 ab	3.94 ab	3.49 ab	4.80 a	3.35 b	4.10 ab	3.89 ab	4.57 a
Seed yield - pods $L_{<5cm}$ (g/pl)	4.78	5.16 a	3.16 a	3.01 a	3.9 a	4.29 a	4.58 a	3.87 a	3.33 a	3.88 a	3.48 a	5.16 a	3.48 a	3.35 a	3.30 a	3.32 a
Seed number - pods $L_{<5cm}$ (per pl)	1087	1310 a	1392 a	887 a	1165 a	1364 a	1222 a	1206 a	940 a	1161 a	1000 a	1238 a	1037 a	928 a	930 a	827 a
TSW - pods $L_{<5cm}$ (g)	4.40	3.93 a	2.35 c	3.39 ab	3.37 ab	2.98 bc	3.73 a	3.21 a	3.57 a	3.36 a	3.53 a	4.16 a	3.23 d	3.07 bc	3.48 cd	4.03 ab
Total seed yield (g/pl)	7.07	7.65 a	6.05 a	6.55 a	6.92 a	7.46 a	7.08 a	5.19 c	5.69 bc	6.90 ab	7.18 a	7.18 a	5.56 b	6.20 ab	6.20 ab	6.17 ab
Total seed number (per pl)	1552	1884 ab	2255 a	1759 b	1983 ab	2208 a	1815 a	1607 a	1570 a	1966 a	2063 a	1672 a	1727 a	1624 a	1701 a	1459 a
Total TSW (g)	4.57	4.09 a	2.70 c	3.72 ab	3.52 ab	3.36 b	3.90 a	3.24 b	3.65 ab	3.56 ab	3.50 ab	4.29 a	3.25 c	3.86 ab	3.66 bc	4.24 a
Fatty acids (%DW)	29.83	29.40 a	17.64 b	25.58 a	26.14 a	30.70 a	30.12 a	16.87 c	23.60 b	24.16 b	27.22 ab	31.51 a	16.12 c	25.09 b	23.80 b	28.91 ab
UFA (%DW)	27.39	26.91 a	15.71 b	23.33 a	23.54 a	27.90 a	27.61 a	15.00 c	21.45 b	21.72 b	24.80 ab	28.86 a	14.17 c	22.87 b	21.36 b	26.28 ab
SFA (%DW)	2.44	2.49 ab	1.93 c	2.25 bc	2.60 ab	2.80 a	2.51 a	1.87 c	2.16 bc	2.43 ab	2.42 ab	2.65 a	1.95 b	2.22 ab	2.44 a	2.63 a
ω6:ω3 ratio	1.73	1.78 b	2.61 a	1.78 b	2.36 a	1.92 b	1.75 c	2.65 a	1.85 c	2.42 b	1.93 c	1.80 b	2.62 a	1.76 b	2.47 a	2.04 a
C concentration (%DW)	45.43	45.99 a	43.41 ab	42.60 b	45.37 ab	45.41 ab	45.43 a	42.34 b	45.42 a	44.54 ab	45.82 a	45.59 a	41.52 b	44.29 a	44.09 a	45.59 a
N concentration (%DW)	3.48	3.19 ab	3.61 a	3.60 a	3.54 ab	3.13 b	3.46 a	3.77 a	3.59 a	3.61 a	3.48 a	3.36 c	3.90 a	3.67 abc	3.79 ab	3.44 bc
S concentration (%DW)	0.34	0.28 a	0.28 a	0.26 a	0.29 a	0.26 a	0.36 a	0.29 ab	0.23 b	0.31 a	0.32 a	0.27 a	0.31 a	0.26 a	0.32 a	0.27 a
Protein (mg/g DW)	191.1	175.4 ab	198.3 a	197.8 a	194.7 ab	171.8 b	190.0 a	207.2 a	197.4 a	198.8 a	191.2 a	184.6 c	214.8 a	201.9 abc	208.2 ab	189.2 bc
[Raff+stach] : suc ratio	0.33	0.32 ab	0.21 d	0.34 a	0.24 cd	0.27 bc	0.35 a	0.19 c	0.26 b	0.22 bc	0.27 b	0.29 ab	0.18 c	0.34 a	0.23 bc	0.27 ab
ABA:GA3 ratio	1.21	0.88 ab	0.27 b	0.22 b	0.26 b	1.23 a	0.90 a	0.32 ab	0.27 b	0.29 b	0.36 ab	0.47 a	0.31 a	0.19 a	0.24 a	1.13 a

Annexe 7 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2022 EEB (Chapitre 4.1., cont.)

SD, Table 3 (Chap. 4.1.) : Yield components distinguishing the two pools of pods (i.e. podsL< 5cm and podsL≥ 5cm at the beginning of the temperature stress application). Results are presented by factor (Progeny-modality and Mother-modality) under Low Sulphur condition. For a given variable, different letters (Tukey multiple comparisons test) indicate the ranking among Progeny or Mother modalities (including the control). P-values and levels of significance are given for Progeny, Mother and Progeny x Mother interaction effects. Levels of significance: ns non-significant, p<0.05*, p<0.01**, p<0.001***. SE: standard error, TSW: Thousand Seed Weight.

	Total pods			**Pods L < 5cm**			**Pods L ≥ 5cm**		
Factor\Variables	**Yield (g.pl^{-1})**	**Seed number**	**TSW (g)**	**Yield (g.pl^{-1})**	**Seed number**	**TSW (g)**	**Yield (g.pl^{-1})**	**Seed number**	**TSW (g)**
Progeny-modalities									
Control	7.25 a	1731 ns	4.21 a	4.92 a	1214 ns	4.06 a	2.32 ns	516 ns	4.65 a
Early mild stress	6.15 bc	1651 ns	3.74 b	3.27 b	918 ns	3.56 b	2.87 ns	732 ns	3.98 b
3 late heat peaks	6.93 ab	1909 ns	3.70 b	3.70 ab	1063 ns	3.52 b	3.23 ns	845 ns	4.00 b
4 late heat peaks	6.67 abc	1883 ns	3.58 b	3.70 ab	1085 ns	3.40 bc	2.98 ns	798 ns	3.87 b
Priming	5.60 c	1862 ns	3.06 c	3.46 b	1212 ns	2.93 c	2.14 ns	650 ns	3.35 b
se	*0.26*	*103*	*0.11*	*0.31*	*91*	*0.13*	*0.30*	*96*	*0.16*
Mother-modalities									
Control	7.07 ns	1552 b	4.57 a	4.78 ns	1087 ns	4.42 a	2.29 ns	465 ns	4.92 ns
Early mild stress	6.41 ns	1804 ab	3.57 bc	3.83 ns	1106 ns	3.48 bc	2.58 ns	697 ns	3.77 ns
3 late heat peaks	6.26 ns	1636 b	3.86 b	3.72 ns	992 ns	3.72 b	2.54 ns	644 ns	4.14 ns
Priming	6.93 ns	2017 a	3.47 c	3.91 ns	1223 ns	3.21 c	3.02 ns	793 ns	3.96 ns
se	*0.39*	*100*	*0.11*	*0.47*	*116*	*0.11*	*0.30*	*82*	*0.13*
Progeny effect	**0.001** **	0.268	**0.000** ***	**0.014** *	0.113	**0.000** ***	0.143	0.254	**0.001** **
Mother effect	0.081	**0.002** **	**0.006** **	0.886	0.094	**0.001** **	0.366	0.426	0.177
Progeny x Mother	0.807	0.206	0.251	0.877	0.787	0.154	0.722	0.659	0.793

Annexe 7 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2022 EEB (Chapitre 4.1., cont.)



SD, Figure 1 (Chap. 4.1.) : Boxplot to the Thousand Seed Weight (TSW) criteria measured in seeds from total pods under Low Sulphur condition. The TSW is the most important yield component impacted significantly by both Mother and Progeny modalities. Letters indicate the ranking amongst all the treatments (including the control). P-values and levels of significance are given on Supplemental Data (SD, Table 3 (Chap. 4.1.)). EMS: Early Mil Stress modality, 3LHP: 3 late heat peaks modality, 4LHP: 4 late heat peaks modality.

Annexe 7 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2022 EEB (Chapitre 4.1., cont.)

SD, Table 4 (Chap. 4.1.) : Nutritional seed quality criteria measured in seeds from pods$_{L \geq 5cm}$. Results are presented by factor (Progeny-modality and Mother-modality) under Low Sulphur condition. For a given measured variable, different letters (Tukey multiple comparisons test) indicate the ranking among Progeny or Mother modalities (including the control). P-values and levels of significance are given for Progeny, Mother and Progeny x Mother interaction effects. Levels of significance: ns non-significant, *p<0.05*, p<0.01**, p<0.001****. SE: standard error, DW: dry weight, FA: fatty acid, UFA: unsaturated FA, SFA: saturated FA.

	Seed C, S, N and protein concentrations (%DW)				**Oil content and fatty acids (%DW)**			
Factor\Variables	**Carbon**	**Sulphur**	**Nitrogen**	**Protein (mg.g^{-1})**	**FA**	**SFA**	**UFA**	**ω6:ω3 ratio**
Progeny-modalities								
Control	45.61 a	0.31 a	3.37 b	185.29 b	30.22 a	2.52 a	27.69 a	1.76 d
Early mild stress	44.10 ab	0.25 b	3.62 ab	199.04 ab	24.76 b	2.21 b	22.55 b	1.79 cd
3 late heat peaks	45.61 a	0.28 ab	3.35 b	184.06 b	28.94 a	2.62 a	26.33 a	1.96 c
4 late heat peaks	44.65 a	0.31 a	3.65 ab	200.57 ab	24.70 b	2.49 a	22.21 b	2.41 b
Priming	42.43 b	0.29 ab	3.76 a	206.78 a	16.88 c	1.91 c	14.96 c	2.62 a
se	*0.40*	*0.01*	*0.08*	*4.57*	*0.85*	*0.06*	*0.78*	*0.04*
Mother-modalities								
Control	45.43 ns	0.34 ns	3.48 ns	191.12 ns	29.83 ns	2.44 ns	27.39 ns	1.73 ns
Early mild stress	44.71 ns	0.30 ns	3.58 ns	196.94 ns	24.40 ns	2.28 ns	22.12 ns	2.12 ns
3 late heat peaks	44.22 ns	0.28 ns	3.62 ns	199.74 ns	25.08 ns	2.38 ns	22.71 ns	2.14 ns
Priming	44.56 ns	0.27 ns	3.41 ns	187.60 ns	25.89 ns	2.41 ns	23.48 ns	2.09 ns
se	*0.57*	*0.01*	*0.11*	*6.04*	*1.33*	*0.08*	*1.25*	*0.08*
Progeny effect	**0.000** ***	**0.017** *	**0.004** **	**0.004** ***	**0.000** ***	**0.000** ***	**0.000** ***	**0.000** ***
Mother effect	0.584	0.170	0.069	0.067	0.394	0.243	0.407	0.703
Progeny x Mother	0.262	0.231	0.950	0.950	0.915	0.848	0.915	0.983

Annexe 7 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2022 EEB (Chapitre 4.1., cont.)

SD, Table 5 (Chap. 4.1.) : Seed physiological quality values measured in seeds from pods$_{L \geq 5cm}$. Results are presented by factor (Progeny-modality and Mother-modality) under Low Sulphur condition. For a given measured variable, different letters (Tukey multiple comparisons test) indicate the ranking Progeny or Mother modalities (including the control). P-values and levels of significance are given for Progeny, Mother and Progeny x Mother interaction effects. Levels of significance: ns non-significant, *p<0.05*, p<0.01**, p<0.001****. SE: standard error, DW: dry weight, ABA: abscisic acid, GA3: gibberellic acid.

	Soluble sugars				Hormones
Factor\Variables	**Sucrose (%DW)**	**Raffinose (%DW)**	**Stachyose (%DW)**	**[Raffinose+stachyose] : sucrose ratio**	**ABA:GA3 ratio**
Progeny-modalities					
Control	3.75 b	0.16 a	1.03 a	0.32 a	0.87 a
Early mild stress	3.59 b	0.17 a	0.64 a	0.31 a	0.24 a
3 late heat peaks	4.78 a	0.18 a	1.12 a	0.27 ab	0.91 a
4 late heat peaks	4.65 a	0.15 ab	0.93 a	0.23 bc	0.27 a
Priming	3.35 b	0.13 b	0.52 b	0.19 c	0.30 a
se	*0.16*	*0.01*	*0.05*	*0.01*	*0.10*
Mother-modalities					
Control	3.69 ns	0.17 ns	1.05 ns	0.33 ns	1.21 ns
Early mild stress	3.89 ns	0.15 ns	0.84 ns	0.25 ns	0.43 ns
3 late heat peaks	4.17 ns	0.16 ns	0.92 ns	0.26 ns	0.53 ns
Priming	4.03 ns	0.15 ns	0.96 ns	0.28 ns	0.60 ns
se	*0.20*	*0.01*	*0.08*	*0.02*	*0.29*
Progeny effect	**0.000** ***	**0.000** ***	**0.000** ***	**0.000** ***	**0.005** **
Mother effect	0.334	0.388	0.133	0.212	0.596
Progeny x Mother	0.068	0.477	0.853	0.129	0.362

Annexe 7 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2022 EEB (Chapitre 4.1., cont.)

SD, Table 6 (Chap. 4.1.) : Values of each Mother-modality x Progeny-modality combination for the germination variables in the High Sulphur condition. Letters indicate the ranking among Progeny-modalities for a given Mother-modality (mean pairwise comparison test, LSD test). T25, T50 and T75 represent respectively the time (in hours) for 25%, 50% and 75% of germinated seeds, as adjusted from the observations with the Gompertz functions. Final rate is the observed final rate (in percentage). EMS: Early Mil Stress modality, 3LHP: 3 late heat peaks modality, 4LHP: 4 late heat peaks modality.

Mother-modalities		**Control**	**Priming**					**EMS**					**3LHP**				
Progeny-modalities		**Control**	**Control**	**Priming**	**EMS**	**4LHP**	**3LHP**	**Control**	**Priming**	**EMS**	**4LHP**	**3LHP**	**Control**	**Priming**	**EMS**	**4LHP**	**3LHP**
25°C	T25 (h)	14.1	15.3 a	14.3 a	13.8 a	13.4 a	13.4 a	15.8 a	12.0 c	14.5 ab	13.0 bc	14.3 ab	13.6 a	12.1 a	11.8 a	13.1 a	14.8 a
	T50 (h)	16.8	17.3 a	16.5 ab	16.5 ab	15.4 ab	14.9 b	17.3 a	14.5 c	16.7 ab	15.0 bc	15.9 abc	15.2 a	15.6 a	14.2 a	15.1 a	16.1 a
	T75 (h)	20.6	21.2 a	19.8 ab	20.0 ab	17.9 bc	16.9 c	19.2 a	17.9 a	19.6 a	17.5 a	17.9 a	15.2 a	15.6 a	14.2 a	15.1 a	16.1 a
	Final rate (%)	97	91 b	91 b	100 a	98 a	98 a	87 b	95 ab	100 a	99 a	98 a	99 a	95 b	99 a	99 a	100 a
5°C	T25 (h)	95.6	95.5 a	84.6 a	84.3 a	98.6 a	93.1 a	107.0 a	82.9 a	85.4 a	94.9 a	99.5 a	91.0 ab	70.3 b	76.0 b	107.7 a	106.5 a
	T50 (h)	111.4	111.8 a	111.7 a	102.6 a	113.6 a	105.7 a	118.9 a	103.4 a	105.4 a	105.9 a	111.9 a	103.7 ab	99.0 ab	88.7 b	117.5 a	116.6 a
	T75 (h)	133.4	134.6 a	147.3 a	126.6 a	132.7 a	121.8 a	134.9 a	131.8 a	130.8 a	119.8 a	128.0 a	121.6 ab	138.9 a	105.0 b	130.7 a	129.4 a
	Final rate (%)	96	98 a	96 a	98 a	99 a	99 a	99 a	93 b	99 a	100 a	100 a	98 a	94 a	99 a	97 a	99 a

Annexe 7 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2022 EEB (Chapitre 4.1., cont.)

SD, Table 7 (Chap. 4.1.) : Germination variables measured at optimal (25◦C) and suboptimal (5◦C) temperatures. Results are presented by factor (Progeny-modality and Mother-modality) under Low Sulphur condition. T25, T50 and T75 represent respectively the time (in hours) for 25%, 50% and 75% of germinated seeds, as adjusted from the observations with the Gompertz functions. Final rate is the observed final rate (in percentage). For a given measured variable, different letters (Tukey multiple comparisons test) indicate the ranking Progeny or Mother modalities (including the control). P-values and levels of significance are given for Progeny, Mother and Progeny x Mother interaction effects. Levels of significance: ns non-significant, *p<0.05*, p<0.01**, p<0.001****. SE: standard error.

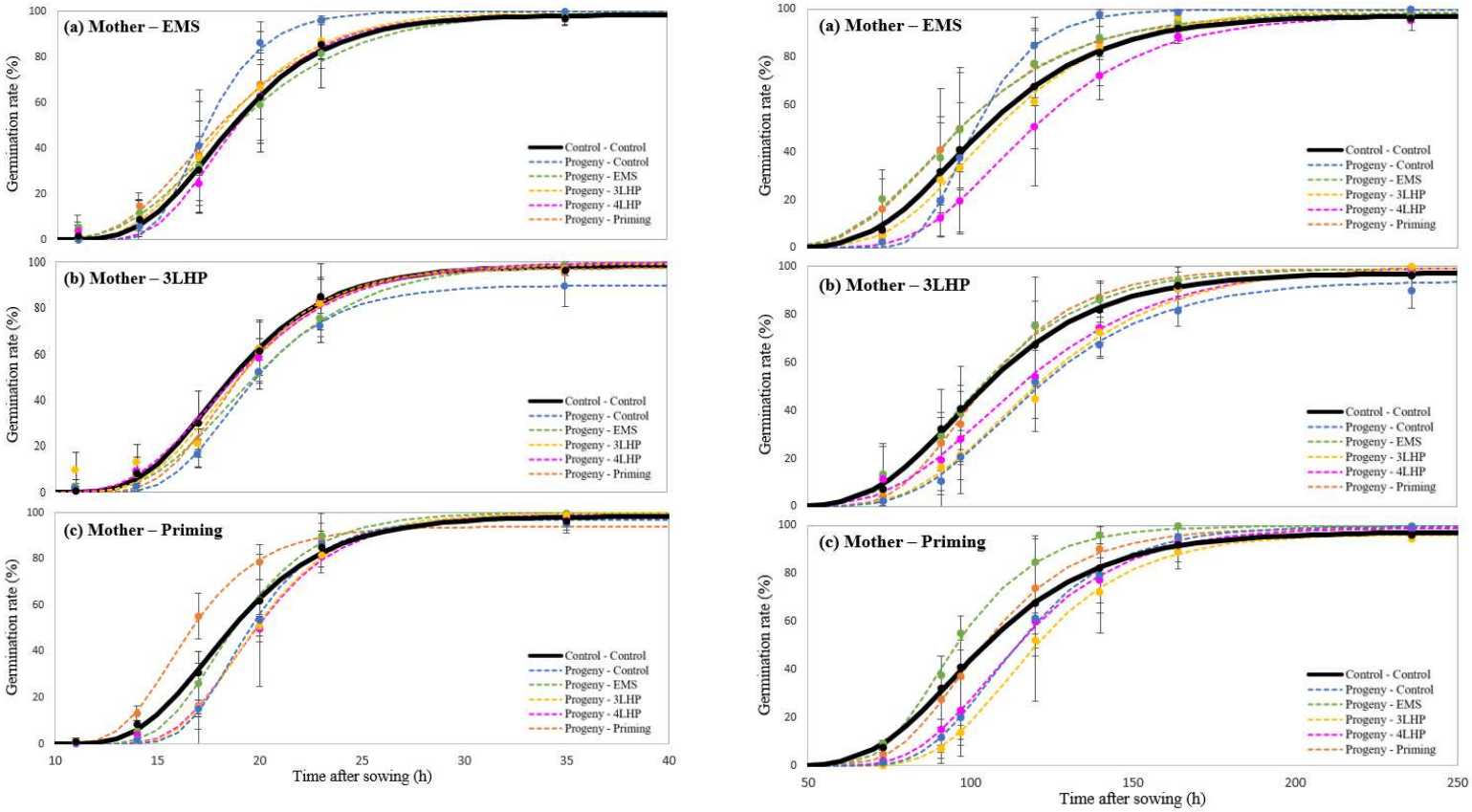
	Germination at 25°C				**Germination at 5°C**			
Factor\Variables	**T25 (h)**	**T50 (h)**	**T75 (h)**	**Final rate (%)**	**T25 (h)**	**T50 (h)**	**T75 (h)**	**Final rate (%)**
Progeny-modalities								
Control	17.2 ns	18.8 ns	21.1 ns	95 ns	97.2 ab	110.6 ab	128.7 abc	98 ns
Early mild stress	16.8 ns	19.1 ns	22.1 ns	98 ns	83.7 b	98.3 b	117.1 c	99 ns
3 late heat peaks	16.8 ns	19.1 ns	21.8 ns	98 ns	100.3 a	116.3 a	136.9 ab	99 ns
4 late heat peaks	16.9 ns	19.1 ns	21.9 ns	97 ns	98.8 a	115.9 a	138.2 a	98 ns
Priming	15.8 ns	18.0 ns	20.8 ns	96 ns	88.2 ab	101.7 ab	119.3 bc	99 ns
se	*0.4*	*0.4*	*0.6*	*0.9*	*3.5*	*3.6*	*4.3*	*0.5*
Mother-modalities								
Control	16.7 ns	18.5 ns	20.8 a	96 ns	89.8 ns	104.3 ns	123.8 a	98 ns
Early mild stress	16.2 ns	18.3 ns	20.9 a	98 ns	90.7 ns	104.7 ns	123.1 a	98 ns
3 late heat peaks	16.9 ns	19.4 ns	22.6 a	96 ns	95.1 ns	112.4 ns	135.0 a	99 ns
Priming	17.1 ns	18.9 ns	21.3 a	97 ns	96.6 ns	109.8 ns	127.1 a	99 ns
se	*0.6*	*0.6*	*0.7*	*1.2*	*4.3*	*2.5*	*6.1*	*0.5*
Progeny effect	0.172	0.261	0.577	0.075	**0.009** **	**0.003** **	**0.002** **	0.936
Mother effect	0.116	0.060	**0.047** *	0.262	0.346	0.182	**0.046** *	0.379
Progeny x Mother	0.250	0.166	0.333	0.114	0.959	0.772	0.259	**0.016** *

Annexe 7 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2022 EEB (Chapitre 4.1., cont.)

SD, Table 8 (Chap. 4.1.) : Values of each Mother-modality x Progeny-modality combination for the germination variables in the Low Sulphur condition. Letters indicate the ranking among Progeny-modalities for a given Mother-modality (mean pairwise comparison test, LSD test). T25, T50 and T75 represent respectively the time (in hours) for 25%, 50% and 75% of germinated seeds, as adjusted from the observations with the Gompertz functions. Final rate is the observed final rate (in percentage). EMS: Early Mil Stress modality, 3LHP: 3 late heat peaks modality, 4LHP: 4 late heat peaks modality.

Mother-modalities		**Control**	**Priming**					**EMS**					**3LHP**				
Progeny-modalities		**Control**	**Control**	**Priming**	**EMS**	**4LHP**	**3LHP**	**Control**	**Priming**	**EMS**	**4LHP**	**3LHP**	**Control**	**Priming**	**EMS**	**4LHP**	**3LHP**
25°C	T25 (h)	16.7	18.2 a	14.9 b	16.9 ab	17.7 a	17.3 a	16.1 a	15.2 a	16.4 a	16.7 a	16.3 a	17.7 a	17.2 a	17.1 a	16.3 a	16.5 a
	T50 (h)	18.5	19.5 a	16.7 b	18.7 a	19.8 a	19.8 a	17.3 a	18.1 a	18.9 a	18.7 a	18.1 a	19.8 a	19.1 a	19.7 a	18.8 a	19.2 a
	T75 (h)	20.8	21.3 ab	19.3 b	21.0 ab	22.4 a	22.3 a	18.9 a	21.5 a	22.2 a	21.4 a	20.5 a	23.3 a	21.7 a	23.0 a	22.1 a	22.7 a
	Final rate (%)	96	95 b	95 b	100 a	99 ab	99 ab	100 a	97 a	97 a	97 a	99 a	90 b	96 ab	99 a	98 ab	97 ab
5°C	T25 (h)	89.9	104.9 a	90.5 ab	83.9 b	99.1 ab	104.5 a	92.8 a	82.2 a	80.8 a	101.5 a	96.1 a	101.2 a	91.9 a	86.5 a	95.9 a	100.2 a
	T50 (h)	104.3	115.3 a	103.8 ab	95.8 b	114.3 ab	120.3 a	101.7 a	96.6 a	97.2 a	119.2 a	108.9 a	121.2 a	104.9 a	101.9 a	114.5 a	119.7 a
	T75 (h)	123.8	128.6 ab	120.9 ab	110.8 b	133.8 a	141.3 a	113.1 b	115.7 b	118.8 ab	142.7 a	125.2 ab	149.4 a	121.4 b	121.8 b	138.1 ab	144.4 a
	Final rate (%)	98	100 a	99 a	100 a	99 a	98 b	100 a	99 a	98 a	97 a	100 a	97 b	100 a	100 a	100 a	100 a

Annexe 7 : Supplemental data de l'article Magno et al. 2022 EEB (Chapitre 4.1., cont.)



SD, Figure 2 (Chap. 4.1.) : Germination time courses at 25◦C (left) and 5◦C (right) under Low Sulphur condition. Each graph represents one Mother-modality and each curb represents one Progeny-modality. Lines are fittings to a Gompertz function. Vertical bars denote standard errors. P-values of the germination time courses (T25, T50 and T75) and final germination rates are given in Supplemental Data (SD, Table 7 and 8). EMS: Early Mil Stress modality, 3LHP: 3 late heat peaks modality, 4LHP: 4 late heat peaks modality.

Annexe 8 : Variables, paramètres et équations de la version publiée de 2015 du modèle SuMoToRI (Brunel-Muguet et al., 2015b).

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

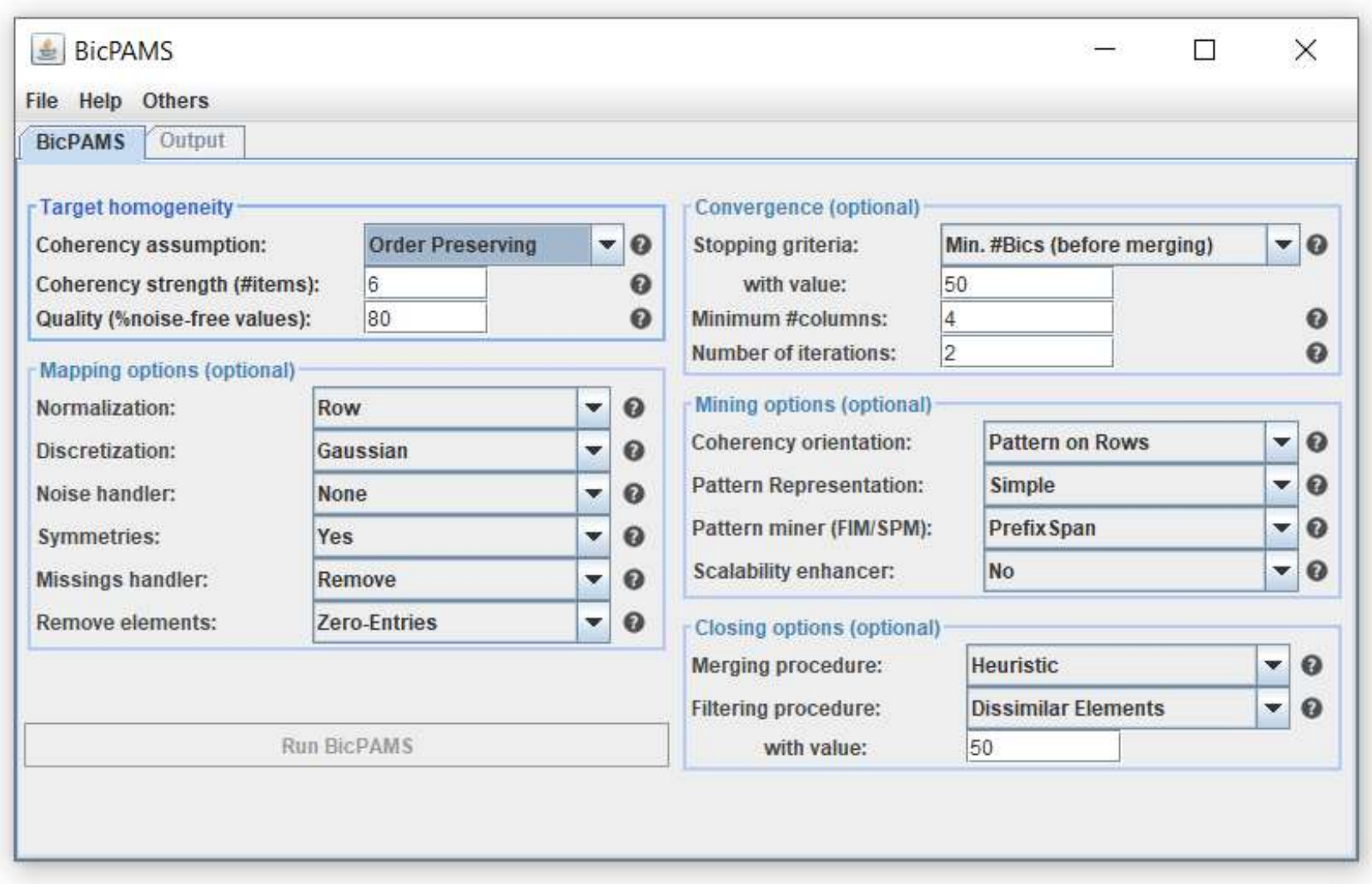
Annexe 8 : Variables, paramètres et équations de la version publiée de 2015 du modèle SuMoToRI (Brunel-Muguet et al., 2015b, cont.).

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

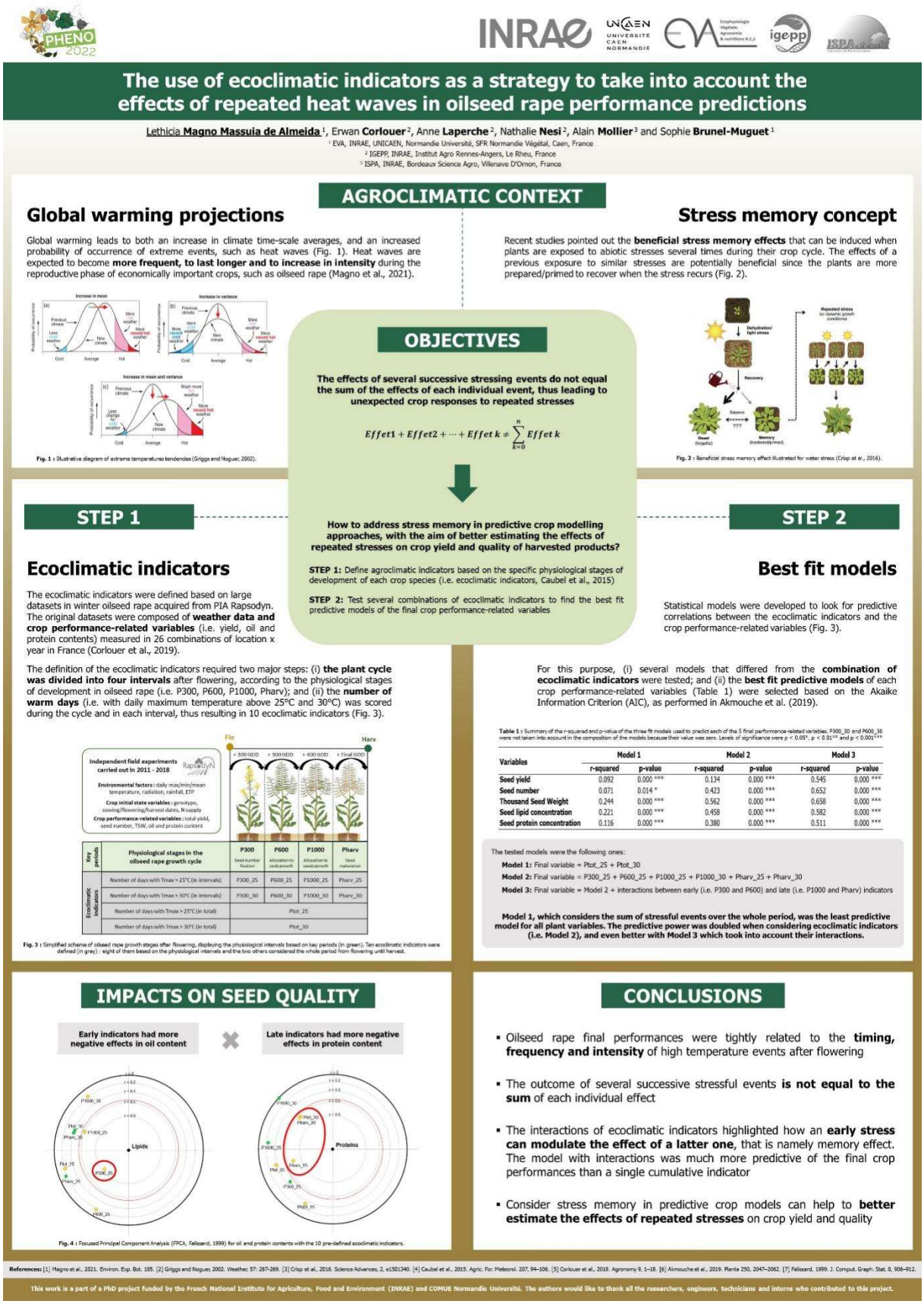
Annexe 8 : Variables, paramètres et équations de la version publiée de 2015 du modèle SuMoToRI (Brunel-Muguet et al., 2015b, cont.).

Process and symbol	Equation	Unit
C acquisition and plant offer	$dTDW_{ds}[t]=RUE\ PAR_i(1-e^{-k\ LAI_{BL}})$ with $PAR_{abs}= PARi(1-e^{-k\ LAI_{BL}})$	Eq 2
C allocation to leaves	$dLDW_{TOTpot}[t] = \beta\ dTDW[t]$	Eq 3
Growth S Demand		
α_{BL}	$dQS_{org\ BL}[t] = [S_{BL}]_{crit}[t]\ dLDW_{effective\ BL}[t]$	Eq 6
β_{BL}	$[S_{BL}]_{crit}[t] = \alpha_{BL}\ LDW_{effective\ BL}^{\beta BL}$	Eq 7
	$dQS_{org\ rest}[t] = [S_{rest}]_{crit}[t]\ dDW_{rest}[t]$	Eq 8
α_{rest}	$[S_{rest}]_{crit}[t] = \alpha_{rest}\ DW_{rest}^{\beta rest}$	Eq 9
β_{rest}		
Plant S offer	$dQS_{offer}[t] = dQS_{uptake}[t]+QS_{FL\ pot\ remob}[t]+QS_{mobile\ pool}[t]$	Eq 10
(i) S uptake	$\frac{dQS_{uptake}[t]}{dTT_i} = aQS\ bQS\ e^{bQS\ TTcum}$	Eq 5
(ii) S remobilization from fallen leaves	$QS_{FL\ pot\ remob}[t] = dLDW_{FL}[t]\ [S_{BL}]_{mobile}[t-1]$	Eq 11
	with $\frac{dLDW_{FL}[t]}{dTT_i} = (aLDW_{FL})\ (bLDW_{FL})\ e^{bLDW_{FL}\ TTcum}$	Eq 12
(iii) S mobile pool	$dQS_{mobile\ pool}[t]= \{dQS_{uptake}[t]+(QS_{FL\ pot\ remob}[t]-dQS_{FL\ mobile}[t])\}-(dQS_{org\ BL}[t]+dQS_{org\ rest}[t])$ with $dQS_{FL\ mobile}[t] = QS_{FL\ pot\ remob}[t]$ if $dQS_{uptake}[t]- dQS_{org\ TOT}[t] > 0$ or else $dQS_{FL\ mobile}[t] = QS_{FL\ pot\ remob}[t] + dQS_{uptake}[t]- dQS_{org\ TOT}[t]$	Eq 13 Eq 14
Leaf area expansion rate according to:		
(iv) Potential growth	$dLA_{TT} = \frac{LA_{max}\, n K^n \left(\frac{LAK^n}{LA_{max}-LA}\right)^{\frac{n-1}{n}}}{\left(K^n + \frac{LAK^n}{LA_{max}-LA}\right)^2}\ dTT_i$	Eq 1
(v) C offer and leaf C demand	$dLA_{carb} = dLDW_{TOTpot}\ SLA$	Eq 4
(vi) S offer and leaf growth demand	$dLA_S = SLA[t]\frac{dQSoffer[t]}{[SGL]crit[t]}$	Eq 15
Mobile S allocation to leaves and to the rest of the plant	$dQS_{mobile\ BL} = \varepsilon(t)\ dQS_{mobile\ pool}$ If $dQS_{uptake}[t]-dQS_{org\ TOT}[t] > 0.2\ dQS_{uptake}[t]$, then $\varepsilon(t) = \varepsilon_{opt}$ otherwise $\varepsilon(t) = 0.4\ \varepsilon_{opt}$	Eq 16
	$dQS_{mobile\ rest} = dQS_{mobile\ pool} - dQS_{mobile\ BL}$	Eq 17
Effective leaf area expansion	$dLA_{TOT\ effective} = \min(dLA_{TT}, dLA_{carb}, dLA_S)$ $dLDW_{TOT\ effective}[t] = \frac{dLA_{TOTeffective}[t]}{SLA[t]}$	Eq 18

Annexe 9 : Interface interactive du logiciel BicPAMS (Henriques and Madeira, 2014).



Annexe 10 : Ensemble des posters présentés lors des congrès nationaux et internationaux dans le cadre de la thèse (voir « Liste des activités scientifiques »).



The use of ecoclimatic indicators as a strategy to take into account the effects of repeated heat waves in oilseed rape performance predictions

Lethicia Magno Massuia de Almeida [1], Erwan Corlouer [2], Anne Laperche [2], Nathalie Nesi [2], Alain Mollier [3] and Sophie Brunel-Muguet [1]
[1] EVA, INRAE, UNICAEN, Normandie Université, SFR Normandie Végétal, Caen, France
[2] IGEPP, INRAE, Institut Agro Rennes-Angers, Le Rheu, France
[3] ISPA, INRAE, Bordeaux Science Agro, Villenave D'Ornon, France

AGROCLIMATIC CONTEXT

Global warming projections

Global warming leads to both an increase in climate time-scale averages, and an increased probability of occurrence of extreme events, such as heat waves (Fig. 1). Heat waves are expected to become **more frequent, to last longer and to increase in intensity** during the reproductive phase of economically important crops, such as oilseed rape (Magno et al., 2021).

Fig. 1 : Illustrative diagram of extreme temperatures tendencies (Griggs and Noguer, 2002).

Stress memory concept

Recent studies pointed out the **beneficial stress memory effects** that can be induced when plants are exposed to abiotic stresses several times during their crop cycle. The effects of a previous exposure to similar stresses are potentially beneficial since the plants are more prepared/primed to recover when the stress recurs (Fig. 2).

Fig. 2 : Beneficial stress memory effect illustrated for water stress (Crisp et al., 2016).

OBJECTIVES

The effects of several successive stressing events do not equal the sum of the effects of each individual event, thus leading to unexpected crop responses to repeated stresses

$$Effet1 + Effet2 + \cdots + Effet\,k \neq \sum_{k=0}^{n} Effet\,k$$

How to address stress memory in predictive crop modelling approaches, with the aim of better estimating the effects of repeated stresses on crop yield and quality of harvested products?

STEP 1: Define agroclimatic indicators based on the specific physiological stages of development of each crop species (i.e. ecoclimatic indicators, Caubel et al., 2015)

STEP 2: Test several combinations of ecoclimatic indicators to find the best fit predictive models of the final crop performance-related variables

STEP 1

Ecoclimatic indicators

The ecoclimatic indicators were defined based on large datasets in winter oilseed rape acquired from PIA Rapsodyn. The original datasets were composed of **weather data and crop performance-related variables** (i.e. yield, oil and protein contents) measured in 26 combinations of location x year in France (Corlouer et al., 2019).

The definition of the ecoclimatic indicators required two major steps: (i) **the plant cycle was divided into four intervals** after flowering, according to the physiological stages of development in oilseed rape (i.e. P300, P600, P1000, Pharv); and (ii) the **number of warm days** (i.e. with daily maximum temperature above 25°C and 30°C) was scored during the cycle and in each interval, thus resulting in 10 ecoclimatic indicators (Fig. 3).

Fig. 3 : Simplified scheme of oilseed rape growth stages after flowering, displaying the physiological intervals based on key periods (in green). Ten ecoclimatic indicators were defined (in gray) : eight of them based on the physiological intervals and the two others considered the whole period from flowering until harvest.

STEP 2

Best fit models

Statistical models were developed to look for predictive correlations between the ecoclimatic indicators and the crop performance-related variables (Fig. 3).

For this purpose, (i) several models that differed from the **combination of ecoclimatic indicators** were tested; and (ii) the **best fit predictive models** of each crop performance-related variables (Table 1) were selected based on the Akaike Information Criterion (AIC), as performed in Akmouche et al. (2019).

Table 1 : Summary of the r-squared and p-value of the three fit models used to predict each of the 5 final performance-related variables. P300_30 and P600_30 were not taken into account in the composition of the models because their value was zero. Levels of significance were $p < 0.05^{*}$, $p < 0.01^{**}$ and $p < 0.001^{***}$

Variables	Model 1		Model 2		Model 3	
	r-squared	p-value	r-squared	p-value	r-squared	p-value
Seed yield	0.092	0.000 ***	0.134	0.000 ***	0.545	0.000 ***
Seed number	0.071	0.014 *	0.423	0.000 ***	0.652	0.000 ***
Thousand Seed Weight	0.244	0.000 ***	0.562	0.000 ***	0.658	0.000 ***
Seed lipid concentration	0.221	0.000 ***	0.458	0.000 ***	0.582	0.000 ***
Seed protein concentration	0.116	0.000 ***	0.380	0.000 ***	0.511	0.000 ***

The tested models were the following ones:

Model 1: Final variable = Ptot_25 + Ptot_30

Model 2: Final variable = P300_25 + P600_25 + P1000_25 + P1000_30 + Pharv_25 + Pharv_30

Model 3: Final variable = Model 2 + interactions between early (i.e. P300 and P600) and late (i.e. P1000 and Pharv) indicators

Model 1, which considers the sum of stressful events over the whole period, was the least predictive model for all plant variables. The predictive power was doubled when considering ecoclimatic indicators (i.e. Model 2), and even better with Model 3 which took into account their interactions.

IMPACTS ON SEED QUALITY

Early indicators had more negative effects in oil content ✖ **Late indicators had more negative effects in protein content**

Fig. 4 : Focused Principal Component Analysis (FPCA, Felissard, 1999) for oil and protein contents with the 10 pre-defined ecoclimatic indicators.

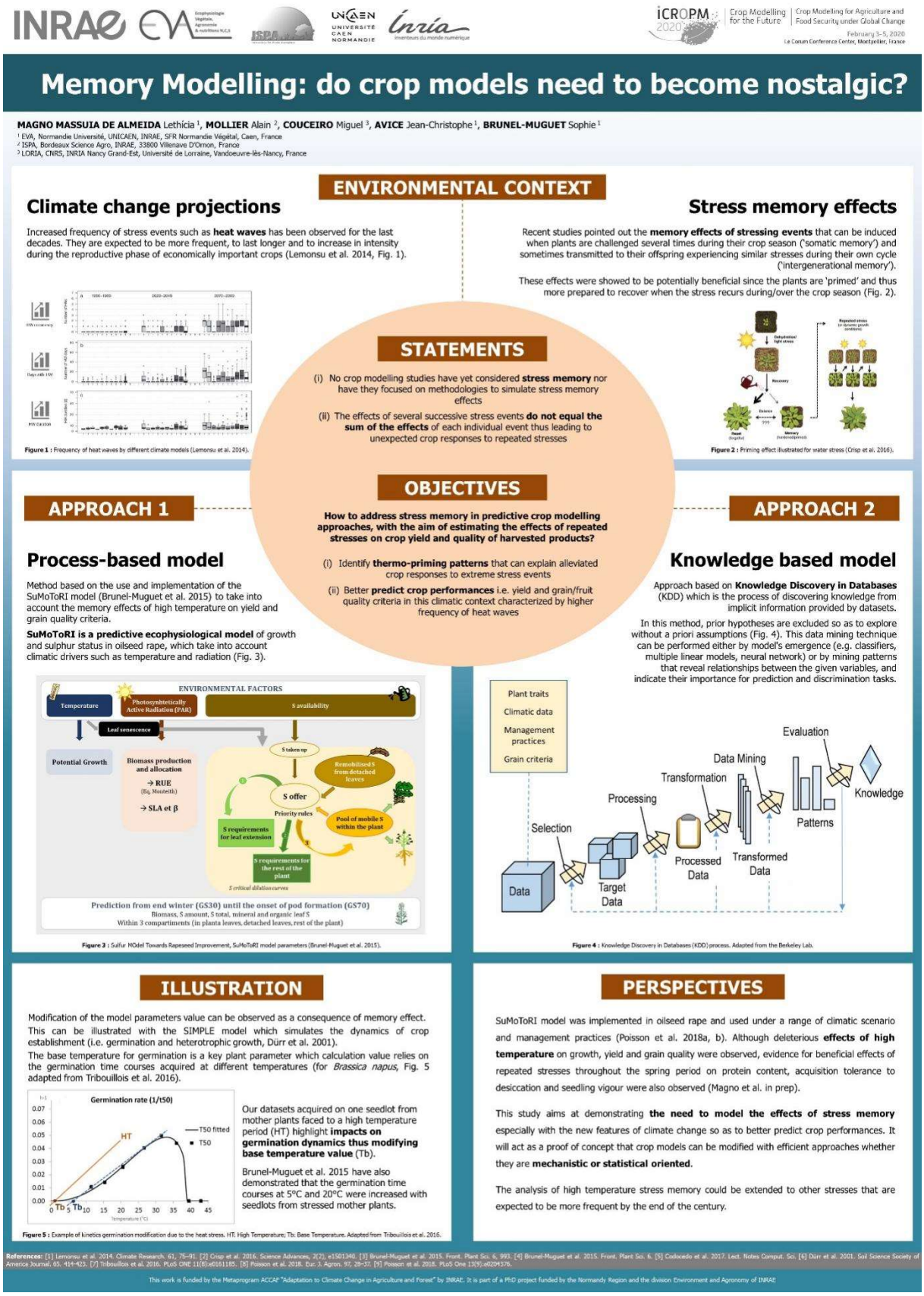
CONCLUSIONS

- Oilseed rape final performances were tightly related to the **timing, frequency and intensity** of high temperature events after flowering
- The outcome of several successive stressful events **is not equal to the sum** of each individual effect
- The interactions of ecoclimatic indicators highlighted how an **early stress can modulate the effect of a latter one**, that is namely memory effect. The model with interactions was much more predictive of the final crop performances than a single cumulative indicator
- Consider stress memory in predictive crop models can help to **better estimate the effects of repeated stresses** on crop yield and quality

References: [1] Magno et al., 2021. Environ. Exp. Bot. 185. [2] Griggs and Noguer, 2002. Weather, 57: 267-269. [3] Crisp et al., 2016. Science Advances, 2, e1501140. [4] Caubel et al., 2015. Agric. For. Meteorol. 207, 94–106. [5] Corlouer et al., 2019. Agronomy 9, 1–18. [6] Akmouche et al., 2019. Plante 250, 2047–2062. [7] Felissard, 1999. J. Comput. Graph. Stat. 8, 906–912.

This work is a part of a PhD project funded by the French National Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE) and COMUE Normandie Université. The authors would like to thank all the researchers, engineers, technicians and interns who contributed to this project.

Annexe 10 : Ensemble des posters présentés lors des congrès nationaux et internationaux dans le cadre de la thèse (voir « Liste des activités scientifiques », cont.).



INRAE EVA ISPA UNICAEN UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE Inria

iCROPM 2020 Crop Modelling for the Future | Crop Modelling for Agriculture and Food Security under Global Change
February 3–5, 2020
Le Corum Conference Center, Montpellier, France

Memory Modelling: do crop models need to become nostalgic?

MAGNO MASSUIA DE ALMEIDA Lethícia [1], **MOLLIER** Alain [2], **COUCEIRO** Miguel [3], **AVICE** Jean-Christophe [1], **BRUNEL-MUGUET** Sophie [1]
[1] EVA, Normandie Université, UNICAEN, INRAE, SFR Normandie Végétal, Caen, France
[2] ISPA, Bordeaux Science Agro, INRAE, 33800 Villenave D'Ornon, France
[3] LORIA, CNRS, INRIA Nancy Grand-Est, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

ENVIRONMENTAL CONTEXT

Climate change projections

Increased frequency of stress events such as **heat waves** has been observed for the last decades. They are expected to be more frequent, to last longer and to increase in intensity during the reproductive phase of economically important crops (Lemonsu et al. 2014, Fig. 1).

Figure 1 : Frequency of heat waves by different climate models (Lemonsu et al. 2014).

Stress memory effects

Recent studies pointed out the **memory effects of stressing events** that can be induced when plants are challenged several times during their crop season ('somatic memory') and sometimes transmitted to their offspring experiencing similar stresses during their own cycle ('intergenerational memory').

These effects were showed to be potentially beneficial since the plants are 'primed' and thus more prepared to recover when the stress recurs during/over the crop season (Fig. 2).

Figure 2 : Priming effect illustrated for water stress (Crisp et al. 2016).

STATEMENTS

(i) No crop modelling studies have yet considered **stress memory** nor have they focused on methodologies to simulate stress memory effects

(ii) The effects of several successive stress events **do not equal the sum of the effects** of each individual event thus leading to unexpected crop responses to repeated stresses

OBJECTIVES

How to address stress memory in predictive crop modelling approaches, with the aim of estimating the effects of repeated stresses on crop yield and quality of harvested products?

(i) Identify **thermo-priming patterns** that can explain alleviated crop responses to extreme stress events

(ii) Better **predict crop performances** i.e. yield and grain/fruit quality criteria in this climatic context characterized by higher frequency of heat waves

APPROACH 1

Process-based model

Method based on the use and implementation of the SuMoToRI model (Brunel-Muguet et al. 2015) to take into account the memory effects of high temperature on yield and grain quality criteria.

SuMoToRI is a predictive ecophysiological model of growth and sulphur status in oilseed rape, which take into account climatic drivers such as temperature and radiation (Fig. 3).

Figure 3 : Sulfur MOdel Towards Rapeseed Improvement, SuMoToRI model parameters (Brunel-Muguet et al. 2015).

APPROACH 2

Knowledge based model

Approach based on **Knowledge Discovery in Databases** (KDD) which is the process of discovering knowledge from implicit information provided by datasets.

In this method, prior hypotheses are excluded so as to explore without a priori assumptions (Fig. 4). This data mining technique can be performed either by model's emergence (e.g. classifiers, multiple linear models, neural network) or by mining patterns that reveal relationships between the given variables, and indicate their importance for prediction and discrimination tasks.

Figure 4 : Knowledge Discovery in Databases (KDD) process. Adapted from the Berkeley Lab.

ILLUSTRATION

Modification of the model parameters value can be observed as a consequence of memory effect. This can be illustrated with the SIMPLE model which simulates the dynamics of crop establishment (i.e. germination and heterotrophic growth, Dürr et al. 2001).

The base temperature for germination is a key plant parameter which calculation value relies on the germination time courses acquired at different temperatures (for *Brassica napus*, Fig. 5 adapted from Tribouillois et al. 2016).

Our datasets acquired on one seedlot from mother plants faced to a high temperature period (HT) highlight **impacts on germination dynamics thus modifying base temperature value** (Tb).

Brunel-Muguet et al. 2015 have also demonstrated that the germination time courses at 5°C and 20°C were increased with seedlots from stressed mother plants.

Figure 5 : Example of kinetics germination modification due to the heat stress. HT: High Temperature; Tb: Base Temperature. Adapted from Tribouillois et al. 2016.

PERSPECTIVES

SuMoToRI model was implemented in oilseed rape and used under a range of climatic scenario and management practices (Poisson et al. 2018a, b). Although deleterious **effects of high temperature** on growth, yield and grain quality were observed, evidence for beneficial effects of repeated stresses throughout the spring period on protein content, acquisition tolerance to desiccation and seedling vigour were also observed (Magno et al. in prep).

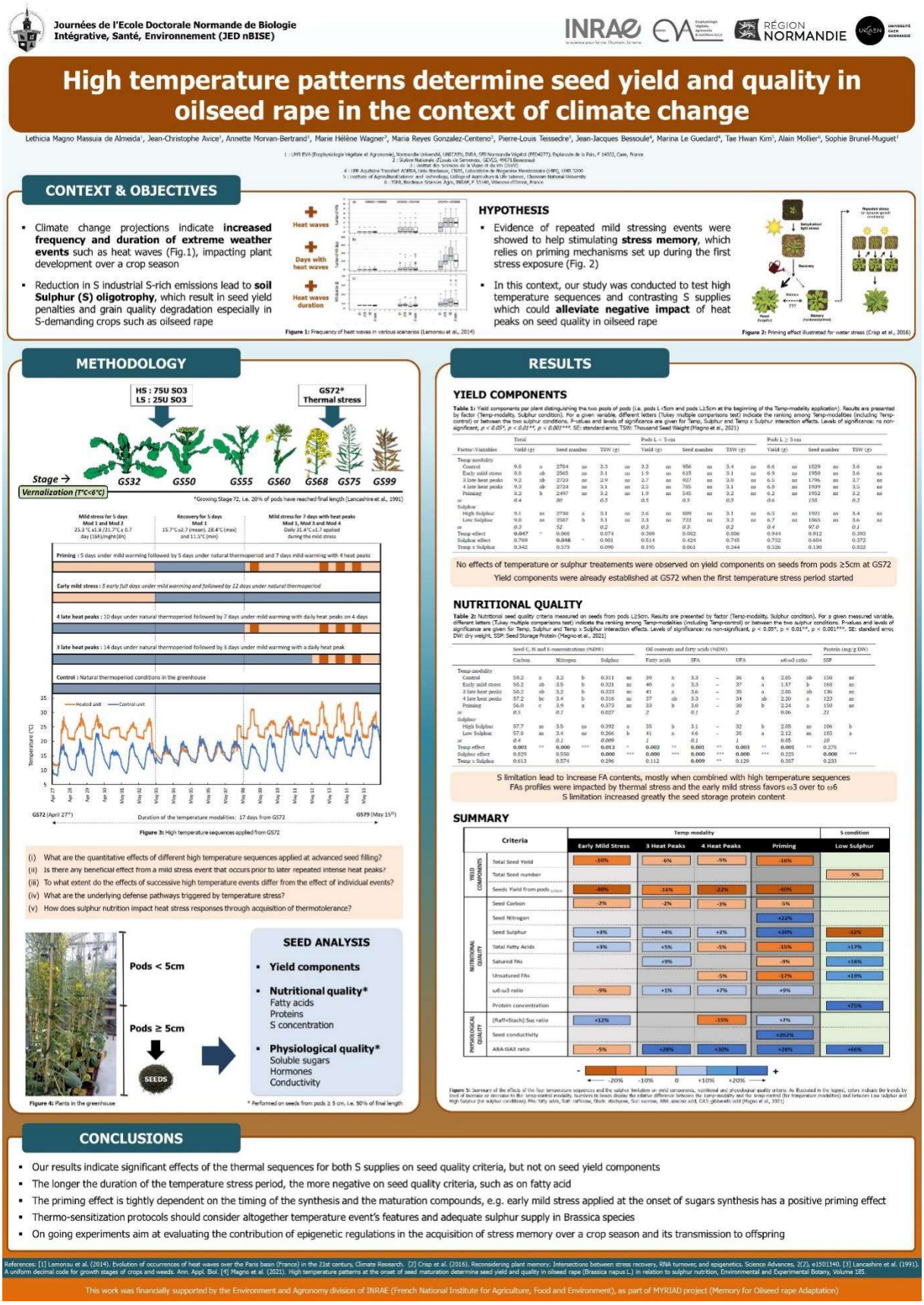
This study aims at demonstrating **the need to model the effects of stress memory** especially with the new features of climate change so as to better predict crop performances. It will act as a proof of concept that crop models can be modified with efficient approaches whether they are **mechanistic or statistical oriented**.

The analysis of high temperature stress memory could be extended to other stresses that are expected to be more frequent by the end of the century.

References: [1] Lemonsu et al. 2014. Climate Research. 61, 75–91. [2] Crisp et al. 2016. Science Advances, 2(2), e1501340. [3] Brunel-Muguet et al. 2015. Front. Plant Sci. 6, 993. [4] Brunel-Muguet et al. 2015. Front. Plant Sci. 6. [5] Codocedo et al. 2017. Lect. Notes Comput. Sci. [6] Dürr et al. 2001. Soil Science Society of America Journal. 65, 414-423. [7] Tribouillois et al. 2016. PLoS ONE 11(8):e0161185. [8] Poisson et al. 2018. Eur. J. Agron. 97, 28–37. [9] Poisson et al. 2018. PLoS One 13(9):e0204376.

This work is funded by the Metaprogram ACCAF "Adaptation to Climate Change in Agriculture and Forest" by INRAE. It is part of a PhD project funded by the Normandy Region and the division Environment and Agronomy of INRAE

Annexe 10 : Ensemble des posters présentés lors des congrès nationaux et internationaux dans le cadre de la thèse (voir « Liste des activités scientifiques », cont.).



Journées de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (JED nBISE)

High temperature patterns determine seed yield and quality in oilseed rape in the context of climate change

Lethicia Magno Massuia de Almeida[1], Jean-Christophe Avice[1], Annette Morvan-Bertrand[1], Marie Hélène Wagner[2], Maria Reyes Gonzalez-Centeno[3], Pierre-Louis Teissedre[3], Jean-Jacques Bessoule[4], Marina Le Guedard[4], Tae Hwan Kim[5], Alain Mollier[6], Sophie Brunel-Muguet[1]

1 : UMR EVA (Ecophysiologie Végétale et Agronomie), Normandie Université, UNICAEN, INRAE, CRI Normandie Végétal (FR4277), Esplanade de la Paix, F 14032, Caen, France
2 : Station Nationale d'Essais de Semences, GEVES, 49071 Beaucouzé
3 : Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV)
4 : IPB Aquitaine Transfert ADERA, Univ Bordeaux, CNRS, Laboratoire de Biogenèse Membranaire (LBM), UMR 5200
5 : Institute of Agricultural Science and Technology, College of Agriculture & Life Science, Chonnam National University
6 : INRA, Bordeaux Sciences Agro, INRAE, F 33140, Villenave d'Ornon, France

CONTEXT & OBJECTIVES

- Climate change projections indicate **increased frequency and duration of extreme weather events** such as heat waves (Fig.1), impacting plant development over a crop season
- Reduction in S industrial S-rich emissions lead to **soil Sulphur (S) oligotrophy**, which result in seed yield penalties and grain quality degradation especially in S-demanding crops such as oilseed rape

Figure 1: Frequency of heat waves in various scenarios (Lemonsu et al., 2014)

HYPOTHESIS

- Evidence of repeated mild stressing events were showed to help stimulating **stress memory**, which relies on priming mechanisms set up during the first stress exposure (Fig. 2)
- In this context, our study was conducted to test high temperature sequences and contrasting S supplies which could **alleviate negative impact** of heat peaks on seed quality in oilseed rape

Figure 2: Priming effect illustrated for water stress (Crisp et al., 2016)

METHODOLOGY

HS : 75U SO3
LS : 25U SO3

GS72* Thermal stress

Stage → GS32 GS50 GS55 GS60 GS68 GS75 GS99

Vernalization (T°C<6°C)

*Growing Stage 72, i.e. 20% of pods have reached final length (Lancashire et al., 1991)

Mild stress for 5 days Mod 1 and Mod 2: 25.3 °C ±1.8 /21.7°C ± 0.7 day (16h)/night (8h)

Recovery for 5 days Mod 1: 15.7°C ±2.7 (mean), 28.4°C (max) and 11.5°C (min)

Mild stress for 7 days with heat peaks Mod 1, Mod 3 and Mod 4: Daily 31.4°C ±1.7 applied during the mild stress

Priming : 5 days under mild warming followed by 5 days under natural thermoperiod and 7 days mild warming with 4 heat peaks

Early mild stress : 5 early full days under mild warming and followed by 12 days under natural thermoperiod

4 late heat peaks : 10 days under natural thermoperiod followed by 7 days under mild warming with daily heat peaks on 4 days

3 late heat peaks : 14 days under natural thermoperiod followed by 5 days under mild warming with a daily heat peak

Control : Natural thermoperiod conditions in the greenhouse

Heated unit — Control unit

Temperature (°C)

GS72 (April 27th) — Duration of the temperature modalities: 17 days from GS72 — GS79 (May 15th)

Figure 3: High temperature sequences applied from GS72

(i) What are the quantitative effects of different high temperature sequences applied at advanced seed filling?
(ii) Is there any beneficial effect from a mild stress event that occurs prior to later repeated intense heat peaks?
(iii) To what extent do the effects of successive high temperature events differ from the effect of individual events?
(iv) What are the underlying defense pathways triggered by temperature stress?
(v) How does sulphur nutrition impact heat stress responses through acquisition of thermotolerance?

Figure 4: Plants in the greenhouse

Pods < 5cm

Pods ≥ 5cm → SEEDS

SEED ANALYSIS

- **Yield components**
- **Nutritional quality***
  Fatty acids
  Proteins
  S concentration
- **Physiological quality***
  Soluble sugars
  Hormones
  Conductivity

* Performed on seeds from pods ≥ 5 cm, i.e. 50% of final length

RESULTS

YIELD COMPONENTS

Table 1: Yield components per plant distinguishing the two pools of pods (i.e. pods L<5cm and pods L≥5cm at the beginning of the Temp-modality application). Results are presented by factor (Temp-modality, Sulphur condition). For a given variable, different letters (Tukey multiple comparisons test) indicate the ranking among Temp-modalities (including Temp-control) or between the two sulphur conditions. P-values and levels of significance are given for Temp, Sulphur and Temp x Sulphur interaction effects. Levels of significance: ns non-significant, p < 0.05*, p < 0.01**, p < 0.001***. SE: standard error, TSW: Thousand Seed Weight (Magno et al., 2021)

Factor/Variables	Total Yield (g)		Total Seed number		Total TSW (g)		Pods L < 5 cm Yield (g)		Pods L < 5 cm Seed number		Pods L < 5 cm TSW (g)		Pods L ≥ 5 cm Yield (g)		Pods L ≥ 5 cm Seed number		Pods L ≥ 5 cm TSW (g)	
Temp-modality																		
Control	9.6	a	2764	ns	3.3	ns	3.2	ns	956	ns	3.4	ns	6.6	ns	1829	ns	3.6	ns
Early mild stress	8.8	ab	2565	ns	3.1	ns	1.9	ns	615	ns	3.1	ns	6.9	ns	1950	ns	3.6	ns
3 late heat peaks	9.2	ab	2723	ns	2.9	ns	2.7	ns	927	ns	3.0	ns	6.5	ns	1796	ns	3.7	ns
4 late heat peaks	9.3	ab	2724	ns	3.1	ns	2.5	ns	785	ns	3.1	ns	6.8	ns	1939	ns	3.5	ns
Priming	8.2	b	2497	ns	3.2	ns	1.9	ns	545	ns	3.2	ns	6.2	ns	1952	ns	3.2	ns
se	0.4		80		0.3		0.5		0.5		0.3		0.6		158		0.2	
Sulphur																		
High Sulphur	9.1	ns	2730	a	3.1	ns	2.6	ns	809	ns	3.1	ns	6.5	ns	1921	ns	3.4	ns
Low Sulphur	9.0	ns	2587	b	3.1	ns	2.3	ns	722	ns	3.2	ns	6.7	ns	1865	ns	3.6	ns
se	0.2		52		0.2		0.3		0.3		0.2		0.4		97.0		0.1	
Temp effect	0.047	*	0.060		0.074		0.309		0.602		0.086		0.944		0.912		0.293	
Sulphur effect	0.769		0.048	*	0.981		0.514		0.424		0.745		0.752		0.684		0.372	
Temp x Sulphur	0.342		0.573		0.090		0.195		0.061		0.244		0.526		0.130		0.322	

No effects of temperature or sulphur treatements were observed on yield components on seeds from pods ≥5cm at GS72
Yield components were already established at GS72 when the first temperature stress period started

NUTRITIONAL QUALITY

Table 2: Nutritional seed quality criteria measured on seeds from pods L≥5cm. Results are presented by factor (Temp-modality, Sulphur condition). For a given measured variable, different letters (Tukey multiple comparisons test) indicate the ranking among Temp-modalities (including Temp-control) or between the two sulphur conditions. P-values and levels of significance are given for Temp, Sulphur and Temp x Sulphur interaction effects. Levels of significance: ns non-significant, p < 0.05*, p < 0.01**, p < 0.001***. SE: standard error; DW: dry weight, SSP: Seed Storage Protein (Magno et al., 2021)

	Seed C, N and S concentrations (%DW)						Oil contents and fatty acids (%DW)										Protein (mg/g DW)	
	Carbon		Nitrogen		Sulphur		Fatty acids		SFA		UFA		ω6:ω3 ratio		SSP	
Temp-modality																		
Control	59.2	a	3.2	b	0.311	ns	39	a	3.3	–	36	a	2.05	ab	150	ns
Early mild stress	58.2	ab	3.5	b	0.321	ns	40	a	3.3	–	37	a	1.97	b	168	ns
3 late heat peaks	58.2	ab	3.2	b	0.323	ns	41	a	3.6	–	38	a	2.08	ab	136	ns
4 late heat peaks	57.2	bc	3.4	b	0.316	ns	37	ab	3.3	–	34	ab	2.20	a	123	ns
Priming	56.0	c	3.9	a	0.373	ns	33	b	3.0	–	30	b	2.24	a	150	ns
se	0.5		0.1		0.027		2		0.1		2		0.06		21	
Sulphur																
High Sulphur	57.7	ns	3.5	ns	0.392	a	35	b	3.1	–	32	b	2.05	ns	106	b
Low Sulphur	57.8	ns	3.4	ns	0.266	b	41	a	4.6	–	38	a	2.12	ns	165	a
se	0.4		0.1		0.009		1		0.1		1		0.05		10	
Temp effect	0.001	**	0.000	***	0.013	*	0.002	**	0.001	**	0.003	**	0.001	**	0.270	
Sulphur effect	0.829		0.550		0.000	***	0.000	***	0.000	***	0.000	***	0.225		0.008	***
Temp x Sulphur	0.613		0.574		0.296		0.112		0.009	**	0.129		0.357		0.233	

S limitation lead to increase FA contents, mostly when combined with high temperature sequences
FAs profiles were impacted by thermal stress and the early mild stress favors ω3 over to ω6
S limitation increased greatly the seed storage protein content

SUMMARY

	Criteria	Temp-modality: Early Mild Stress	Temp-modality: 3 Heat Peaks	Temp-modality: 4 Heat Peaks	Temp-modality: Priming	S condition: Low Sulphur
YIELD COMPONENTS	Total Seed Yield	-10%	-6%	-5%	-16%	
	Total Seed number					-5%
	Seeds Yield from pods ≥5cm	-40%	-16%	-22%	-40%	
NUTRITIONAL QUALITY	Seed Carbon	-2%	-2%	-3%	-5%	
	Seed Nitrogen				+22%	
	Seed Sulphur	+3%	+4%	+2%	+20%	-32%
	Total Fatty Acids	+3%	+5%	-5%	-15%	+17%
	Satured FAs		+9%		-9%	+16%
	Unsatured FAs			-5%	-17%	+19%
	ω6:ω3 ratio	-9%	+1%	+7%	+9%	
	Protein concentration					+25%
PHYSIOLOGICAL QUALITY	[Raff+Stach]:Suc ratio	+12%		-15%	+2%	
	Seed conductivity				+262%	
	ABA:GA3 ratio	-5%	+28%	+30%	+28%	+66%

- -20% -10% 0 +10% +20% +

Figure 5: Summary of the effects of the four temperature sequences and the sulphur limitation on yield components, nutritional and physiological quality criteria. As illustrated in the legend, colors indicate the trends by level of increase or decrease to the temp-control modality. Numbers in boxes display the relative difference between the Temp-modality and the temp-control (for temperature modalities) and between Low sulphur and High Sulphur (for sulphur conditions). FAs: fatty acids, Raff: raffinose, Stach: stachyose, Suc: sucrose, ABA: abscisic acid, GA3: gibberellic acid (Magno et al., 2021)

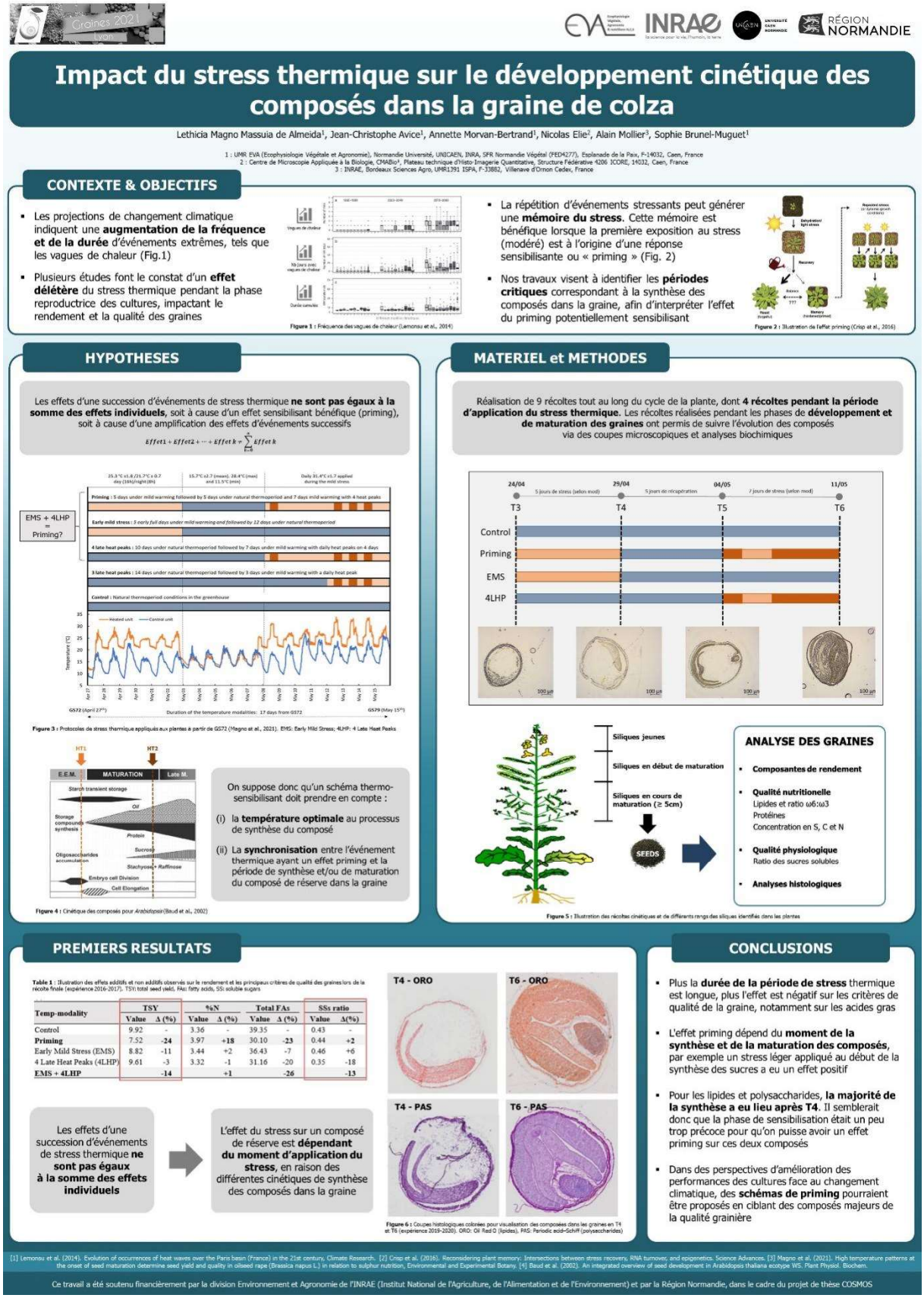
CONCLUSIONS

- Our results indicate significant effects of the thermal sequences for both S supplies on seed quality criteria, but not on seed yield components
- The longer the duration of the temperature stress period, the more negative on seed quality criteria, such as on fatty acid
- The priming effect is tightly dependent on the timing of the synthesis and the maturation compounds, e.g. early mild stress applied at the onset of sugars synthesis has a positive priming effect
- Thermo-sensitization protocols should consider altogether temperature event's features and adequate sulphur supply in Brassica species
- On going experiments aim at evaluating the contribution of epigenetic regulations in the acquisition of stress memory over a crop season and its transmission to offspring

References: [1] Lemonsu et al. (2014). Evolution of occurrences of heat waves over the Paris basin (France) in the 21st century, Climate Research. [2] Crisp et al. (2016). Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. Science Advances, 2(2), e1501340. [3] Lancashire et al. (1991). A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. Ann. Appl. Biol. [4] Magno et al. (2021). High temperature patterns at the onset of seed maturation determine seed yield and quality in oilseed rape (Brassica napus L.) in relation to sulphur nutrition, Environmental and Experimental Botany, Volume 185.

This work was financially supported by the Environment and Agronomy division of INRAE (French National Institute for Agriculture, Food and Environment), as part of MYRIAD project (Memory for Oilseed rape Adaptation)

Annexe 10 : Ensemble des posters présentés lors des congrès nationaux et internationaux dans le cadre de la thèse (voir « Liste des activités scientifiques », cont.).



Impact du stress thermique sur le développement cinétique des composés dans la graine de colza

Lethicia Magno Massuia de Almeida[1], Jean-Christophe Avice[1], Annette Morvan-Bertrand[1], Nicolas Elie[2], Alain Mollier[3], Sophie Brunel-Muguet[1]

1 : UMR EVA (Ecophysiologie Végétale et Agronomie), Normandie Université, UNICAEN, INRA, SFR Normandie Végétal (FED4277), Esplanade de la Paix, F-14032, Caen, France
2 : Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie, CMABio³, Plateau technique d'Histo-Imagerie Quantitative, Structure Fédérative 4206 ICORE, 14032, Caen, France
3 : INRAE, Bordeaux Sciences Agro, UMR1391 ISPA, F-33882, Villenave d'Ornon Cedex, France

CONTEXTE & OBJECTIFS

- Les projections de changement climatique indiquent une **augmentation de la fréquence et de la durée** d'événements extrêmes, tels que les vagues de chaleur (Fig.1)
- Plusieurs études font le constat d'un **effet délétère** du stress thermique pendant la phase reproductrice des cultures, impactant le rendement et la qualité des graines

Figure 1 : Fréquence des vagues de chaleur (Lemonsu et al., 2014)

- La répétition d'événements stressants peut générer une **mémoire du stress**. Cette mémoire est bénéfique lorsque la première exposition au stress (modéré) est à l'origine d'une réponse sensibilisante ou « priming » (Fig. 2)
- Nos travaux visent à identifier les **périodes critiques** correspondant à la synthèse des composés dans la graine, afin d'interpréter l'effet du priming potentiellement sensibilisant

Figure 2 : Illustration de l'effet priming (Crisp et al., 2016)

HYPOTHESES

Les effets d'une succession d'événements de stress thermique **ne sont pas égaux à la somme des effets individuels**, soit à cause d'un effet sensibilisant bénéfique (priming), soit à cause d'une amplification des effets d'événements successifs

$$\&effet1 + \&effet2 + \cdots + \&effet\,k \neq \sum_{k=1}^{k} \&effet\,k$$

Figure 3 : Protocoles de stress thermique appliqués aux plantes à partir de GS72 (Magno et al., 2021). EMS: Early Mild Stress; 4LHP: 4 Late Heat Peaks

Figure 4 : Cinétique des composés pour *Arabidopsis* (Baud et al., 2002)

On suppose donc qu'un schéma thermo-sensibilisant doit prendre en compte :

(i) la **température optimale** au processus de synthèse du composé

(ii) La **synchronisation** entre l'événement thermique ayant un effet priming et la période de synthèse et/ou de maturation du composé de réserve dans la graine

MATERIEL et METHODES

Réalisation de 9 récoltes tout au long du cycle de la plante, dont **4 récoltes pendant la période d'application du stress thermique**. Les récoltes réalisées pendant les phases de **développement et de maturation des graines** ont permis de suivre l'évolution des composés via des coupes microscopiques et analyses biochimiques

Figure 5 : Illustration des récoltes cinétiques et de différents rangs des siliques identifiés dans les plantes

ANALYSE DES GRAINES

- **Composantes de rendement**
- **Qualité nutritionelle**
  Lipides et ratio ω6:ω3
  Protéines
  Concentration en S, C et N
- **Qualité physiologique**
  Ratio des sucres solubles
- **Analyses histologiques**

PREMIERS RESULTATS

Table 1 : Illustration des effets additifs et non additifs observés sur le rendement et les principaux critères de qualité des graines lors de la récolte finale (expérience 2016-2017). TSY: total seed yield, FAs: fatty acids, SSs: soluble sugars

Temp-modality	TSY		%N		Total FAs		SSs ratio	
	Value	Δ (%)	Value	Δ (%)	Value	Δ (%)	Value	Δ(%)
Control	9.92	-	3.36	-	39.35	-	0.43	-
Priming	7.52	**-24**	3.97	**+18**	30.10	**-23**	0.44	**+2**
Early Mild Stress (EMS)	8.82	-11	3.44	+2	36.43	-7	0.46	+6
4 Late Heat Peaks (4LHP)	9.61	-3	3.32	-1	31.16	-20	0.35	-18
EMS + 4LHP		**-14**		**+1**		**-26**		**-13**

Les effets d'une succession d'événements de stress thermique **ne sont pas égaux à la somme des effets individuels**

L'effet du stress sur un composé de réserve est **dépendant du moment d'application du stress**, en raison des différentes cinétiques de synthèse des composés dans la graine

Figure 6 : Coupes histologiques colorées pour visualisation des composées dans les graines en T4 et T6 (expérience 2019-2020). ORO: Oil Red O (lipides), PAS: Periodic acid–Schiff (polysaccharides)

CONCLUSIONS

- Plus la **durée de la période de stress** thermique est longue, plus l'effet est négatif sur les critères de qualité de la graine, notamment sur les acides gras
- L'effet priming dépend du **moment de la synthèse et de la maturation des composés**, par exemple un stress léger appliqué au début de la synthèse des sucres a eu un effet positif
- Pour les lipides et polysaccharides, **la majorité de la synthèse a eu lieu après T4**. Il semblerait donc que la phase de sensibilisation était un peu trop précoce pour qu'on puisse avoir un effet priming sur ces deux composés
- Dans des perspectives d'amélioration des performances des cultures face au changement climatique, des **schémas de priming** pourraient être proposés en ciblant des composés majeurs de la qualité grainière

[1] Lemonsu et al. (2014). Evolution of occurrences of heat waves over the Paris basin (France) in the 21st century, Climate Research. [2] Crisp et al. (2016). Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. Science Advances. [3] Magno et al. (2021). High temperature patterns at the onset of seed maturation determine seed yield and quality in oilseed rape (Brassica napus L.) in relation to sulphur nutrition, Environmental and Experimental Botany. [4] Baud et al. (2002). An integrated overview of seed development in Arabidopsis thaliana ecotype WS. Plant Physiol. Biochem.

Ce travail a été soutenu financièrement par la division Environnement et Agronomie de l'INRAE (Institut National de l'Agriculture, de l'Alimentation et de l'Environnement) et par la Région Normandie, dans le cadre du projet de thèse COSMOS

Références

Références

Aguirrezábal, L., Martre, P., Pereyra-Irujo, G., Echarte, M.M., and Izquierdo, N. (2015). Improving grain quality: ecophysiological and modeling tools to develop management and breeding strategies. Crop Physiol. 423–465.

Aguirrezábal, L.A.N., Lavaud, Y., Dosio, G.A.A., Izquierdo, N.G., Andrade, F.H., and González, L.M. (2003). Intercepted solar radiation during seed filling determines sunflower weight per seed and oil concentration. Crop Sci. *43*, 152–161.

Ahuja, I., De Vos, R., Bones, A., and Hall, R. (2010). Plant Molecular Stress Responses Face Climate Change. Trends Plant Sci. *15*, 664–674.

Akmouche, Y., Cheneby, J., Lamboeuf, M., Elie, N., Laperche, A., Bertheloot, J., D'Hooghe, P., Trouverie, J., Avice, J.-C., Etienne, P., et al. (2019). Do nitrogen- and sulphur-remobilization-related parameters measured at the onset of the reproductive stage provide early indicators to adjust N and S fertilization in oilseed rape (Brassica napus L.) grown under N- and/or S-limiting supplies? Planta *250*, 2047–2062.

Aksouh-Harradj, Campbell, L.C., and Mailer, R.J. (2006). Canola response to high and moderately high temperature stresses during seed maturation. Can. J. Plant Sci. *86*, 967–980.

Aksouh, N.M., Jacobs, B.C., Stoddard, F.L., and Mailer, R.J. (2001). Response of canola to different heat stresses. Aust. J. Agric. Res. *52*, 817–824.

Ali, F., Qanmber, G., Li, F., and Wang, Z. (2022). Updated role of ABA in seed maturation, dormancy, and germination. J. Adv. Res. *35*, 199–214.

Ali, S., Rizwan, M., Arif, M.S., Ahmad, R., Hasanuzzaman, M., Ali, B., and Hussain, A. (2020). Approaches in Enhancing Thermotolerance in Plants: An Updated Review. J. Plant Growth Regul. *39*, 456–480.

Alsajri, F.A., Wijewardana, C., Bheemanahalli, R., Irby, J.T., Krutz, J., Golden, B., Reddy, V.R., and Reddy, K.R. (2022). Morpho-Physiological, Yield, and Transgenerational Seed Germination Responses of Soybean to Temperature. Front. Plant Sci. *13*, 1–11.

Angadi, Cutforth, H.W., Miller, P.R., McConkey, B.G., Entz, M.H., Brandt, S.A., and Volkmar, K.M. (2000). Response of three brassica species to high temperature stress during reproductive growth. Can. J. Plant Sci. *80*, 693–701.

Angeles-Núñez, J.G., and Tiessen, A. (2011). Mutation of the transcription factor LEAFY COTYLEDON 2 alters the chemical composition of Arabidopsis seeds, decreasing oil and protein content, while maintaining high levels of starch and sucrose in mature seeds. J. Plant Physiol. *168*, 1891–1900.

Arnell, N.W., and Freeman, A. (2021). The effect of climate change on agro-climatic indicators in the UK. Clim. Change *165*, 1–26.

Asseng, S., Ewert, F., Rosenzweig, C., Jones, J.W., Hatfield, J.L., Ruane, A.C., Boote, K.J., Thorburn, P.J., Rötter, R.P., Cammarano, D., et al. (2013). Uncertainty in simulating wheat yields under climate change. Nat. Clim. Chang. *3*, 827–832.

Asseng, S., Ewert, F., Martre, P., Rötter, R.P., Lobell, D.B., Cammarano, D., Kimball, B.A., Ottman, M.J., Wall, G.W., White, J.W., et al. (2015a). Rising temperatures reduce global wheat production. Nat. Clim. Chang. *5*, 143–147.

Asseng, S., Zhu, Y., Wang, E., and Zhang, W. (2015b). Chapter 20 - Crop modeling for climate change impact and adaptation. V.O. Sadras, and D.F.B.T.-C.P. (Second E. Calderini, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 505–546.

Assoumani, Z. (2022). A First Study in Causal Formal Concept Analysis. Rapport de stage de fin d'études pour l'obtention de Master 2 MFLS.

Bador, M., Terray, L., Boé, J., Somot, S., Alias, A., Gibelin, A.L., and Dubuisson, B. (2017). Future summer mega-heatwave and record-breaking temperatures in a warmer France climate. Environ. Res. Lett. *12*.

Baek, D., Pathange, P., Chung, J., Jiang, J., Gao, L., Oikawa, A., Hirai, M.Y., Saito, K., Pare, P.W., and Shi, H. (2010). A stress-inducible sulphotransferase sulphonates salicylic acid and confers pathogen resistance in Arabidopsis. Plant. Cell Environ. *33*, 1383–1392.

Bailly, C., Audigier, C., Ladonne, F., Wagner, M.H., Coste, F., Corbineau, F., and Côme, D. (2001). Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. J. Exp. Bot. *52*, 701–708.

Bakhshi, B. (2021). Heat and Drought Stress Response and Related Management Strategies in Oilseed. Agrotechniques Ind. Crop. *1*, 170–181.

Balfagón, D., Sengupta, S., Gómez-Cadenas, A., Fritschi, F.B., Azad, R.K., Mittler, R., and Zandalinas, S.I. (2019).

Jasmonic Acid Is Required for Plant Acclimation to a Combination of High Light and Heat Stress. Plant Physiol. *181*, 1668–1682.

Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A., Dombrowski, Y., McArt, D.G., Dunne, P.D., McQuaid, S., Gray, R.T., Murray, L.J., Coleman, H.G., et al. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. Sci. Rep. *7*, 1–7.

Bashir, H., Ibrahim, M.M., Bagheri, R., Ahmad, J., Arif, I.A., Baig, M.A., and Qureshi, M.I. (2015). Influence of sulfur and cadmium on antioxidants, phytochelatins and growth in Indian mustard. AoB Plants *7*.

Baud, S., Boutin, J.P., Miquel, M., Lepiniec, L., and Rochat, C. (2002). An integrated overview of seed development in Arabidopsis thaliana ecotype WS. Plant Physiol. Biochem. *40*, 151–160.

Baulcombe, D.C., and Dean, C. (2014). Epigenetic regulation in plant responses to the environment. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *6*, 1–20.

Baux, A., Hebeisen, T., and Pellet, D. (2008). Effects of minimal temperatures on low-linolenic rapeseed oil fatty-acid composition. Eur. J. Agron. *29*, 102–107.

Baux, A., Colbach, N., Allirand, J.M., Jullien, A., Ney, B., and Pellet, D. (2013). Insights into temperature effects on the fatty acid composition of oilseed rape varieties. Eur. J. Agron. *49*, 12–19.

Bazin, A., Couceiro, M., Devignes, M.D., and Napoli, A. (2021). An Approach to Identifying the Most Predictive and Discriminant Features in Supervised Classification Problems. Lect. Notes Comput. Sci. (Including Subser. Lect. Notes Artif. Intell. Lect. Notes Bioinformatics) *12879 LNAI*, 48–56.

Bazin, A., Couceiro, M., Devignes, M.D., and Napoli, A. (2022). Steps towards causal Formal Concept Analysis. Int. J. Approx. Reason. *142*, 338–348.

Bellon-Maurel, V., Brossard, L., and Garcia, F. (2022). Agriculture et numérique. Livre Blanc, INRAIA, INRAE, N°6.

Ben-Ari, T., Adrian, J., Klein, T., Calanca, P., Van der Velde, M., and Makowski, D. (2016). Identifying indicators for extreme wheat and maize yield losses. Agric. For. Meteorol. *220*, 130–140.

Bennett, E.J., Roberts, J.A., and Wagstaff, C. (2011). The role of the pod in seed development: Strategies for manipulating yield. New Phytol. *190*, 838–853.

Bewley, J.D., Bradford, K., Hilhorst, H., and Nonogaki, H. (2013). Seeds: Physiology of development, germination and dormancy, 3rd edition.

Bi, A., Wang, T., Wang, G., Zhang, L., Wassie, M., Amee, M., Xu, H., Hu, Z., Liu, A., Fu, J., et al. (2021). Stress memory gene FaHSP17.8-CII controls thermotolerance via remodeling PSII and ROS signaling in tall fescue. Plant Physiol. *187*, 1163–1176.

Biancetti, G. (2021). Impacts de stress biotique et abiotique sur l'acquisition de la qualité nutritionnelle et physiologique de la graine de colza (Brassica napus L.). Thèse de Doctorat. *600*, 1–182.

Bielach, A., Hrtyan, M., and Tognetti, V.B. (2017). Plants under stress: Involvement of auxin and cytokinin. Int. J. Mol. Sci. *18*.

Bilichak, A., Ilnytskyy, Y., Woycicki, R., Kepeshchuk, N., Fogen, D., and Kovalchuk, I. (2015). The elucidation of stress memory inheritance in Brassica rapa plants. Front. Plant Sci. *6*, 1–20.

Bita, C.E., and Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: Scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. Front. Plant Sci. *4*, 1–18.

Bokszczanin, K., Fragkostefanakis, S., Bostan, H., Bovy, A., Chaturvedi, P., Chiusano, M.L., Firon, N., Iannacone, R., Jegadeesan, S., Klaczynskid, K., et al. (2013). Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance. Front. Plant Sci. *4*, 315.

Borisjuk, L., Neuberger, T., Schwender, J., Heinzel, N., Sunderhaus, S., Fuchs, J., Hay, J.O., Tschiersch, H., Braun, H.P., Denolf, P., et al. (2013). Seed architecture shapes embryo metabolism in oilseed rape. Plant Cell *25*, 1625–1640.

Boyko, A., and Kovalchuk, I. (2011). Genome instability and epigenetic modification-heritable responses to environmental stress? Curr. Opin. Plant Biol. *14*, 260–266.

Bruce, T.J.A., Matthes, M.C., Napier, J.A., and Pickett, J.A. (2007). Stressful "memories" of plants: Evidence and possible mechanisms. Plant Sci. *173*, 603–608.

Brunel-Muguet, S., Mollier, A., Kauffmann, F., Avice, J.-C., Goudier, D., Sénécal, E., and Etienne, P. (2015a). SuMoToRI, an Ecophysiological Model to Predict Growth and Sulfur Allocation and Partitioning in Oilseed Rape (Brassica napus L.) Until the Onset of Pod Formation. Front. Plant Sci. *6*, 993.

Brunel-Muguet, S., D'Hooghe, P., Bataillé, M.-P., Larré, C., Kim, T.H., Trouverie, J., Avice, J.-C., Etienne, P., and Dürr, C. (2015b). Heat stress during seed filling interferes with sulfur restriction on grain composition and seed germination in oilseed rape (Brassica napus L.). Front. Plant Sci. *6*, 1–12.

Brunel, S., Teulat-Merah, B., Wagner, M.-H., Huguet, T., Prosperi, J.M., and Dürr, C. (2009). Using a model-based framework for analysing genetic diversity during germination and heterotrophic growth of Medicago truncatula. Ann. Bot. *103*, 1103–1117.

Brzezinka, K., Altmann, S., and Bäurle, I. (2019). BRUSHY1/TONSOKU/MGOUN3 is required for heat stress memory. Plant Cell Environ. *42*, 771–781.

Byeon, B., Bilichak, A., and Kovalchuk, I. (2019). Transgenerational Response to Heat Stress in the Form of Differential Expression of Noncoding RNA Fragments in Brassica rapa Plants . Plant Genome *12*, 180022.

Canuto, R., Camey, S., Gigante, D.P., Menezes, A.M.B., and Olinto, M.T.A. (2010). Análise de componente principal focada: Um método gráfi co para explorer padrões alimentares. Cad. Saude Publica *26*, 2149–2156.

Canvin (1965). The Effect of Temperature on the Oil Content and Fatty Acid Composition of the Oils from several Oil Seed Crops. Can. J. Bot. *43*, 63–69.

Caubel, J., de Cortázar-Atauri, I.G., Launay, M., de Noblet-Ducoudré, N., Huard, F., Bertuzzi, P., and Graux, A.I. (2015). Broadening the scope for ecoclimatic indicators to assess crop climate suitability according to ecophysiological, technical and quality criteria. Agric. For. Meteorol. *207*, 94–106.

Ceccarelli, S., Grando, S., Maatougui, M., Michael, M., Slash, M., Haghparast, R., Rahmanian, M., Taheri, A., Al-Yassin, A., Benbelkacem, A., et al. (2010). Plant breeding and climate changes. J. Agric. Sci. *148*, 627–637.

Chandio, A.A., Ozturk, I., Akram, W., Ahmad, F., and Mirani, A.A. (2020). Empirical analysis of climate change factors affecting cereal yield: evidence from Turkey. Environ. Sci. Pollut. Res. *27*, 11944–11957.

Charng, Y.Y., Liu, H.C., Liu, N.Y., Hsu, F.C., and Ko, S.S. (2006). Arabidopsis Hsa32, a novel heat shock protein, is essential for acquired thermotolerance during long recovery after acclimation. Plant Physiol. *140*, 1297–1305.

Chaudhary, S., Devi, P., Bhardwaj, A., Jha, U.C., Sharma, K.D., Prasad, P.V.V., Siddique, K.H.M., Bindumadhava, H., Kumar, S., and Nayyar, H. (2020). Identification and Characterization of Contrasting Genotypes/Cultivars for Developing Heat Tolerance in Agricultural Crops: Current Status and Prospects. Front. Plant Sci. *11*.

Chebrolu, K.K., Fritschi, F.B., Ye, S., Krishnan, H.B., Smith, J.R., and Gillman, J.D. (2016). Impact of heat stress during seed development on soybean seed metabolome. Metabolomics *12*, 1–14.

Chen, S., Stefanova, K., Siddique, K.H.M., and Cowling, W.A. (2020). Transient daily heat stress during the early reproductive phase disrupts pod and seed development in Brassica napus L. Food Energy Secur. 1–15.

Cheng, Y., and Church, G.M. (2000). Biclustering of expression data. Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. *8*, 93–103.

Chenu, K., Porter, J.R., Martre, P., Basso, B., Chapman, S.C., Ewert, F., Bindi, M., and Asseng, S. (2017). Contribution of Crop Models to Adaptation in Wheat. Trends Plant Sci. *22*, 472–490.

Chitnis, V.R., Gao, F., Yao, Z., Jordan, M.C., Park, S., and Ayele, B.T. (2014). After-ripening induced transcriptional changes of hormonal genes in wheat seeds: The cases of brassinosteroids, ethylene, cytokinin and salicylic acid. PLoS One *9*, 1–14.

Christidis, N., Jones, G.S., and Stott, P.A. (2015). Dramatically increasing chance of extremely hot summers since the 2003 European heatwave. *5*, 46–49.

Clarke, S.M., Mur, L.A.J., Wood, J.E., and Scott, I.M. (2004). Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in Arabidopsis thaliana. Plant J. *38*, 432–447.

Clarke, S.M., Cristescu, S.M., Miersch, O., Harren, F.J.M., Wasternack, C., and Mur, L.A.J. (2009). Jasmonates act with salicylic acid to confer basal thermotolerance in Arabidopsis thaliana. New Phytol. *182*, 175–187.

Conrath, U., Beckers, G.J.M., Langenbach, C.J.G., and Jaskiewicz, M.R. (2015). Priming for Enhanced Defense. Annu. Rev. Phytopathol. *53*, 97–119.

Corlouer, E. (2020). Identification des déterminants génétiques et moléculaires contrôlant la stabilité du rendement chez le colza d'hiver. Thèse de doctorat. 1–182.

Corlouer, E., Gauffreteau, A., Bouchet, A.S., Bissuel-Bélaygue, C., Nesi, N., and Laperche, A. (2019). Envirotypes based on seed yield limiting factors allow to tackle G × e interactions. Agronomy *9*, 1–18.

Couceiro, M., and Napoli, A. (2019). Elements About Exploratory, Knowledge-Based, Hybrid, and Explainable Knowledge Discovery. ICFCA 2019 - 15th Int. Conf. Form. Concept Anal. Jun 2019, Frankfurt, Ger. pp.3-16.

Crisp, P.A., Ganguly, D., Eichten, S.R., Borevitz, J.O., and Pogson, B.J. (2016). Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. Sci. Adv. *2*, e1501340.

Crisp, P.A., Ganguly, D.R., Smith, A.B., Murray, K.D., Estavillo, G.M., Searle, I., Ford, E., Bogdanović, O., Lister, R., Borevitz, J.O., et al. (2017). Rapid recovery gene downregulation during excess-light stress and recovery in arabidopsis. Plant Cell *29*, 1836–1863.

D'hooghe, P., Picot, D., Brunel-Muguet, S., Kopriva, S., Avice, J.C., and Trouverie, J. (2019). Germinative and post-germinative behaviours of Brassica napus seeds are impacted by the severity of s limitation applied to the parent plants. Plants *8*, 5–7.

D'Hooghe, P., Escamez, S., Trouverie, J., and 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 Biol. *13*, 1.

D'Hooghe, P., Dubousset, L., Gallardo, K., Kopriva, S., Avice, J.-C., and Trouverie, J. (2014). Evidence for Proteomic and Metabolic Adaptations Associated with Alterations of Seed Yield and Quality in Sulfur-limited Brassica napus L. Mol. Cell. Proteomics *13*, 1165–1183.

Dantigny, P., Marín, S., Beyer, M., and Magan, N. (2007). Mould germination: Data treatment and modelling. Int. J. Food Microbiol. *114*, 17–24.

Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C.H., and Scott, I.M. (1998). Parallel Changes in H2O2 and Catalase during Thermotolerance Induced by Salicylic Acid or Heat Acclimation in Mustard Seedlings. Plant Physiol. *116*, 1351–1357.

Debeaujon, I., and Koornneef, M. (2000). Gibberellin Requirement for Arabidopsis Seed Germination Is Determined Both by Testa Characteristics and Embryonic Abscisic Acid 1.

Delgado, J.A., Groffman, P.M., Nearing, M.A., Goddard, T., Reicosky, D., Lal, R., Kitchen, N.R., Rice, C.W., Towery, D., and Salon, P. (2011). Conservation practices to mitigate and adapt to climate change. J. Soil Water Conserv. *66*, 118–129.

Delourme, R., Falentin, C., Huteau, V., Clouet, V., Horvais, R., Gandon, B., Specel, S., Hanneton, L., Dheu, J.E., Deschamps, M., et al. (2006). Genetic control of oil content in oilseed rape (Brassica napus L.). Theor. Appl. Genet. *113*, 1331–1345.

Deng, X., and Scarth, R. (1998). Temperature effects on fatty acid composition during development of low-linolenic oilseed rape (Brassica napus L.). J. Am. Oil Chem. Soc. *75*, 759–766.

Deryng, D., Conway, D., Ramankutty, N., Price, J., and Warren, R. (2014). Global crop yield response to extreme heat stress under multiple climate change futures. Environ. Res. Lett. *9*.

Diepenbrock, W., and Geisler, G. (1979). Compositional Changes in Developing Pods and Seeds of Oilseed Rape (Brassica Napus L.) As Affected By Pod Position on the Plant. Can. J. Plant Sci. *59*, 819–830.

Diepenbrock, W. (2000). Yield analysis of winter oilseed rape (Brassica napus L.): A review. F. Crop. Res. *67*, 35–49.

Ding, Y., Fromm, M., and Avramova, Z. (2012). Multiple exposures to drought "train" transcriptional responses in Arabidopsis. Nat. Commun. *3*, 740.

Ding, Y., Virlouvet, L., Liu, N., Riethoven, J.J., Fromm, M., and Avramova, Z. (2014). Dehydration stress memory genes of Zea mays; comparison with Arabidopsis thaliana. BMC Plant Biol. *14*, 1–15.

Diodato, N., and Bellocchi, G. (2008). Drought stress patterns in Italy using agro-climatic indicators. Clim. Res. *36*, 53–63.

Dornbos, D.L., and Mullen, R.E. (1992). Soybean seed protein and oil contents and fatty acid composition adjustments by drought and temperature. J. Am. Oil Chem. Soc. *69*, 228–231.

Dowen, R.H., Pelizzola, M., Schmitz, R.J., Lister, R., Dowen, J.M., Nery, J.R., Dixon, J.E., and Ecker, J.R. (2012). Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, E2183-91.

Dubousset, L., Etienne, P., and Avice, J.C. (2010). Is the remobilization of S and N reserves for seed filling of winter oilseed rape modulated by sulphate restrictions occurring at different growth stages? J. Exp. Bot. *61*, 4313–4324.

Duempelmann, L., Skribbe, M., and Bühler, M. (2020). Small RNAs in the Transgenerational Inheritance of Epigenetic Information. Trends Genet. *36*, 203–214.

Durruty, I., Aguirrezábal, L.A.N., and Echarte, M.M. (2016). Kinetic modeling of sunflower grain filling and fatty acid biosynthesis. Front. Plant Sci. *7*, 1–15.

Elferjani, R., and Soolanayakanahally, R. (2018). Canola responses to drought, heat, and combined stress: shared

and specific effects on carbon assimilation, seed yield, and oil composition. Front. Plant Sci. *9*, 1–17.

Esquinas-Alcázar, J. (2005). Protecting crop genetic diversity for food security: Political, ethical and technical challenges. Nat. Rev. Genet. *6*, 946–953.

Ezeagu, I.E., Petzke, J.K., Metges, C.C., Akinsoyinu, A.O., and Ologhobo, A.D. (2002). Seed protein contents and nitrogen-to-protein conversion factors for some uncultivated tropical plant seeds. Food Chem. *78*, 105–109.

Fait, A., Angelovici, R., Less, H., Ohad, I., Urbanczyk-Wochniak, E., Fernie, A.R., and Galili, G. (2006). Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. Plant Physiol. *142*, 839–854.

Falissard, B. (1999). Focused Principal Component Analysis: Looking at a Correlation Matrix with a Particular Interest in a Given Variable. J. Comput. Graph. Stat. *8*, 906–912.

Fan, Y., Ma, C., Huang, Z., Abid, M., Jiang, S., Dai, T., Zhang, W., Ma, S., Jiang, D., and Han, X. (2018). Heat priming during early reproductive stages enhances thermo-tolerance to post-anthesis heat stress via improving photosynthesis and plant productivity in winter wheat (Triticum aestivum L.). Front. Plant Sci. *9*, 1–17.

Finkelstein, R. (2013). Abscisic Acid Synthesis and Response. Arab. B. *11*, e0166.

Fischer, A.H., Jacobson, K.A., Rose, J., and Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. CSH Protoc. *2008*, pdb.prot4986.

Folland et al. (2001). Climate change 2001: The scientific basis. Contribution of working group I to the third assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Weather *57*, 267–269.

Frost, C.J., Mescher, M.C., Carlson, J.E., and De Moraes, C.M. (2008). Plant Defense Priming against Herbivores: Getting Ready for a Different Battle. PLANT Physiol. *146*, 818–824.

Gabrielle, B., Denoroy, P., Gosse, G., Justes, E., and Andersen, M.N. (1998a). A model of leaf area development and senescence for winter oilseed rape. F. Crop. Res. *57*, 209–222.

Gabrielle, B., Denoroy, P., Gosse, G., Justes, E., and Andersen, M.N. (1998b). Development and evaluation of a CERES-type model for winter oilseed rape. F. Crop. Res. *57*, 95–111.

Gallusci, P., Dai, Z., Génard, M., Gauffretau, A., Leblanc-Fournier, N., Richard-Molard, C., Vile, D., and Brunel-Muguet, S. (2017). Epigenetics for Plant Improvement: Current Knowledge and Modeling Avenues. Trends Plant Sci. *22*, 610–623.

Gan, Y., Angadi, S. V., Cutforth, H., Potts, D., Angadi, V. V., and McDonald, C.L. (2004). Canola and mustard response to short periods of temperature and water stress at different developmental stages. Can. J. Plant Sci. *84*, 697–704.

Gangl, R., Behmüller, R., and Tenhaken, R. (2015). Molecular cloning of AtRS4, a seed specific multifunctional RFO synthase/galactosylhydrolase in Arabidopsis thaliana. Front. Plant Sci. *6*, 789.

Gauthier, M., Pellet, D., Monney, C., Herrera, J.M., Rougier, M., and Baux, A. (2017). Fatty acids composition of oilseed rape genotypes as affected by solar radiation and temperature. F. Crop. Res. *212*, 165–174.

Ge, J.C., Yoon, S.K., and Choi, N.J. (2017). Using canola oil biodiesel as an alternative fuel in diesel engines: A review. Appl. Sci. *7*.

Gitz, V., Meybeck, A., Lipper, L., Young, C., and Braatz, S. (2016). Climate change and food security: Risks and responses.

González-Centeno, M.R., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rosselló, C., and Teissedre, P.-L. (2012). Proanthocyanidin Composition and Antioxidant Potential of the Stem Winemaking Byproducts from 10 Different Grape Varieties (Vitis vinifera L.). J. Agric. Food Chem. *60*, 11850–11858.

González-Centeno, M.R., Comas-Serra, F., Femenia, A., Rosselló, C., and Simal, S. (2015). Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (Vitis vinifera L.): Experimental kinetics and modeling. Ultrason. Sonochem. *22*, 506–514.

Goudriaan, J., and Monteith, J.L. (1990). A mathematical function for crop growth based on light interception and leaf area expansion. Ann. Bot. *66*, 695–701.

Grami, B., and Stefansson, B. (1977). Gene action for protein and oil content in summer rape. Can. J. Plant Sci. *57*.

Groot, M.P., Kooke, R., Knoben, N., Vergeer, P., Keurentjes, J.J.B., Ouborg, N.J., and Verhoeven, K.J.F. (2016). Effects of Multi-Generational Stress Exposure and Offspring Environment on the Expression and Persistence of Transgenerational Effects in Arabidopsis thaliana. PLoS One *11*, 1–16.

Groot, M.P., Kubisch, A., Ouborg, N.J., Pagel, J., Schmid, K.J., Vergeer, P., and Lampei, C. (2017).

Transgenerational effects of mild heat in Arabidopsis thaliana show strong genotype specificity that is explained by climate at origin. New Phytol. *215*, 1221–1234.

Gruber, S., Pekrun, C., and Claupein, W. (2004). Population dynamics of volunteer oilseed rape (Brassica napus L.) affected by tillage. Eur. J. Agron. *20*, 351–361.

Guilioni, L., Wery, J., and Tardieu, F. (1997). Heat stress-induced abortion of buds and flowers in pea: Is sensitivity linked to organ age or to relations between reproductive organs? Ann. Bot. *80*, 159–168.

Guilioni, L., Wéry, J., and Lecoeur, J. (2003). High temperature and water deficit may reduce seed number in field pea purely by decreasing plant growth rate. Funct. Plant Biol. *30*, 1151–1164.

Von Der Haar, D., Müller, K., Bader-Mittermaier, S., and Eisner, P. (2014). Rapeseed proteins-Production methods and possible application ranges. OCL - Oilseeds Fats *21*, 1–8.

Habekotté, B. (1993). Quantitative analysis of pod formation, seed set and seed filling in winter oilseed rape (Brassica napus L.) under field conditions. F. Crop. Res. *35*, 21–33.

Habekotté, B. (1997a). Evaluation of seed yield determining factors of winter oilseed rape (Brassica napus L.) by means of crop growth modelling. F. Crop. Res. *54*, 137–151.

Habekotté, B. (1997b). A model of the phenological development of winter oilseed rape (Brassica napus L.). F. Crop. Res. *54*, 127–136.

Hackenberg, D., Asare-Bediako, E., Baker, A., Walley, P., Jenner, C., Greer, S., Bramham, L., Batley, J., Edwards, D., Delourme, R., et al. (2020). Identification and QTL mapping of resistance to Turnip yellows virus (TuYV) in oilseed rape, Brassica napus. Theor. Appl. Genet. *133*, 383–393.

Hammac, W.A., Maaz, T.M., Koenig, R.T., Burke, I.C., and Pan, W.L. (2017). Water and Temperature Stresses Impact Canola (Brassica napus L.) Fatty Acid, Protein, and Yield over Nitrogen and Sulfur. J. Agric. Food Chem. *65*, 10429–10438.

Hasan, M., Seyis, F., Badani, A.G., Pons-Kühnemann, J., Friedt, W., Lühs, W., and Snowdon, R.J. (2006). Analysis of genetic diversity in the Brassica napus L. gene pool using SSR markers. Genet. Resour. Crop Evol. *53*, 793–802.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M.M., Roychowdhury, R., and Fujita, M. (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. Int. J. Mol. Sci. *14*, 9643–9684.

Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Mahmud, J.A., Nahar, K., Mohsin, S.M., Parvin, K., and Fujita, M. (2018). Interaction of sulfur with phytohormones and signaling molecules in conferring abiotic stress tolerance to plants. Plant Signal. Behav. *13*, 1–5.

Hassan, M.U., Chattha, M.U., Khan, I., Chattha, M.B., Barbanti, L., Aamer, M., Iqbal, M.M., Nawaz, M., Mahmood, A., Ali, A., et al. (2021). Heat stress in cultivated plants: nature, impact, mechanisms, and mitigation strategies—a review. Plant Biosyst. - An Int. J. Deal. with All Asp. Plant Biol. *155*, 211–234.

Hatzig, S. V., Nuppenau, J.N., Snowdon, R.J., and Schießl, S. V. (2018). Drought stress has transgenerational effects on seeds and seedlings in winter oilseed rape (Brassica napus L.). BMC Plant Biol. *18*, 1–13.

Henriques, R., and Madeira, S.C. (2014). BicPAM: Pattern-based biclustering for biomedical data analysis. Algorithms Mol. Biol. *9*, 1–30.

Henry, R.J. (2020). Innovations in plant genetics adapting agriculture to climate change. Curr. Opin. Plant Biol. *56*, 168–173.

Herman, J.J., and Sultan, S.E. (2011). Adaptive transgenerational plasticity in plants: Case studies, mechanisms, and implications for natural populations. Front. Plant Sci. *2*, 1–10.

Hilker, M., and Schmülling, T. (2019). Stress priming, memory, and signalling in plants. Plant Cell Environ. *42*, 753–761.

Hills, P.N., and Van Staden, J. (2003). Thermoinhibition of seed germination. South African J. Bot. *69*, 455–461.

Hoegh-Guldberg, O., Jacob, D., Taylor, M., Bindi, M., Brown, S., Camilloni, I., and Zhou, G., et al. (2018). Impacts of 1.5°C Global Warming on Natural and Human Systems. In Global Warming of 1.5°C, V. Masson-Delmotte, P. Zhai, H. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, et al., eds. pp. 175–312.

Holzkämper, A., Calanca, P., and Fuhrer, J. (2013). Identifying climatic limitations to grain maize yield potentials using a suitability evaluation approach. Agric. For. Meteorol. *168*, 149–159.

Holzworth, D.P., Huth, N.I., deVoil, P.G., Zurcher, E.J., Herrmann, N.I., McLean, G., Chenu, K., van Oosterom, E.J., Snow, V., Murphy, C., et al. (2014). APSIM - Evolution towards a new generation of agricultural systems simulation. Environ. Model. Softw. *62*, 327–350.

Huang, R., Liu, Z., Xing, M., Yang, Y., Wu, X., Liu, H., and Liang, W. (2019). Heat Stress Suppresses Brassica napus Seed Oil Accumulation by Inhibition of Photosynthesis and BnWRI1 Pathway. Plant Cell Physiol. *60*, 1457–1470.

Hundal, S., Singh, H., Kaur, P., and Dhaliwal, L. (2003). Agroclimatic models for growth and yield of soybean (Glycine max L) using agroclimatic models. Indian J. Agric. Sci. *73*, 668–670.

IPCC (2021). Intergovernmental Panel on Climate Change Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Summary for Policymakers.

Iwasaki, M., and Paszkowski, J. (2014). Epigenetic memory in plants. EMBO J. *33*, 1987–1998.

Jagadish, S.V.K., Pal, M., Sukumaran, S., Parani, M., and Siddique, K.H.M. (2020). Heat stress resilient crops for future hotter environments. Plant Physiol. Reports *25*, 529–532.

Janni, M., Gullì, M., Maestri, E., Marmiroli, M., Valliyodan, B., Nguyen, H.T., Marmiroli, N., and Foyer, C. (2020). Molecular and genetic bases of heat stress responses in crop plants and breeding for increased resilience and productivity. J. Exp. Bot. *71*, 3780–3802.

Jeuffroy, M.H., Valantin-Morison, M., Saulas, L., and Champolivier, L. (2003). Azodyn-Rape: a simple model for decision support in rapeseed nitrogen fertilisation. GCIRC 11eme Congr. Internatioanl Du Colza 2001–2003.

Jha, U.C., Bohra, A., and Singh, N.P. (2014). Heat stress in crop plants: Its nature, impacts and integrated breeding strategies to improve heat tolerance. Plant Breed. *133*, 679–701.

Jones, J.W., Antle, J.M., Basso, B., Boote, K.J., Conant, R.T., Foster, I., Godfray, H.C.J., Herrero, M., Howitt, R.E., Janssen, S., et al. (2017). Brief history of agricultural systems modeling. Agric. Syst. *155*, 240–254.

Jullien, A., Mathieu, A., Allirand, J.M., Pinet, A., De Reffye, P., Cournède, P.H., and Ney, B. (2011). Characterization of the interactions between architecture and sourcesink relationships in winter oilseed rape (Brassica napus) using the GreenLab model. Ann. Bot. *107*, 765–779.

Juniarta, N. (2019). Fouille de données complexes et biclustering avec l'analyse formelle de concepts. Thèse de doctorat, 131p.

Kakoulidou, I., Avramidou, E. V., Baránek, M., Brunel-muguet, S., Farrona, S., Johannes, F., Kaiserli, E., Lieberman-lazarovich, M., Martinelli, F., Mladenov, V., et al. (2021). Epigenetics for crop improvement in times of global change. Biology (Basel). *10*, 1–46.

Kambhampati, S., Aznar-Moreno, J.A., Hostetler, C., Caso, T., Bailey, S.R., Hubbard, A.H., Durrett, T.P., and Allen, D.K. (2020). On the inverse correlation of protein and oil: Examining the effects of altered central carbon metabolism on seed composition using soybean fast neutron mutants. Metabolites *10*, 1–15.

Kim, Y.K., Chae, S., Oh, N.I., Nguyen, N.H., and Cheong, J.J. (2020). Recurrent Drought Conditions Enhance the Induction of Drought Stress Memory Genes in Glycine max L. Front. Genet. *11*, 1–9.

Kinoshita, T., and Seki, M. (2014). Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants. Plant Cell Physiol. *55*, 1859–1863.

Kopriva, S., Talukdar, D., Takahashi, H., Hell, R., Sirko, A., D'Souza, S.F., and Talukdar, T. (2016). Editorial: Frontiers of Sulfur Metabolism in Plant Growth, Development, and Stress Response. Front. Plant Sci. *6*, 1220.

Koscielny, C.B., Gardner, S.W., and Duncan, R.W. (2018). Impact of high temperature on heterosis and general combining ability in spring canola (Brassica napus L.). F. Crop. Res. *221*, 61–70.

Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E., and Scharf, K.D. (2007). Complexity of the heat stress response in plants. Curr. Opin. Plant Biol. *10*, 310–316.

Kourani, M., Mohareb, F., Rezwan, F.I., Anastasiadi, M., and Hammond, J.P. (2022). Genetic and Physiological Responses to Heat Stress in Brassica napus. Front. Plant Sci. *13*, 1–20.

Krishnan, H.B., Kim, W.S., Oehrle, N.W., Smith, J.R., and Gillman, J.D. (2020). Effect of heat stress on seed protein composition and ultrastructure of protein storage vacuoles in the cotyledonary parenchyma cells of soybean genotypes that are either tolerant or sensitive to elevated temperatures. Int. J. Mol. Sci. *21*, 1–16.

Kumar, M. (2016). Impact of climate change on crop yield and role of model for achieving food security. Environ. Monit. Assess. *188*.

Kumar, S. (2018a). Epigenomics of Plant Responses to Environmental Stress. Epigenomes *2*, 6.

Kumar, S. (2018b). Epigenetic memory of stress responses in plants. J. Phytochem. Biochem *2*, e102.

Kumar, N., Jeena, N., and Singh, H. (2019). Elevated temperature modulates rice pollen structure: a study from foothill of Himalayan agro-ecosystem in India. 3 Biotech *9*.

Kutcher, H.R., Warland, J.S., and Brandt, S.A. (2010). Temperature and precipitation effects on canola yields in

Saskatchewan, Canada. Agric. For. Meteorol. *150*, 161–165.

Labra, M.H., Struik, P.C., Evers, J.B., and Calderini, D.F. (2017). Plasticity of seed weight compensates reductions in seed number of oilseed rape in response to shading at flowering. Eur. J. Agron. *84*, 113–124.

Lämke, J., and Bäurle, I. (2017). Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. Genome Biol. *18*.

Lämke, J., Brzezinka, K., Altmann, S., and Bäurle, I. (2016). A hit-and-run heat shock factor governs sustained histone methylation and transcriptional stress memory. EMBO J. *35*, 162–175.

Lancashire, P.D., Bleiholder, H., Boom, T. V., Langeluddeke, P., Stauss, R., Weber, E., and Witzenberger, A. (1991). A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. Ann. Appl. Biol. *119*, 561–601.

Laperche, A. (2021). Analyse des déterminants génétiques et écophysiologiques des interactions génotype x environnement abiotique et de leur valorisation pour des systèmes agroécologiques. Manuscrit d'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR).

Larkindale, J., and Huang, B. (2005). Effects of abscisic acid, salicylic acid, ethylene and hydrogen peroxide in thermotolerance and recovery for creeping bentgrass. Plant Growth Regul. *47*, 17–28.

Lee, S., and Park, C.-M. (2010). Modulation of reactive oxygen species by salicylic acid in arabidopsis seed germination under high salinity. Plant Signal. Behav. *5*, 1534.

Lemonsu, A., Beaulant, A.L., Somot, S., and Masson, V. (2014). Evolution of heat wave occurrence over the Paris basin (France) in the 21st century. Clim. Res. *61*, 75–91.

Leprince, O., Pellizzaro, A., Berriri, S., and Buitink, J. (2017). Late seed maturation: Drying without dying. J. Exp. Bot. *68*, 827–841.

Leterme (1985). Modélisation de la croissance et de la production des siliques chez le colza d'hiver. Thèse de Docteur Ingénieur. Institut National Agronomique Paris-Grignon. 114.

Ling, L., Jiangang, L., Minchong, S., Chunlei, Z., and Yuanhua, D. (2015). Cold plasma treatment enhances oilseed rape seed germination under drought stress. Sci. Rep. *5*, 13033.

Liu, H., Able, A.J., and Able, J.A. (2021a). Priming crops for the future : rewiring stress memory. Trends Plant Sci. *xx*, 1–18.

Liu, H., Able, A.J., and Able, J.A. (2021b). Small rna, transcriptome and degradome analysis of the transgenerational heat stress response network in durum wheat. Int. J. Mol. Sci. *22*.

Liu, H., Able, A.J., and Able, J.A. (2021c). Small RNAs and their targets are associated with the transgenerational effects of water-deficit stress in durum wheat. Sci. Rep. *11*, 1–17.

Liu, J., Feng, L., Gu, X., Deng, X., Qiu, Q., Li, Q., Zhang, Y., Wang, M., Deng, Y., Wang, E., et al. (2019a). An H3K27me3 demethylase-HSFA2 regulatory loop orchestrates transgenerational thermomemory in Arabidopsis. Cell Res. *29*, 379–390.

Liu, L., Liu, F., Chu, J., Yi, X., Fan, W., Tang, T., Chen, G., Guo, Q., and Zhao, X. (2019b). A transcriptome analysis reveals a role for the indole GLS-linked auxin biosynthesis in secondary dormancy in rapeseed (Brassica napus L.). BMC Plant Biol. *19*, 1–18.

Lobell, D.B., and Field, C.B. (2007). Global scale climate-crop yield relationships and the impacts of recent warming. Environ. Res. Lett. *2*.

Luo, Q., Bellotti, W., Hayman, P., Williams, M., and Devoil, P. (2010). Effects of changes in climatic variability on agricultural production. Clim. Res. *42*, 111–117.

Mácová, K., Prabhullachandran, U., Štefková, M., Spyroglou, I., Pěnčík, A., Endlová, L., Novák, O., and Robert, H.S. (2022). Long-Term High-Temperature Stress Impacts on Embryo and Seed Development in Brassica napus. Front. Plant Sci. *13*.

Madeira, S.C., and Oliveira, A.L. (2004). Biclustering algorithms for biological data analysis: A survey. IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinforma. *1*, 24–45.

Magno, L., Avice, J.C., Morvan-Bertrand, A., Wagner, M.H., González-Centeno, M.R., Teissedre, P.L., Bessoule, J.J., Le Guédard, M., Kim, T.H., Mollier, A., et al. (2021). High temperature patterns at the onset of seed maturation determine seed yield and quality in oilseed rape (Brassica napus L.) in relation to sulphur nutrition. Environ. Exp. Bot. *185*.

Magno, L., Coulon, M., Avice, J.-C., Morvan-Bertrand, A., Bessoule, J.-J., Le Guédard, M., Kim, T.H., Niare, A., Mollier, A., Bertin, N., et al. (2022a). Effects of two-generational heat stress exposure at the onset of seed maturation on seed yield and quality in Brassica napus L. Environ. Exp. Bot. *195*, 104788.

Magno, L., Corlouer, E., Laperche, A., Nesi, N., Mollier, A., and Brunel-muguet, S. (2022b). To what extent can ecoclimatic indicators assist crop performance predictions in oilseed rape upon repeated heat stresses? Eur. J. Agron. *141*, 126622.

Magno, L., Coquemont-Guyot, M., Elie, N., Morvan-Bertrand, A., Avice, J.-C., Mollier, A., and Brunel-Muguet, S. (2022c). Repeated heat stress events during the reproductive phase impact the dynamic development of seeds in Brassica napus L. Article soumis le 05 septembre 2022 dans Plant Science.

Marchand, L., Pelosi, C., González-Centeno, M.R., Maillard, A., Ourry, A., Galland, W., Teissedre, P.-L., Bessoule, J.-J., Mongrand, S., Morvan-Bertrand, A., et al. (2016). Trace element bioavailability, yield and seed quality of rapeseed (Brassica napus L.) modulated by biochar incorporation into a contaminated technosol. Chemosphere *156*.

Mareri, L., and Cai, G. (2022). Pollen priming for more efficient reproduction in a heating world: what we know, what we need to know. Plant Stress *3*, 100060.

Marquez, V., and Beccaria, A. (2020). Application of Oil Red O staining in oleaginous microalgae: practical uses in screening and lipid quantification of different species. J. Appl. Phycol. *32*, 1755–1761.

Martre, P., Wallach, D., Asseng, S., Ewert, F., Jones, J.W., Rötter, R.P., Boote, K.J., Ruane, A.C., Thorburn, P.J., Cammarano, D., et al. (2015). Multimodel ensembles of wheat growth: Many models are better than one. Glob. Chang. Biol. *21*, 911–925.

Mathieu, J.A., and Aires, F. (2018). Assessment of the agro-climatic indices to improve crop yield forecasting. Agric. For. Meteorol. *253–254*, 15–30.

Mehlem, A., Hagberg, C.E., Muhl, L., Eriksson, U., and Falkevall, A. (2013). Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. Nat. Protoc. *8*, 1149–1154.

Menard, G.N., Moreno, J.M., Bryant, F.M., Munoz-Azcarate, O., Kelly, A.A., Hassani-Pak, K., Kurup, S., and Eastmond, P.J. (2017). Genome wide analysis of fatty acid desaturation and its response to temperature. Plant Physiol. *173*, 1594–1605.

Meng, J., Wang, L., Wang, J., Zhao, X., Cheng, J., Yu, W., Jin, D., Li, Q., and Gong, Z. (2018). METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE 4 mediates DNA and histone methylation. Plant Physiol. *177*, pp.00183.2018.

Migicovsky, Z., Yao, Y., and Kovalchuk, I. (2014). Transgenerational phenotypic and epigenetic changes in response to heat stress in Arabidopsis thaliana. Plant Signal. Behav. *9*.

Molinier, J., Ries, G., Zipfel, C., and Hohn, B. (2006). Transgeneration memory of stress in plants. Nature *442*, 1046–1049.

Momoh, E.J.J., Zhou, W.J., and Kristiansson, B. (2002). Variation in the development of secondary dormancy in oilseed rape genotypes under conditions of stress. Weed Res. *42*, 446–455.

Morrison, M.J., and Stewart, D.W. (2002). Heat stress during flowering in summer Brassica. Crop Sci. *42*, 797–803.

Mukwevho, E., Ferreira, Z., and Ayeleso, A. (2014). Potential Role of Sulfur-Containing Antioxidant Systems in Highly Oxidative Environments. Mol. 2014, Vol. 19, Pages 19376-19389 *19*, 19376–19389.

Najafabadi, M.Y., and Ehsanzadeh, P. (2017). Salicylic acid effects on osmoregulation and seed yield in drought-stressed sesame. Agron. J. *109*, 1414–1422.

Nasrullah, M., Rizwanullah, M., Yu, X., Jo, H., Sohail, M.T., and Liang, L. (2021). Autoregressive distributed lag (Ardl) approach to study the impact of climate change and other factors on rice production in South Korea. J. Water Clim. Chang. *12*, 2256–2270.

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

Nishizawa, A., Yabuta, Y., and Shigeoka, S. (2008). Galactinol and Raffinose Constitute a Novel Function to Protect Plants from Oxidative Damage. Plant Physiol. *147*, 1251–1263.

Niu, Y., Wu, G.-Z., Ye, R., Lin, W.-H., Shi, Q.-M., Xue, L.-J., Xu, X.-D., Li, Y., Du, Y.-G., and Xue, H.-W. (2009). Global Analysis of Gene Expression Profiles in Brassica napus Developing Seeds Reveals a Conserved Lipid Metabolism Regulation with Arabidopsis thaliana. Mol. Plant *2*, 1107–1122.

Oenema, O., and Postma, R. (2003). Managing Sulphur in Agroecosystems BT - Sulphur in Plants. Y.P. Abrol, and A. Ahmad, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 45–70.

Ohama, N., Sato, H., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Lesk, C., al., et, Lobell, D.B., al., et, Hasanuzzaman, M., al., et, et al. (2016). Transcriptional Regulatory Network of Plant Heat Stress Response. Trends Plant Sci. *0*,

84–87.

Olesen, J.E., Trnka, M., Kersebaum, K.C., Skjelvåg, A.O., Seguin, B., Peltonen-Sainio, P., Rossi, F., Kozyra, J., and Micale, F. (2011). Impacts and adaptation of European crop production systems to climate change. Eur. J. Agron. *34*, 96–112.

Ostmeyer, T., Parker, N., Jaenisch, B., Alkotami, L., Bustamante, C., and Jagadish, S.V.K. (2020). Impacts of heat, drought, and their interaction with nutrients on physiology, grain yield, and quality in field crops. Plant Physiol. Reports *25*, 549–568.

Ou, X., Zhang, Y., Xu, C., Lin, X., Zang, Q., Zhuang, T., Jiang, L., von Wettstein, D., and Liu, B. (2012). Transgenerational Inheritance of Modified DNA Methylation Patterns and Enhanced Tolerance Induced by Heavy Metal Stress in Rice (Oryza sativa L.). PLoS One *7*.

Ouzeau, G., Déqué, M., Jouini, M., Planton, S., and Vautard, R. (2014). Le climat de la France au XXIe siècle, Volume 4. Rapp. La Dir. Générale l'Énergie Du Clim. *98*, 127–128.

Pan, X., Welti, R., and Wang, X. (2010). Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. Nat. Protoc. *5*, 986–992.

Pastor, V., Luna, E., Mauch-Mani, B., Ton, J., and Flors, V. (2013). Primed plants do not forget. Environ. Exp. Bot. *94*, 46–56.

Peer, L.A., Dar, Z.A., Lone, A.A., Bhat, M.Y., and Ahamad, N. (2020). High temperature triggered plant responses from whole plant to cellular level. Plant Physiol. Reports *25*, 611–626.

Pekrun, C., Lutman, P.J.W., and Baeumer, K. (1997). Germination behaviour of dormant oilseed rape seeds in relation to temperature. Weed Res. *37*, 419–431.

Peltonen-Sainio, P., Jauhiainen, L., Trnka, M., Olesen, J.E., Calanca, P., Eckersten, H., Eitzinger, J., Gobin, A., Kersebaum, K.C., Kozyra, J., et al. (2010). Coincidence of variation in yield and climate in Europe. Agric. Ecosyst. Environ. *139*, 483–489.

Pereyra-Irujo, G.A., and Aguirrezábal, L.A.N. (2007). Sunflower yield and oil quality interactions and variability: Analysis through a simple simulation model. Agric. For. Meteorol. *143*, 252–265.

Perkins-Kirkpatrick, S.E., and Lewis, S.C. (2020). Increasing trends in regional heatwaves. Nat. Commun. *11*, 1–8.

Piper, E.L., and Boote, K.J. (1999). Temperature and cultivar effects on soybean seed oil and protein concentrations. JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc. *76*, 1233–1241.

Poisson, E. (2018). Optimisation de la fertilisation soufrée pour améliorer le rendement et la qualité grainière du colza : impacts des interactions Soufre / Azote et du changement climatique , identifications d' idéotypes. Thèse de doctorat, 174p.

Poisson, E., Brunel-Muguet, S., Kauffmann, F., Trouverie, J., Avice, J.C., and Mollier, A. (2018). Sensitivity analyses for improving sulfur management strategies in winter oilseed rape. PLoS One *13*.

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*.

Prerostova, S., Dobrev, P.I., Kramna, B., Gaudinova, A., Knirsch, V., Spichal, L., Zatloukal, M., and Vankova, R. (2020). Heat Acclimation and Inhibition of Cytokinin Degradation Positively Affect Heat Stress Tolerance of Arabidopsis. Front. Plant Sci. *11*, 1–14.

Probst, A. V., and Mittelsten Scheid, O. (2015). Stress-induced structural changes in plant chromatin. Curr. Opin. Plant Biol. *27*, 8–16.

Puchtler, H., Meloan, S.N., and Brewton, B.R. (1975). On the history of basic fuchsin and aldehyde-schiff reactions from 1862 to 1935. Histochemistry *41*, 185–194.

Pullens, J.W.M., Sharif, B., Trnka, M., Balek, J., Semenov, M.A., and Olesen, J.E. (2019). Risk factors for European winter oilseed rape production under climate change. Agric. For. Meteorol. *272–273*, 30–39.

Pullens, J.W.M., Kersebaum, K.C., Böttcher, U., Kage, H., and Olesen, J.E. (2021). Model sensitivity of simulated yield of winter oilseed rape to climate change scenarios in Europe. Eur. J. Agron. *129*.

Racette, K., Rowland, D., Tillman, B., Erickson, J., Munoz, P., and Vermerris, W. (2019). Transgenerational stress memory in seed and seedling vigor of peanut (Arachis hypogaea L.) varies by genotype. Environ. Exp. Bot. *162*, 541–549.

Rasmann, S., De Vos, M., Casteel, C.L., Tian, D., Halitschke, R., Sun, J.Y., Agrawal, A.A., Felton, G.W., and Jander, G. (2012). Herbivory in the previous generation primes plants for enhanced insect resistance. Plant Physiol. *158*,

854–863.

Ray, D.K., Gerber, J.S., Macdonald, G.K., and West, P.C. (2015). Climate variation explains a third of global crop yield variability. Nat. Commun. *6*, 1–9.

Righetti, K., Vu, J.L., Pelletier, S., Vu, B.L., Glaab, E., Lalanne, D., Pasha, A., Patel, R. V, Provart, N.J., Verdier, J., et al. (2015). Inference of Longevity-Related Genes from a Robust Coexpression Network of Seed Maturation Identifies Regulators Linking Seed Storability to Biotic Defense-Related Pathways. Plant Cell *27*, 2692 LP – 2708.

Robertson, M.J., and Lilley, J.M. (2016). Simulation of growth, development and yield of canola (Brassica napus) in APSIM. Crop Pasture Sci. *67*, 332–344.

Rolletschek, H., Weber, H., and Borisjuk, L. (2003). Energy status and its control on embryogenesis of legumes. Embryo photosynthesis contributes to oxygen supply and is coupled to biosynthetic fluxes. Plant Physiol. *132*, 1196–1206.

Rolletschek, H., Borisjuk, L., Sánchez-García, A., Gotor, C., Romero, L.C., Martínez-Rivas, J.M., and Mancha, M. (2007). Temperature-dependent endogenous oxygen concentration regulates microsomal oleate desaturase in developing sunflower seeds. J. Exp. Bot. *58*, 3171–3181.

Rötter, R.P., Carter, T.R., Olesen, J.E., and Porter, J.R. (2011). Crop-climate models need an overhaul. Nat. Clim. Chang. *1*, 175–177.

Rötter, R.P., Höhn, J., Trnka, M., Fronzek, S., Carter, T.R., and Kahiluoto, H. (2013). Modelling shifts in agroclimate and crop cultivar response under climate change. Ecol. Evol. *3*, 4197–4214.

Ruuska, S.A., Girke, T., Benning, C., and Ohlrogge, J.B. (2002). Contrapuntal Networks of Gene Expression during Arabidopsis Seed Filling. Plant Cell *14*, 1191–1206.

Sage, T.L., Bagha, S., Lundsgaard-Nielsen, V., Branch, H.A., Sultmanis, S., and Sage, R.F. (2015). The effect of high temperature stress on male and female reproduction in plants. F. Crop. Res. *182*, 30–42.

Saidi, Y., Finka, A., and Goloubinoff, P. (2011). Heat perception and signalling in plants: A tortuous path to thermotolerance. New Phytol. *190*, 556–565.

Salvucci, M.E., and Crafts-Brandner, S. (2004). Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. Physiol. Plant. *120 2*, 179–186.

Saseendran, S.A., Nielsen, D.C., Ma, L., and Ahuja, L.R. (2010). Adapting CROPGRO for simulating spring canola growth with both RZWQM2 and DSSAT 4.0. Agron. J. *102*, 1606–1621.

Scherer, H.W. (2001). Sulphur in crop production - Invited paper. Eur. J. Agron. *14*, 81–111.

Schiebold, S., Tschiersch, H., Borisjuk, L., Heinzel, N., Radchuk, R., and Rolletschek, H. (2011). A novel procedure for the quantitative analysis of metabolites, storage products and transcripts of laser microdissected seed tissues of Brassica napus. Plant Methods *7*.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat. Methods *9*, 676–682.

Schulte, L.R., Ballard, T., Samarakoon, T., Yao, L., Vadlani, P., Staggenborg, S., and Rezac, M. (2013). Increased growing temperature reduces content of polyunsaturated fatty acids in four oilseed crops. Ind. Crops Prod. *51*, 212–219.

Seneviratne, S.I., Nicholls, N., Easterling, D., Goodess, C.M., Kanae, S., Kossin, J., Luo, Y., Marengo, J., Mc Innes, K., Rahimi, M., et al. (2012). Changes in climate extremes and their impacts on the natural physical environment. Manag. Risks Extrem. Events Disasters to Adv. Clim. Chang. Adapt. Spec. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang. *9781107025*, 109–230.

Serrano, N., Ling, Y., Bahieldin, A., and Mahfouz, M.M. (2019). Thermopriming reprograms metabolic homeostasis to confer heat tolerance. Sci. Rep. *9*, 1–15.

Sharma, M., and Laxmi, A. (2016). Jasmonates: Emerging Players in Controlling Temperature Stress Tolerance. Front. Plant Sci. *6*, 1129.

Sharma, D.K., Andersen, S.B., Ottosen, C.O., and Rosenqvist, E. (2015). Wheat cultivars selected for high Fv/Fm under heat stress maintain high photosynthesis, total chlorophyll, stomatal conductance, transpiration and dry matter. Physiol. Plant. *153*, 284–298.

Shekhawat, K., Almeida-Trapp, M., García-Ramírez, G.X., and Hirt, H. (2022). Beat the heat: plant- and microbe-mediated strategies for crop thermotolerance. Trends Plant Sci. 1–12.

Shi, W., Lawas, L.M.F., Raju, B.R., and Jagadish, S.V.K. (2016). Acquired Thermo-Tolerance and Trans-Generational

Heat Stress Response at Flowering in Rice. J. Agron. Crop Sci. *202*, 309–319.

Shu, K., Liu, X., Xie, Q., and He, Z. (2016). Two Faces of One Seed: Hormonal Regulation of Dormancy and Germination. Mol. Plant *9*, 34–45.

Si, P., Mailer, R.J., Galwey, N., and Turner, D.W. (2003). Influence of genotype and environment on oil and protein concentrations of canola (Brassica napus L.) grown across southern Australia. Aust. J. Agric. Res. *54*, 397–407.

Siddiqui, M.H., Al-Khaishany, M.Y., Al-Qutami, M.A., Al-Whaibi, M.H., Grover, A., Ali, H.M., and Al-Wahibi, M.S. (2015). Morphological and physiological characterization of different genotypes of faba bean under heat stress. Saudi J. Biol. Sci. *22*, 656–663.

da Silva, P.M.F.R., Eastmond, P.J., Hill, L.M., Smith, A.M., and Rawsthorne, S. (1997). Starch metabolism in developing embryos of oilseed rape. Planta *203*, 480–487.

Simopoulos, A.P. (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. Biomed. Pharmacother. *60*, 502–507.

Singh, A.K., Dhanapal, S., Finkelshtein, A., and Chamovitz, D.A. (2021). Csn5a subunit of cop9 signalosome is required for resetting transcriptional stress memory after recurrent heat stress in arabidopsis. Biomolecules *11*.

Sinsawat, V., Leipner, J., Stamp, P., and Fracheboud, Y. (2004). Effect of heat stress on the photosynthetic apparatus in maize (Zea mays L.) grown at control or high temperature. Environ. Exp. Bot. *52*, 123–129.

Slafer, G.A., Savin, R., and Sadras, V.O. (2014). Coarse and fine regulation of wheat yield components in response to genotype and environment. F. Crop. Res. *157*, 71–83.

Smith, N.G., and Dukes, J.S. (2013). Plant respiration and photosynthesis in global-scale models: Incorporating acclimation to temperature and CO2. Glob. Chang. Biol. *19*, 45–63.

Soares, C., Carvalho, M.E.A., Azevedo, R.A., and Fidalgo, F. (2019a). Plants facing oxidative challenges—A little help from the antioxidant networks. Environ. Exp. Bot. *161*, 4–25.

Soares, J.C., Santos, C.S., Carvalho, S.M.P., Pintado, M.M., and Vasconcelos, M.W. (2019b). Preserving the nutritional quality of crop plants under a changing climate: importance and strategies. Plant Soil *443*, 1–26.

Soengas, P., Rodríguez, V.M., Velasco, P., and Cartea, M.E. (2018). Effect of Temperature Stress on Antioxidant Defenses in Brassica oleracea. ACS Omega *3*, 5237–5243.

Song, Z.T., Zhang, L.L., Han, J.J., Zhou, M., and Liu, J.X. (2021). Histone H3K4 methyltransferases SDG25 and ATX1 maintain heat-stress gene expression during recovery in Arabidopsis. Plant J. *105*, 1326–1338.

Suarez, F.L., Springfield, J., Furne, J.K., Lohrmann, T.T., Kerr, P.S., and Levitt, M.D. (1999). Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides. Am. J. Clin. Nutr. *69*, 135–139.

Sun, M., Jiang, F., Zhou, R., Wen, J., Cui, S., Wang, W., and Wu, Z. (2019). Respiratory burst oxidase homologue-dependent H2O2 is essential during heat stress memory in heat sensitive tomato. Sci. Hortic. (Amsterdam). *258*, 108777.

Sung, D.Y., Kaplan, F., Lee, K.J., and Guy, C.L. (2003). Acquired tolerance to temperature extremes. Trends Plant Sci. *8*, 179–187.

Suter, L., and Widmer, A. (2013). Environmental Heat and Salt Stress Induce Transgenerational Phenotypic Changes in Arabidopsis thaliana. PLoS One *8*.

Szydłowska-Czerniak, A., Amarowicz, R., and Szłyk, E. (2010). Antioxidant capacity of rapeseed meal and rapeseed oils enriched with meal extract. Eur. J. Lipid Sci. Technol. *112*, 750–760.

Tankari, M., Wang, C., Ma, H., Li, X., Li, L., Soothar, R.K., Cui, N., Zaman-Allah, M., Hao, W., Liu, F., et al. (2021). Drought priming improved water status, photosynthesis and water productivity of cowpea during post-anthesis drought stress. Agric. Water Manag. *245*.

Tao, F., Rötter, R.P., Palosuo, T., Gregorio Hernández Díaz-Ambrona, C., Mínguez, M.I., Semenov, M.A., Kersebaum, K.C., Nendel, C., Specka, X., Hoffmann, H., et al. (2018). Contribution of crop model structure, parameters and climate projections to uncertainty in climate change impact assessments. Glob. Chang. Biol. *24*, 1291–1307.

Toh, S., Kamiya, Y., Kawakami, N., Nambara, E., McCourt, P., and Tsuchiya, Y. (2012). Thermoinhibition uncovers a role for strigolactones in arabidopsis seed germination. Plant Cell Physiol. *53*, 107–117.

Trnka, M., Olesen, J.E., Kersebaum, K.C., Skjelvåg, A.O., Eitzinger, J., Seguin, B., Peltonen-Sainio, P., Rötter, R., Iglesias, A., Orlandini, S., et al. (2011). Agroclimatic conditions in Europe under climate change. Glob. Chang. Biol. *17*, 2298–2318.

Trnka, M., Rötter, R.P., Ruiz-Ramos, M., Kersebaum, K.C., Olesen, J.E., Žalud, Z., and Semenov, M.A. (2014). Adverse weather conditions for European wheat production will become more frequent with climate change. Nat. Clim. Chang. *4*, 637–643.

Tschiersch, H., Borisjuk, L., Rutten, T., and Rolletschek, H. (2011). Gradients of seed photosynthesis and its role for oxygen balancing. BioSystems *103*, 302–308.

Tuan, P.A., Yamasaki, Y., Kanno, Y., Seo, M., and Ayele, B.T. (2019). Transcriptomics of cytokinin and auxin metabolism and signaling genes during seed maturation in dormant and non-dormant wheat genotypes. Sci. Rep. *9*, 1–7.

Vancostenoble, B., Blanchet, N., Langlade, N.B., and Bailly, C. (2022). Maternal drought stress induces abiotic stress tolerance to the progeny at the germination stage in sunflower. Environ. Exp. Bot. *201*, 104939.

Vanuytrecht, E., and Thorburn, P.J. (2017). Responses to atmospheric CO2 concentrations in crop simulation models: a review of current simple and semicomplex representations and options for model development. Glob. Chang. Biol. *23*, 1806–1820.

Verma, S., Kumar, N., Verma, A., Singh, H., Siddique, K.H.M., and Singh, N.P. (2020). Novel approaches to mitigate heat stress impacts on crop growth and development. Plant Physiol. Reports *25*, 627–644.

Verslues, P.E., and Juenger, T.E. (2011). Drought, metabolites, and Arabidopsis natural variation: A promising combination for understanding adaptation to water-limited environments. Curr. Opin. Plant Biol. *14*, 240–245.

Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. *42*, 579–620.

Villegente, M., Marmey, P., Job, C., Galland, M., Cueff, G., Godin, B., Rajjou, L., Balliau, T., Zivy, M., Fogliani, B., et al. (2017). A combination of histological, physiological, and proteomic approaches shed light on seed desiccation tolerance of the basal angiosperm Amborella trichopoda. Proteomes *5*, 2–6.

Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., and Foolad, M.R. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. Environ. Exp. Bot. *61*, 199–223.

Wang, E., Martre, P., Zhao, Z., Ewert, F., Maiorano, A., Rötter, R.P., Kimball, B.A., Ottman, M.J., Wall, G.W., White, J.W., et al. (2017a). The uncertainty of crop yield projections is reduced by improved temperature response functions. Nat. Plants *3*.

Wang, X., Cai, J., Jiang, D., Liu, F., Dai, T., and Cao, W. (2011). Pre-anthesis high-temperature acclimation alleviates damage to the flag leaf caused by post-anthesis heat stress in wheat. J. Plant Physiol. *168*, 585–593.

Wang, X., Cai, J., Liu, F., Dai, T., Cao, W., Wollenweber, B., and Jiang, D. (2014). Multiple heat priming enhances thermo-tolerance to a later high temperature stress via improving subcellular antioxidant activities in wheat seedlings. Plant Physiol. Biochem. *74*, 185–192.

Wang, X., Xin, C., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T., Cao, W., and Jiang, D. (2016). Heat Priming Induces Trans-generational Tolerance to High Temperature Stress in Wheat. Front. Plant Sci. *7*, 1–12.

Wang, X., Liu, F. lai, and Jiang, D. (2017b). Priming: A promising strategy for crop production in response to future climate. J. Integr. Agric. *16*, 2709–2716.

Wang, X., Zhang, X., Chen, J., Wang, X., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T., Cao, W., and Jiang, D. (2018). Parental drought-priming enhances tolerance to post-anthesis drought in offspring of wheat. Front. Plant Sci. *9*, 1–13.

Wang, X., Mao, Z., Zhang, J., Hemat, M., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T., and Jiang, D. (2019). Osmolyte accumulation plays important roles in the drought priming induced tolerance to post-anthesis drought stress in winter wheat (Triticum aestivum L.). Environ. Exp. Bot. *166*, 103804.

Wang, X., Chen, J., Ge, J., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T., Mur, L.A.J., and Jiang, D. (2021a). The different root apex zones contribute to drought priming induced tolerance to a reoccurring drought stress in wheat. Crop J. *9*, 1088–1097.

Wang, X., Li, Q., Xie, J., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T., and Jiang, D. (2021b). Abscisic acid and jasmonic acid are involved in drought priming-induced tolerance to drought in wheat. Crop J. *9*, 120–132.

Weymann, W., Böttcher, U., Sieling, K., and Kage, H. (2015). Effects of weather conditions during different growth phases on yield formation of winter oilseed rape. F. Crop. Res. *173*, 41–48.

Wheeler, T.R., Craufurd, P.Q., Ellis, R.H., Porter, J.R., and Vara Prasad, P. V. (2000). Temperature variability and the yield of annual crops. Agric. Ecosyst. Environ. *82*, 159–167.

Whittle, C.A., Otto, S.P., Johnston, M.O., and Krochko, J.E. (2009). Adaptive epigenetic memory of ancestral temperature regime in Arabidopsis thaliana. Botany *87*, 650–657.

Wilcox, J., and Makowski, D. (2014). A meta-analysis of the predicted effects of climate change on wheat yields using simulation studies. F. Crop. Res. *156*, 180–190.

Wolkovich, E.M., Cook, B.I., Allen, J.M., Crimmins, T.M., Betancourt, J.L., Travers, S.E., Pau, S., Regetz, J., Davies, T.J., Kraft, N.J.B., et al. (2012). Warming experiments underpredict plant phenological responses to climate change. Nature *485*, 494–497.

Woodfield, H.K., Sturtevant, D., Borisjuk, L., Munz, E., Guschina, I.A., Chapman, K., and Harwood, J.L. (2017). Spatial and temporal mapping of key lipid species in Brassica napus seeds. Plant Physiol. *173*, 1998–2009.

Wu, W., Shah, F., Duncan, R.W., and Ma, B.L. (2020). Grain yield, root growth habit and lodging of eight oilseed rape genotypes in response to a short period of heat stress during flowering. Agric. For. Meteorol. *287*, 107954.

Xia, X.J., Zhou, Y.H., Shi, K., Zhou, J., Foyer, C.H., and Yu, J.Q. (2015). Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. J. Exp. Bot. *66*, 2839–2856.

Xie, Z., Zhang, Z.-L., Hanzlik, S., Cook, E., and Shen, Q.J. (2007). Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible WRKY gene. Plant Mol. Biol. *64*, 293–303.

Yadav, M.R., Choudhary, M., Singh, J., Lal, M.K., Jha, P.K., Udawat, P., Gupta, N.K., Rajput, V.D., Garg, N.K., Maheshwari, C., et al. (2022). Impacts, Tolerance, Adaptation, and Mitigation of Heat Stress on Wheat under Changing Climates. Int. J. Mol. Sci. *23*.

Yadav, N.S., Titov, V., Ayemere, I., Byeon, B., Ilnytskyy, Y., and Kovalchuk, I. (2020). Multigenerational exposure to heat stress induces phenotypic resilience, and genetic and epigenetic variations in Arabidopsis thaliana offspring. BioRxiv 2020.11.30.405365.

Young, L.W., Wilen, R.W., and Bonham-Smith, P.C. (2004). High temperature stress of Brassica napus during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. J. Exp. Bot. *55*, 485–495.

Zhai, S., Song, G., Qin, Y., Ye, X., and Lee, J. (2017). Modeling the impacts of climate change and technical progress on the wheat yield in inland China: An autoregressive distributed lag approach. PLoS One *12*, 1–20.

Zhang, Z. (2016). Variable selection with stepwise and best subset approaches. Ann. Transl. Med. *4*.

Zhang, X., Zhou, Q., Wang, X., Cai, J., Dai, T., Cao, W., and Jiang, D. (2016). Physiological and transcriptional analyses of induced post-anthesis thermo-tolerance by heat-shock pretreatment on germinating seeds of winter wheat. Environ. Exp. Bot. *131*, 181–189.

Zhang, Z., Lu, J., Cong, R., Ren, T., and Li, X. (2017). Evaluating agroclimatic constraints and yield gaps for winter oilseed rape (Brassica napus L.) - A case study. Sci. Rep. *7*, 19–22.

Zhao, C., Liu, B., Piao, S., Wang, X., Lobell, D.B., Huang, Y., Huang, M., Yao, Y., Bassu, S., Ciais, P., et al. (2017). Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *114*, 9326–9331.

Zhao, J., Lu, Z., Wang, L., and Jin, B. (2021). Plant responses to heat stress: Physiology, transcription, noncoding rnas, and epigenetics. Int. J. Mol. Sci. *22*, 1–14.

Zheng, M., Terzaghi, W., Wang, H., and Hua, W. (2022a). Integrated strategies for increasing rapeseed yield. Trends Plant Sci. *27*, 742–745.

Zheng, M., Terzaghi, W., and Wang, H. (2022b). Plant Science increasing rapeseed. Trends Plant Sci. *xx*, 1–4.

Zheng, X., Chen, L., Xia, H., Wei, H., Lou, Q., Li, M., Li, T., and Luo, L. (2017). Transgenerational epimutations induced by multi-generation drought imposition mediate rice plant's adaptation to drought condition. Sci. Rep. *7*, 1–13.

Zhou, L., Yan, T., Chen, X., Li, Z., Wu, D., Hua, S., and Jiang, L. (2018). Effect of high night temperature on storage lipids and transcriptome changes in developing seeds of oilseed rape. J. Exp. Bot. *69*, 1721–1733.

Zhou, R., Yu, X., Li, X., Mendanha dos Santos, T., Rosenqvist, E., and Ottosen, C.O. (2020). Combined high light and heat stress induced complex response in tomato with better leaf cooling after heat priming. Plant Physiol. Biochem. *151*, 1–9.

Sites consultés

AGMIP. Disponible sur < https://agmip.org/ >, consulté le 07/09/2022.

Berkeley Earth (2022). France projections. Disponible sur < http://www.berkeleyearth.org/ >, consulté le 20/06/2022.

BicPAMS. Disponible sur < https://web.ist.utl.pt/rmch/bicpams/ >, consulté le 02/12/2021.

Canola Council of Canada (2022). Canola growth stages. Disponible sur < https://www.canolacouncil.org/canola-encyclopedia/growth-stages/ >, consulté le 18/07/2022.

CLIMATIK. Disponible sur < https://agroclim.inrae.fr/climatik/ >, consulté le 17/04/2022.

FAO (2014). Appropriate seed varieties for small-scale farmers: key practices for DRR implementers. Disponible sur < https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2015001488 >, consulté le 06/08/2022.

FAO (2015). Do you know all 17 SDGs? Disponible sur < https://sdgs.un.org/goals >, consulté le 05/06/2022.

FOP (2016). Point d'huile et répartition de la valeur ajoutée. Disponible sur < http://www.fopoleopro.com/point-dhuile-repartition-de-valeur-ajoutee/ >, consulté le 06/08/2022.

Freepik. Disponible sur < https://www.freepik.com/free-photos-vectors/canola >, consulté le 16/07/2022.

GEVES (2014). Les essais de germination. Disponible sur < https://www.geves.fr/wp-content/uploads/Les-essais-de-germination.pdf >, consulté le 26/07/2022.

GEVES (2016). Les essais de vigueur. Disponible sur < https://www.geves.fr/wp-content/uploads/Les-essais-de-vigueur.pdf >, consulté le 26/07/2022.

MACSUR. Disponible sur < https://macsur.eu/ >, consulté le 25/09/2022.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible sur < https://www.R-project.org/ >, consulté le 04/03/2022.

Rapsodyn (2022). Disponible sur < https://www.rapsodyn.fr/ >, consulté le 12/08/2022.

Saipol (2022). Mieux rémunérer les colzas riches en protéines dès 2022. Disponible sur < https://www.saipol.com/actualites/comment-accroitre-la-production-de-proteines-vegetales-sans-mobiliser-plus-de-surfaces-agricoles/ >, consulté le 06/08/2022.

Terres Inovia (2019). Date de semis colza : semer avant la pluie. Disponible sur < https://www.terresinovia.fr/-/date-de-semis-colza-semer-avant-la-pluie >, consulté le 19/07/2022.

Terres Univia (2021). Chiffres clés oléagineux et plantes riches en protéines. Disponible sur < https://www.terresunivia.fr/documentation-presse/chiffres-cles/chiffres-cles >, consulté le 12/08/2022.

Résumé

De nombreuses études font le constat des effets délétères du stress thermique pendant la phase reproductrice des végétaux, ce qui est préjudiciable au rendement et à la qualité des produits récoltés chez les espèces de grandes cultures. Cependant, dans un contexte de changement climatique caractérisé par une fréquence accrue des vagues de chaleur printanières et estivales, la réponse des cultures à la répétition des stress thermiques reste encore peu étudiée et leur interprétation ne prend pas souvent en compte la possibilité d'un effet mémoire du stress modifiant la réponse des cultures à des stress ultérieurs. Cet effet mémoire peut être bénéfique, grâce à un effet priming atténuant, ou pénalisant par un effet amplificateur des stress successifs. En effet, il a été démontré qu'il était possible de sensibiliser les plantes grâce à une période de stress modéré précédant un stress plus intense par l'effet bénéfique de la mémoire du stress. Dans le cadre de cette thèse, nous avons testé plusieurs protocoles de stress thermiques chez le colza, différant par leur intensité, la période d'exposition, la durée et la fréquence en conditions contrôlées, dans l'objectif de caractériser les réponses des plantes aux stress répétés pendant le cycle de la culture (effets intragénérationnels) et au cours de deux générations de plantes stressées (effets intergénérationnels). Nos travaux de caractérisation écophysiologique montrent que les effets des stress thermiques répétés ne sont pas significatifs sur le rendement total du fait des phénomènes de compensation reflétant la plasticité du colza, à la différence des effets sur les critères de qualité grainière. Ces effets diminuent la teneur en acides gras, modifient les proportions d'acides gras monoinsaturés au détriment des acides gras polyinsaturés, augmentent le ratio ω6:ω3 et conduisent à une dégradation de la qualité physiologique des graines (i.e. perte de l'intégrité membranaire, accélération de la germination et augmentation de la dormance). Nos résultats ont également indiqué qu'un stress modéré précédant un stress tardif plus intense avait un effet bénéfique, mais uniquement sur la teneur en azote des graines et le ratio d'oligosaccharides de la famille du raffinose, indicateur de la tolérance à la dessiccation. Dans des perspectives d'amélioration des performances des cultures face au changement climatique, des protocoles thermo-sensibilisants pourraient être proposés en ciblant des composés majeurs de la qualité grainière. Ainsi, les protocoles thermo-sensibilisants envisageables doivent prendre en compte (i) la température optimale au processus de synthèse du composé et (ii) la synchronisation entre l'événement thermique ayant un effet bénéfique et la période de synthèse/maturation du composé ciblé. En parallèle à ce travail de caractérisation écophysiologique, nous avons testé trois approches de modélisation (i.e. indicateurs écoclimatiques, un modèle de culture (semi-) mécaniste et deux méthodes de fouille de données) qui ont mis en évidence (i) les effets non additifs des stress thermiques répétés et (ii) la nécessité d'améliorer les fonctions de température au sein des modèles de culture mécanistes. Notre travail de modélisation est une preuve de concept sur la nécessité de considérer la mémoire du stress dans les modèles prédictifs des performances culturales, qui démontre le besoin de faire évoluer les modèles actuels pour mieux estimer les effets des stress thermiques répétés et leurs conséquences sur le rendement et la qualité des produits récoltés.

Mots-clés : stress thermique, stress répétés, mémoire du stress, rendement, qualité grainière, modélisation, colza.

Abstract

Many studies have shown the deleterious effects of heat stress during the reproductive phase of plants, which are particularly detrimental on the yield and quality of harvested products in field crops. However, in a context of climate change characterised by the increased frequency of spring and summer heat waves, the response of crops to repeated heat stresses remains poorly studied and the interpretation of their effects scarcely consider the possibility of stress memory effects which modify crop responses to later stresses. These memory effects can be either beneficial, owing to a priming effect, or penalizing because of amplified effects of successive stresses. Indeed, it has been shown that it is possible to sensitise plants through a period of exposition to a moderate stress preceding a more intense stress by the beneficial effect of stress memory. In this work, we tested several thermal stress protocols in oilseed rape differing in intensity, period of exposure, duration and frequency under controlled conditions, with the aim of characterising the plant responses to repeated stresses during the crop cycle (intragenerational effects) and over two generations of stressed plants (intergenerational effects). Our ecophysiological characterisation works show that the effects of repeated heat stresses are not significant on total yield due to compensation phenomena reflecting the plasticity of the oilseed rape, in contrast to the effects on seed quality criteria. These effects decrease the fatty acid content, modify the proportion of monounsaturated fatty acids at the expense of polyunsaturated fatty acids, increase the ω6:ω3 ratio and lead to a degradation of the physiological quality of the seeds (i.e. loss of membrane integrity, acceleration of germination and increase of dormancy). Our results also indicated that a moderate stress preceding a more intense late stress had a beneficial effect only on seed nitrogen content and a ratio of oligosaccharides of the raffinose family, which is an indicator of seed desiccation tolerance. With the aim of improving crop performances in the context of climate change, thermopriming protocols could be proposed to target major seed quality compounds. Therefore, these protocols must consider (i) the optimal temperature for the compound synthesis process and (ii) the synchronisation between the thermal event which is expected to have a priming effect and the synthesis/maturation period of the targeted compound. In parallel to this ecophysiological characterisation, we tested three modelling approaches (i.e. ecoclimatic indicators, a (semi-) mechanistic crop model and two data mining methods) which highlighted (i) the non-additive effects of repeated thermal stresses and (ii) the need to improve the temperature functions within mechanistic crop models. Our modelling study is a proof of concept of the need to consider stress memory in predictive crop models, which demonstrates the need to implement the current models to better estimate the effects of repeated thermal stresses and their consequences on the yield and quality of harvested products.

Keywords: heat stress, repeated stress, stress memory, yield, seed quality, crop modelling, oilseed rape.