



UNIVERSITE de CAEN BASSE-NORMANDIE

UFR : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée

Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé et Environnement

THESE

Présentée par

M^{elle} Laëtitia JANNIN

Et soutenue le

14 février 2012

En vue de l'obtention du

DOCTORAT de l'UNIVERSITE de CAEN

Spécialité : Physiologie, Biologie des organismes, populations, interactions

Arrêté du 7 août 2006

Titre : Caractérisation des modifications physiologiques et métaboliques induites chez *Brassica napus* L. par l'apport d'extraits algaux ou d'acides humiques

MEMBRES du JURY

M^{me} Céline MASCLAUX-DAUBRESSE, Directrice de Recherche, INRA Versailles (*Rapporteur*),

M. Alessandro PICCOLO, Professeur, Université de Naples, Italie (*Rapporteur*),

M. Philippe ETIENNE, Maître de Conférences, HDR, Université de Caen,

M. José-Maria GARCIA-MINA, Directeur du CIPAV, Groupe Roullier, Espagne (*codirecteur de thèse*),

M. Bertrand NEY, Professeur, AgroParisTech, INRA Grignon,

M. Alain OURRY, Professeur, Université de Caen (*directeur de thèse*),

M^{me} Marie-Pascale PRUD'HOMME, Professeure, Université de Caen.



UNIVERSITE de CAEN BASSE-NORMANDIE
UFR : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée
Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé et Environnement

THESE

Présentée par

M^{elle} Laëticia JANNIN

Et soutenue le

14 février 2012

En vue de l'obtention du
DOCTORAT de l'UNIVERSITE de CAEN

Spécialité : Physiologie, Biologie des organismes, populations, interactions
Arrêté du 7 août 2006

Titre : Caractérisation des modifications physiologiques et métaboliques induites chez
***Brassica napus* L. par l'apport d'extraits algaux ou d'acides humiques**

MEMBRES du JURY

M^{me} Céline MASCLAUX-DAUBRESSE, Directrice de Recherche, INRA Versailles (*Rapporteur*),
M. Alessandro PICCOLO, Professeur, Université de Naples, Italie (*Rapporteur*),
M. Philippe ETIENNE, Maître de Conférences, HDR, Université de Caen,
M. José-Maria GARCIA-MINA, Directeur du CIPAV, Groupe Roullier, Espagne (*codirecteur de thèse*),
M. Bertrand NEY, Professeur, AgroParisTech, INRA Grignon,
M. Alain OURRY, Professeur, Université de Caen (*directeur de thèse*),
M^{me} Marie-Pascale PRUD'HOMME, Professeure, Université de Caen.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury. Je suis très honorée que Céline Masclaux-Daubresse et Alessandro Piccolo aient accepté de juger ce travail. Je remercie également Bertrand Ney et Marie-Pascale Prud'Homme d'avoir accepté de participer à ce jury.

Ces trois années passées au sein de l'UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutrition N, C, S m'ont permis de rencontrer de nombreuses personnes m'ayant accompagné tant sur le plan professionnel que personnel. Je tiens à tous les remercier pour leur aide et leur soutien.

Je tiens à remercier Frederik le Dily de m'avoir accueillie au sein du laboratoire pour ma thèse.

Mes pensées vont particulièrement à mes encadrants de thèse de l'UMR EVA, Alain Ourry et Philippe Etienne. Merci pour votre patience, vos encouragements et votre confiance. Votre rigueur scientifique, votre pédagogie et vos conseils rédactionnels m'ont aidée à mener à bien ce travail de thèse.

Je remercie également José-Maria Garcia-Mina d'avoir accepté de co-encadrer ma thèse. Merci pour votre patience et votre disponibilité pour répondre à mes nombreuses questions sur les acides humiques.

Ce travail de thèse fait partie d'un projet plus large nommé AZOSTIMER, porté par le groupe Roullier (TIMAC Agro et CIPAV) et faisant intervenir de nombreux collaborateurs : l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, la start-up Force-A et l'agence de communication Anaximandre. Merci à toutes les

personnes ayant participé au projet pour leurs remarques et leurs suggestions lors de nos réunions, elles m'ont fait progresser lors de ce travail de thèse. Merci également à toute l'équipe du CIPAV à Pampelune pour nous avoir accueillis, nous les 3 doctorants du projet, afin de nous enseigner les techniques de mesure et de purification.

Je tiens également à remercier toute l'équipe de l'UMR EVA, sans qui ce travail de thèse n'aurait pas été possible. Merci à Anne-Françoise et Raphaël, les experts de la serre, pour leur disponibilité et leur patience. Sans eux et leur dévouement total à nos petites plantes, le suivi des cultures serait plus difficile. Merci également à Marie-Paule, pour les centaines d'échantillons passés à l'IRMS, à Sandrine et Julie, pour leur implication lors des extractions d'ARN et des analyses q-PCR et à Patrick, pour les journées passées à la mesure de la photosynthèse.

Je tiens également à remercier Josette, Josiane, Magali, Sophie et Bénédicte pour leur aide dans toutes les petites choses du quotidien. Leur disponibilité et leur bonne humeur facilitent la vie au laboratoire.

Merci à Didier Goux pour sa patience et sa pédagogie lors des journées entières d'observation en microscopie confocale et électronique. Merci également à Nicolas Elie d'avoir pris le temps d'analyser ces images.

Mes pensées vont également aux doctorants Marie, Lucie, Virginie, Alexandre, Romain, Antonin, Philippe, Alexandra et Vincent (qui prend la relève) avec qui j'ai partagé un bout de cette grande aventure qu'est la thèse.

Je ne vous oublie pas, Mustapha et Xavier ! Juste quelques lignes spécialement pour vous, mes collègues doctorant et ingénieur du projet AZOSTIMER. Merci pour votre soutien sans faille et votre aide ainsi que pour les moments de discussion et de rigolade.

Je souhaite également remercier mes parents et mes frères. Papa et maman, merci pour votre soutien et pour vous être soucieux quotidiennement de mon bien-être et de mes manip, même à l'autre bout du monde. Jérémy et Valentin, merci pour vos encouragements.

Merci à mon compagnon Christophe de m'avoir suivie sans concessions dans cette aventure. Ta présence à mes côtés lors de ces trois années bien remplies m'a aidée à avancer. De plus, on dit souvent que les étudiants en fin de thèse et les femmes enceintes ne sont pas forcément de bonne compagnie. Tu as eu le mérite de supporter ces deux états à la fois !

Mes pensées vont enfin à ma fille, Alwena. Tu es venue pimenter la rédaction de cette thèse, d'abord par tes coups de pieds puis par tes sourires et tes gazouillis.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I - INTRODUCTION ET ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE..... 1

I. CONTEXTE DE LA THÈSE.....	1
I.1 La modification des pratiques culturales	1
I.2 Les solutions actuelles pour limiter l'utilisation des intrants.....	3
II. APPLICATION DE BIOSTIMULANTS D'ORIGINE ALGALE	4
II.1 De l'utilisation d'algues à celle des extraits algaux.....	4
II.2 Les effets avérés des extraits algaux.....	5
II.2.1 <i>Sur la croissance et le cycle de développement des plantes</i>	5
II.2.2 <i>Sur le métabolisme des plantes</i>	7
II.2.3 <i>La résistance aux stress</i>	8
III. APPLICATION DE BIOSTIMULANTS DÉRIVÉS D'ACIDES HUMIQUES	11
III.1 Les acides humiques : un ensemble de molécules complexes	11
III.2 Les effets avérés des acides humiques	12
III.2.1 <i>Sur les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol</i>	13
III.2.2 <i>Sur la croissance et le cycle de développement des plantes</i>	14
III.2.3 <i>Sur le métabolisme des plantes</i>	16
III.2.4 <i>Sur la résistance aux stress</i>	19
III.3 Parallèles entre les extraits algaux et les acides humiques.....	21
IV. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	22

CHAPITRE II - MATÉRIELS ET MÉTHODES 27

I. MATÉRIEL VÉGÉTAL ET CONDITIONS DE CULTURE	27
I.1 Le colza d'hiver	27
I.2 Germination des graines	28
I.3 La culture en hydroponie	28
I.4 La culture sur sol.....	28
II. ORIGINE DES EXTRAITS ET TRAITEMENT DES PLANTES	29
II.1 Origine des extraits.....	29
II.2 Mode d'apport des extraits et traitement des plantes.....	30
II.2.1 <i>Modalité d'apport des extraits en condition de cultures hydroponiques</i>	30
II.2.1.a <i>Criblage des extraits d'intérêt</i>	30
II.2.1.b <i>Cultures préparatoires aux analyses biochimiques et transcriptomiques</i>	31
II.2.2 <i>Modalité d'apport des extraits en condition de cultures sur sol</i>	31
III. MESURE DES PARAMÈTRES PHYSIOLOGIQUES DE LA PLANTE	31
III.1 Détermination des teneurs foliaires en chlorophylles	31
III.1.1 <i>Le SPAD</i>	31
III.1.2 <i>Le capteur sans contact Multiplex</i>	32
III.2 Mesure de l'activité photosynthétique nette.....	33
III.3 Détermination des biomasses foliaires, racinaires et totales	33

IV. ANALYSES BIOCHIMIQUES.....	33
IV.1 Dosage des minéraux et des ions	33
IV.1.1 Détermination des teneurs en N total et ¹⁵ N.....	33
IV.1.1.a Préparation des échantillons et mesures IRMS	34
IV.1.1.b Quantité d'azote issu de l'absorption et détermination de la vitesse d'absorption du nitrate.....	34
IV.1.1.c Calcul de l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA)	34
IV.1.2 Détermination des teneurs en soufre.....	35
IV.1.3 Dosages du nitrate et du sulfate	35
V. EXPLOITATION STATISTIQUE DES DONNÉES	35

CHAPITRE III - EFFETS DES EXTRAITS ALGAUX ET DES ACIDES HUMIQUES SUR LA CROISSANCE, LA TENEUR EN CHLOROPHYLLES ET L'EFFICIENCE D'UTILISATION DE L'AZOTE. 37

I. CRIBLAGE DES 5 EXTRAITS ALGAUX ET DES 10 ACIDES HUMIQUES EN CONDITIONS OPTIMALES DE CROISSANCE.....	37
I.1 Sur la production de biomasse du colza.....	38
I.1.1 Acides humiques natifs et modifiés	38
I.1.2 Extraits algaux.....	40
I.2 Sur les teneurs en chlorophylles du colza	41
I.2.1 Acides humiques	41
I.2.2 Extraits algaux.....	42
I.3 Sur l'Efficienc e d'Utilisation de l'Azote (EUA)	42
I.3.1 Extrait d'acides humiques	42
I.3.2 Extraits algaux.....	43
I.4 Conclusion	43
II. EFFETS DE AH7 ET AZAL5 SUR LA CROISSANCE DU COLZA EN CONDITIONS DE STRESS SALIN.....	44
II.1 Sur la production de biomasse.....	45
II.2 Sur les teneurs en chlorophylles et l'EUA.....	45
II.3 Conclusions	46
III. CULTURE SUR SOL	47
III.1 Effets sur les paramètres physiologiques du colza (croissance, teneur en chlorophylles et EUA)	48
III.1.1 Sur sols (alcalin ou acide) en présence d'AH7.....	48
III.1.2 Sur sol alcalin en présence de l'extrait AZAL5.....	48
III.2 Conclusions	49
IV. DISCUSSION.....	49

CHAPITRE IV - LA CROISSANCE DU COLZA EST ACTIVÉE PAR LES EXTRAITS ALGAUX ET LES ACIDES HUMIQUES : ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES ET CARACTÉRISATIONS PHYSIOLOGIQUES DES MÉTABOLISMES N, C ET S..... 53

I - <i>BRASSICA NAPUS</i> GROWTH IS PROMOTED BY <i>ASCOPHYLLUM NODOSOM</i> (L.) LE JOL. SEAWEED EXTRACT: MICROARRAY ANALYSIS AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF N, C AND S METABOLISMS (ARTICLE 1).....	54
I.1 Introduction	56
I.2 Results.....	59
I.2.1 Seaweed extract (AZAL5) characterization.....	59
I.2.2 Growth analysis	60
I.2.3 Microarray data.....	61
I.2.4 N metabolism.....	63
I.2.5 S metabolism.....	64
I.2.6 Photosynthesis	64
I.3 Discussion.....	65
I.4 Conclusion	70
I.5 Materials and methods	71
I.5.1 Growth conditions and experimental design.....	71
I.5.2 Seaweed extract characterization (AZAL5).....	71
I.5.3 Plant treatment.....	72
I.5.4 Determinations of chlorophyll concentration and net photosynthetic rates.....	73
I.5.5 Mineral and ion quantification.....	73
I.5.5.1 Total N and ¹⁵ N analysis.....	73
I.5.5.2 Nitrate and sulfate analysis.....	74
I.5.6 <i>In vivo</i> nitrate reductase activity in plants.....	74
I.5.7 RNA extraction.....	75
I.5.8 Reverse transcription and q-PCR analysis.....	75
I.5.9 Microarray analysis	76
I.5.10 Fluorescence confocal microscopy and transmission electron microscopy.....	77
I.5.11 Data and statistical analysis.....	78
II - MICROARRAY ANALYSIS OF HUMIC ACID EFFECTS ON <i>BRASSICA NAPUS</i> GROWTH: INVOLVEMENT OF N, C AND S METABOLISMS (ARTICLE 2)	79
II.1 Introduction	81
II.2 Results	85
II.2.1 Humic acid (HA7) characterization.....	85
II.2.2 Growth analysis.....	86
II.2.3 Microarray data	87
II.2.4 N metabolism.....	89
II.2.5 S metabolism.....	90
II.2.6 Photosynthesis	90
II.3 Discussion.....	91
II.4 Conclusion.....	96
II.5 Materials and Methods	96
II.5.1 Growth conditions and experimental design.....	96
II.5.2 Humic acid (HA7) sample preparation and characterization.....	97
II.5.3 Plant treatment.....	100
II.5.4 Determinations of chlorophyll concentration and net photosynthetic rates	101
II.5.5 Mineral and ion quantification	101
II.5.5.1 Total N and ¹⁵ N analysis.....	101
II.5.5.2 Nitrate and sulfate analysis.....	102
II.5.6 <i>In vivo</i> nitrate reductase activity in plants	102
II.5.7 RNA extraction.....	103
II.5.8 Reverse transcription and q-PCR analysis.....	103
II.5.9 Microarray analysis	104
II.5.10 Fluorescence confocal microscopy and transmission electron microscopy	105
II.5.11 Data and statistical analysis.....	106

CHAPITRE V - CONCLUSIONS ET DISCUSSION GÉNÉRALE 107

I. Un accroissement de la production de biomasse, essentiellement racinaire..... 109
II. Une stimulation de la photosynthèse et de la division des chloroplastes 110
III. Une absorption et une assimilation du nitrate stimulée conformément à l'augmentation de la croissance 113
IV. Un métabolisme du soufre stimulé au-delà de la demande requise par la synthèse de biomasse 114
V. Analyses moléculaires plus larges..... 116

CHAPITRE VI - PERSPECTIVES..... 120

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 124

Chapitre I

Introduction et Analyse bibliographique

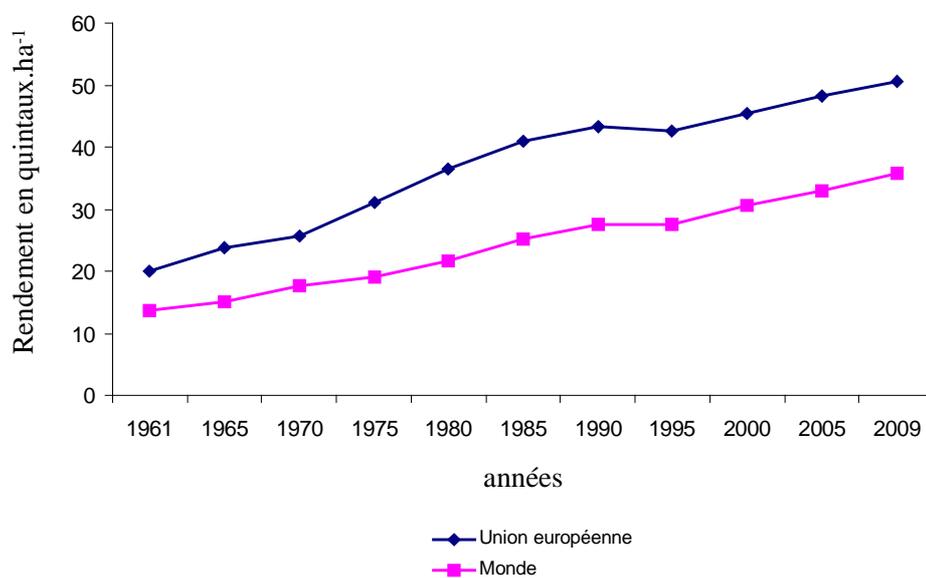


Figure I-1 : Evolution du rendement moyen en céréales en quintaux.ha⁻¹ en Europe (courbe bleue) et dans le monde (courbe rose) depuis 1960. L'union européenne concentre les parcelles de meilleur rendement. On constate cependant que depuis les années 60, la moyenne des rendements toutes céréales confondues n'a cessée d'augmenter. (D'après la FAO, <http://faostat.fao.org>)

CHAPITRE I

INTRODUCTION ET ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Contexte de la thèse

I.1 La modification des pratiques culturales

L'évolution des pratiques culturales est importante depuis le début du siècle dernier. La première grande modification a lieu avec l'invention du procédé Haber-Bosh de fixation de l'azote. Ce procédé permet, par réaction de l'azote et de l'hydrogène de l'air sur un catalyseur ferreux d'obtenir de l'ammonium solide pouvant être oxydé en nitrate. Cet azote solide, sous forme de nitrate ou d'ammonium rend donc plus facile le transport et l'application de fertilisant azoté sur les cultures. La mise en place de cette pratique culturale a permis un doublement des rendements sur les surfaces agricoles cultivées et a ainsi permis de répondre à l'explosion démographique mondiale. La seconde grande modification a eu lieu dans les années 1960, période à partir de laquelle la recherche a été mise au service de l'agriculture : on parle alors de révolution verte. De nouveaux fertilisants, de nouveaux pesticides et de nouvelles variétés à fort potentiel de rendement sont créés. Par exemple, le rendement moyen des céréales, exprimé en quintaux par hectare, est ainsi passé de 20 (1961) à plus de 50 (2009) en Europe et respectivement de 13 à plus de 35 à l'échelle mondiale (fig. I-1). Les progrès en terme de produits phytosanitaires ont également contribué à cette meilleure utilisation des terres agricoles. Cette révolution verte a conduit à une utilisation accrue de tous ces intrants contribuant à l'amélioration du rendement. Elle a cependant également conduit à une augmentation de la pollution des nappes phréatiques et des eaux de surface continentales et marines par le nitrate mais aussi par les pesticides fortement rémanents, avec en parallèle une augmentation des taux de résistance des adventices et des pathogènes. Les autorités ont alors du prendre des mesures pour encadrer l'utilisation de ces produits.

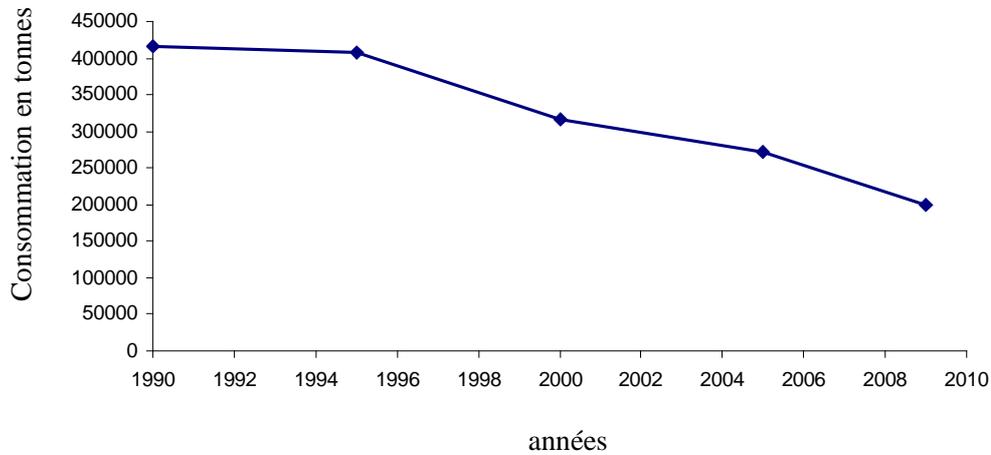


Figure I-2 : Evolution de l'utilisation de pesticides en Europe depuis 1990. Le terme pesticide regroupe les insecticides, les fongicides et les herbicides. Alors que la tendance est stable jusqu'en 1995, l'utilisation de ces produits phytosanitaires n'a ensuite cessé de diminuer (aujourd'hui, -52% depuis 1995). (D'après la FAO, <http://faostat.fao.org>)

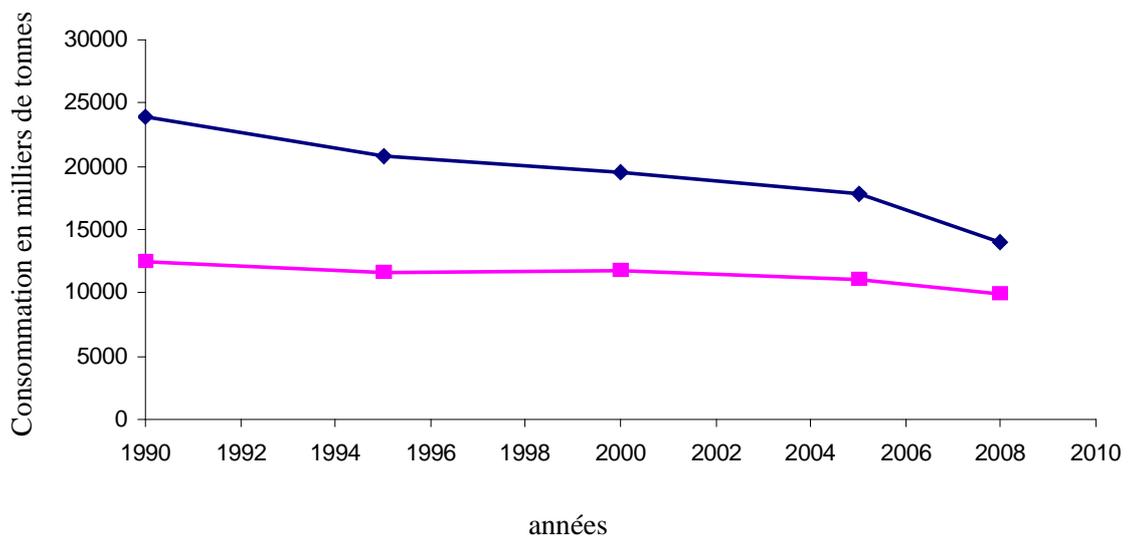


Figure I-3 : Evolution au niveau européen de la demande en fertilisants N+P+K (courbe bleue) ou de la demande spécifique en azote (N, courbe rose) mesurée jusqu'à 2009. (D'après la FAO, <http://faostat.fao.org>)

C'est dans ce contexte qu'au début des années 1990, l'agriculture va changer de cap. Les dirigeants européens, conscients du problème, instaurent en 1991 la «directive Nitrate» (directive 91/676/CEE), toujours en vigueur. Cette directive, qui suppose que le nitrate d'origine agricole constitue la cause principale de la pollution qui affecte les eaux de la communauté européenne, prévoit l'établissement d'un code des bonnes pratiques agricoles. Ce code régleme les conditions et les périodes pendant lesquelles les fertilisants peuvent être épandus sur les sols, qu'il s'agisse de fertilisant issus d'effluents d'élevage ou d'engrais de synthèse. La «directive Nitrate» a également pour but de cibler les sites et les périodes présentant le risque de lessivage le moins important afin de limiter le passage du nitrate dans les eaux souterraines et les cours d'eaux. De même, depuis 1990, plusieurs plans se sont succédés afin de limiter l'utilisation de produits phytosanitaires. Le dernier en date, le plan ECOPHYTO 2018, mis en place à la suite du Grenelle de l'environnement (du 16 juillet au 25 octobre 2007), prévoit une réduction de 50% de l'utilisation de pesticides à l'horizon 2018-2020. Ainsi, ECOPHYTO 2018 vise à diminuer la dépendance des exploitations agricoles vis à vis des produits phytosanitaires tout en maintenant un niveau élevé de production agricole, tant en quantité qu'en qualité (cf. Ministère de l'Agriculture, <http://agriculture.gouv.fr>). Tous ces plans de restrictions ont eu un impact plus ou moins important sur la consommation de produits fertilisants et phytosanitaires en Europe et dans le monde.

Un suivi statistique de la FAO (fig. I-2 et I-3) montre alors une réduction significative de l'utilisation des produits phytosanitaires et fertilisants depuis l'adoption des directives précédemment citées, en particulier depuis 1995. A titre d'exemple, en Europe, on assiste à une diminution de l'utilisation de des pesticides de l'ordre de 50 % entre 1990 et 2008 (fig. I-2). Concernant les engrais NPK, l'impact de la mise en place des différentes des directives est moins net puisque au niveau européen, la demande spécifique en N et la consommation d'engrais NPK reste relativement stable entre 1990 et 2008 avec seulement une tendance à la diminution entre 2006 et 2008 (fig. I-3). Cependant, compte tenu des plans récemment mis en place suite au Grenelle de l'environnement, il est fort à penser que la diminution amorcée devrait se poursuivre au cours des prochaines années. Au niveau mondial, la tendance est très différente du fait d'une consommation accrue d'intrants par les nouveaux pays émergents (Chine par exemple). En conséquence, au niveau mondial, contrairement à ce qui est observé au niveau européen, la consommation d'engrais NPK est en constante augmentation, même si elle a connu un ralentissement durant la crise de 2008-2009. Par ailleurs, les projections de la FAO prévoient que l'accroissement de l'utilisation des engrais va se poursuivre dans les

années à venir afin notamment de répondre aux besoins alimentaires liés à la croissance démographique mondiale.

I.2 Les solutions actuelles pour limiter l'utilisation des intrants

Afin de limiter l'utilisation des intrants, de nouvelles stratégies peuvent encore être envisagées que ce soit en terme de pratiques culturales (agriculture de précision, cultures associées...) mais également en terme de sélection génétique et de création variétale. D'autres solutions alternatives ou complémentaires peuvent aussi être envisagées comme l'utilisation de molécules d'origine biologiques.

La sélection végétale était déjà réalisée intuitivement par les premiers cultivateurs qui sélectionnaient les graines des plantes répondant le mieux à leurs besoins pour les ressemer l'année suivante. Avec les progrès de la génétique, les sélectionneurs d'aujourd'hui ont accès à des méthodes et des outils plus performants. Ainsi, la sélection variétale consiste à croiser une espèce d'intérêt agronomique (blé, maïs, colza...) avec une espèce végétale portant un caractère d'intérêt (résistance aux maladies, tolérance aux herbicides ou aux stress ...) dans le but de créer une nouvelle variété combinant les intérêts des deux plantes parentes. La sélection végétale a déjà contribué à la révolution verte en proposant des variétés plus réceptives aux fertilisants et dont le rendement était quasi proportionnel à la dose de fertilisant appliquée. Il s'agit maintenant de créer de nouvelles variétés qui soient en accord avec les prérogatives de diminution d'utilisation d'intrants. Les chercheurs se concentrent donc aujourd'hui sur l'obtention de variétés moins exigeantes en fertilisant et/ou plus résistantes aux stress biotiques et abiotiques. Ainsi, la résistance aux maladies fait partie d'un des enjeux les plus importants de la sélection végétale puisque le plan ECOPHYTO 2018, précédemment cité, vise un maintien de la qualité et de la quantité de la production agricole malgré la diminution de l'utilisation de produits phytosanitaires. C'est pourquoi actuellement, pour la majorité des nouvelles espèces inscrites au catalogue ces dernières années, la résistance accrue aux maladies et la précocité sont des critères largement pris en compte. La plupart des firmes qui travaillent sur les sélections variétales ont également pour objectif d'obtenir des variétés présentant une meilleure efficacité d'utilisation de l'azote (EUA), c'est à dire des variétés à haut rendement requérant des niveaux plus faibles d'intrants azotés. Néanmoins, les différentes étapes de la sélection variétale étant longues avant l'inscription au catalogue, la commercialisation des premières variétés à haute efficacité d'utilisation de l'azote n'est pas

prévue avant 2015-2020 au plus tôt. L'utilisation de composés biostimulants peut donc constituer une alternative possible à l'apparition de ces variétés.

Ces molécules stimulantes d'origine biologique sont principalement les extraits algaux et les acides humiques. Dans l'agriculture d'aujourd'hui, où le «naturel» et le «bio» ont assez largement la préférence des consommateurs, cette solution constitue une bonne alternative à la sélection variétale. Dès l'antiquité, les connaissances empiriques des effets bénéfiques sur les cultures d'un apport d'algues étaient déjà rapportées. Avec les progrès de la recherche et de l'industrialisation, ces connaissances empiriques se sont précisées, permettant la fabrication d'extraits liquides présentant les mêmes propriétés que les produits bruts dont ils sont issus mais plus facilement transportables et épanchables sur les cultures en guise d'engrais. Des extraits algaux et des extraits humiques sont d'ailleurs déjà vendus, par les coopératives pour les agriculteurs ou même dans les jardinerie pour les particuliers, pour leurs effets bénéfiques sur les plantes et sur le sol. Toutefois, bien que leurs effets physiologiques soit décrits de façon détaillée dans la littérature, leurs mécanismes d'action sont encore assez peu connus. Ainsi actuellement, les recherches se poursuivent sur le plan appliqué afin de trouver de nouveaux procédés de fabrication d'extraits algaux et humiques qui permettrait d'augmenter leur efficacité, mais également sur le plan fondamental afin de mieux appréhender les voies métaboliques affectées par ces produits *in planta*.

II. Application de biostimulants d'origine algale

II.1 De l'utilisation d'algues à celle des extraits algaux

Traditionnellement depuis l'antiquité, les algues sont appliquées directement sur le sol des champs cultivés comme compost. Les effets empiriquement constatés sur les plantes tels que l'augmentation de la croissance et du rendement étaient attribués soit à l'amélioration de la structure du sol avec une augmentation de la rétention d'eau, soit à une meilleure disponibilité des nutriments résultant de la dégradation des molécules organiques apportées par les algues. Cette méthode de fertilisation efficace et peu onéreuse était donc largement répandue sur les côtes mais peu compatible avec un transport longue distance. Ainsi, dès 1857, Gardissal breveta une méthode permettant de compresser les algues pour en faire des blocs compacts et plus facilement transportables. Cependant, bien que plus pratique pour le transport, ces blocs compliquent l'épandage des algues sur les cultures. La recherche d'un

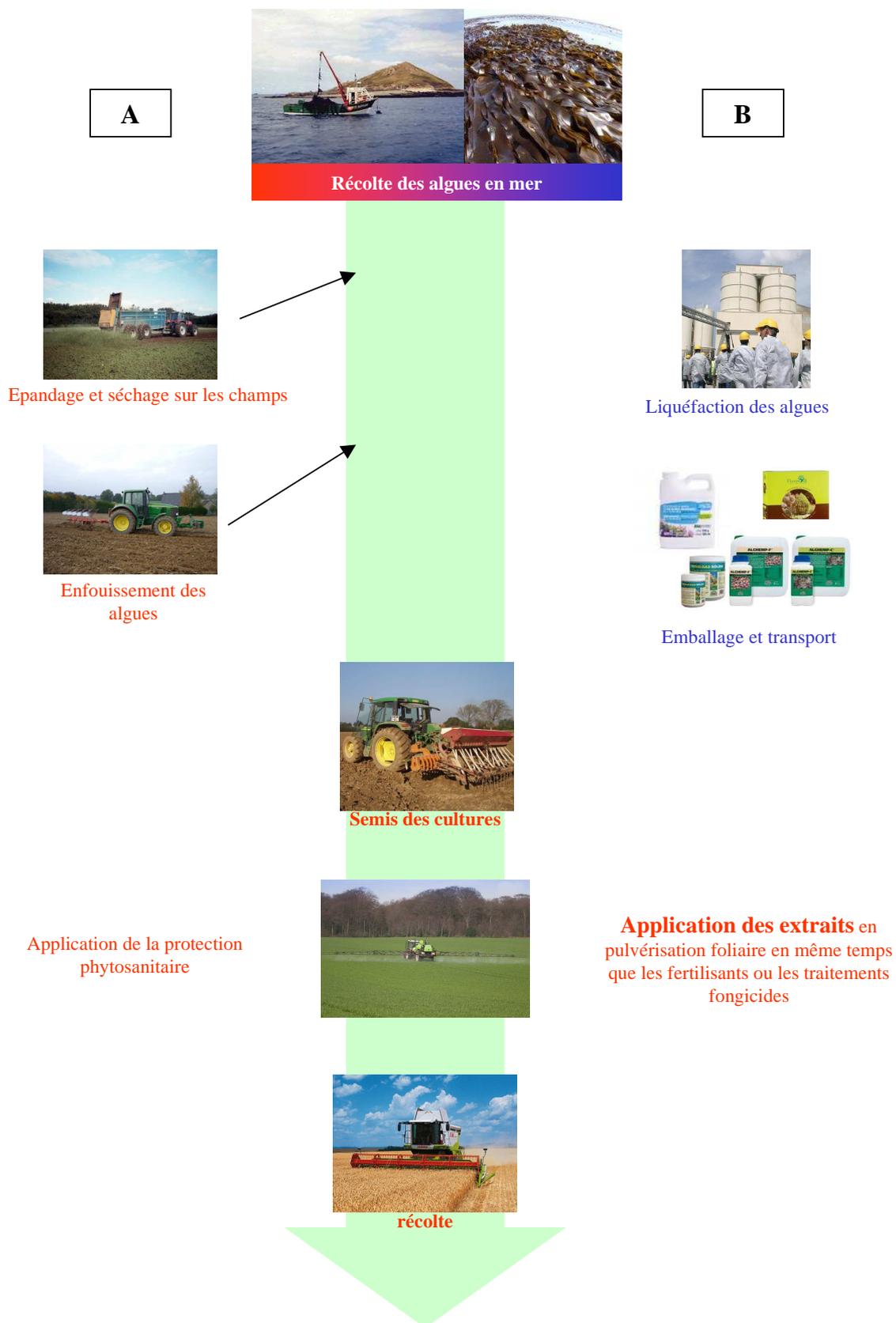


Figure I-4 : De l'utilisation directe d'algues (A) à celle des extraits algaux (B), soit directement par les agriculteurs (en rouge) ou avec des transformations industrielles préalables (en bleu).

procédé qui permettrait de liquéfier les algues tout en conservant leurs propriétés sur le sol et les plantes devient alors prioritaire. Deux techniques voient alors le jour, dérivées du brevet de Milton en 1952 portant sur une extraction des composés en milieu basique et celui de Hervé & Roullier en 1977 reposant sur un broyage à basse température.

Ces extraits liquides sont plus faciles et rapides d'utilisation puisqu'ils miment les effets des algues déjà décomposées et compostées alors que l'application d'algues fraîches sur un sol nécessite normalement d'attendre plusieurs semaines leur décomposition avant de pouvoir effectuer le semis (fig. I-4). Ces extraits liquides combinent donc facilité de transport (conditionné en bidons) et facilité d'utilisation : ils peuvent être appliqués soit directement sur le sol, soit en pulvérisation foliaire en combinaison des autres traitements fertilisants ou phytosanitaires. En parallèle, de plus en plus d'études sur ces extraits ont été réalisées afin de comprendre toutes leurs potentialités et de tenter d'élucider leur mode d'action.

II.2 Les effets avérés des extraits algaux

II.2.1 Sur la croissance et le cycle de développement des plantes

Les effets de l'application d'algues sur la croissance des végétaux sont connus empiriquement depuis les débuts de leur application sur les champs. Les études plus récentes sur les effets des extraits algaux montrent une meilleure germination, floraison et fructification. Dans ce sens, Roussos *et al.* (2009) montrent que des plants de fraisiers traités en pulvérisation foliaire avec un extrait d'algues brunes *Ascophyllum nodosum* présentent une augmentation significative du poids des fruits produits comparé à des plants non traités. Il est également à noter dans cette étude que des résultats similaires sont obtenus lors de la pulvérisation foliaire d'acide gibbérellique (AG), suggérant ainsi que les effets des extraits algaux seraient dus aux phytohormones qu'ils contiennent et en particulier à l'AG. Sivasankari *et al.* (2006) montrent quant à eux une augmentation du pourcentage de germination pour des graines de vigne soumises à des extraits de *Caulerpa chemnitzia* et de *Sargassum wightii*. Le taux de germination est proportionnel à l'augmentation de concentration de l'extrait entre 5 et 20 % (v/v) puis diminue pour des concentrations comprises entre 20% et 50%. Au-delà d'une concentration en extrait algal de 50%, la germination est inhibée. Cette meilleure germination s'accompagne d'une plus grande vigueur des plantules, c'est à dire une plus grande longueur de tige et de racine associée à une augmentation de la biomasse fraîche et sèche.

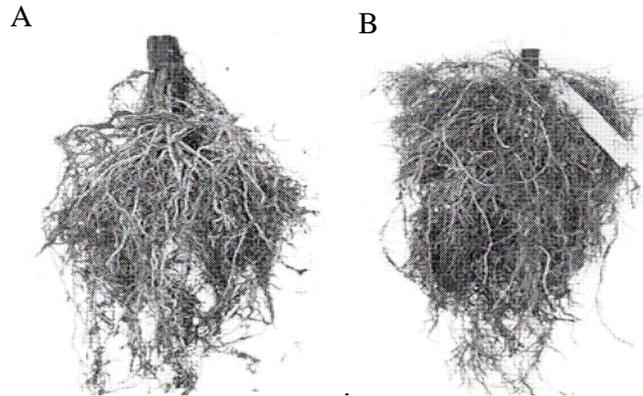


Figure I-5 : Effet de l'application racinaire d'un extrait d'algue du genre *Fucale* sur la biomasse racinaire de la vigne (*Vitis vinifera*). Les plants de vigne sont plantés en pot puis arrosés avec de la solution nutritive de type Hoagland. Le traitement par l'extrait algal est apporté sous forme d'un arrosage d'une solution d'extrait à 0,1% (v/v) une fois par semaine pendant toute la durée de la culture. A l'issue des 4 mois de culture, les racines sont lavées, photographiées et pesées. **A.** Plante témoin non traitée (biomasse racinaire de $17,73 \pm 2,29$ g). **B.** Plante traitée par l'extrait algal (biomasse racinaire de $22,38 \pm 3,07$ g). Les auteurs constatent alors en réponse à l'extrait algal une augmentation de la biomasse racinaire associée à une modification de son architecture. (D'après Mugnai *et al.*, 2008)

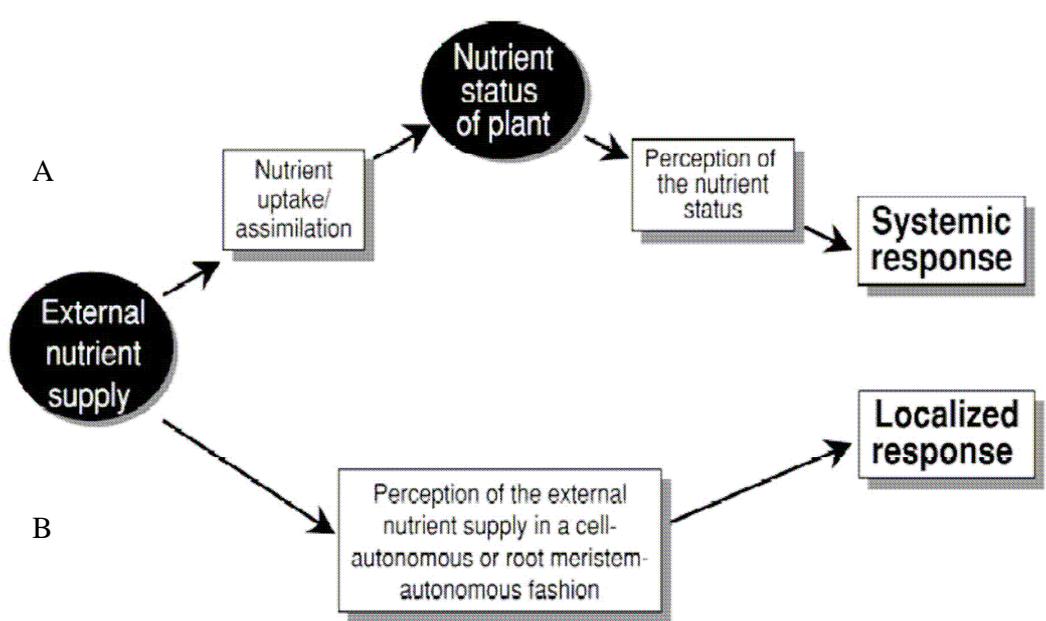


Figure I-6 : Modèles proposés pour le contrôle nutritionnel du développement de la plante. Les auteurs proposent deux modes d'action des nutriments sur la croissance des plantes. **A.** Soit leur apport induit une réponse systémique, c'est à dire une modification globale du développement de la plante. **B.** Soit les nutriments entraînent une réponse localisée, c'est à dire une modification de l'architecture racinaire. Dans le premier cas (**A**), les nutriments apportés au niveau racinaire sont absorbés puis assimilés par la plante ce qui modifie son statut nutritionnel. Cette amélioration du statut nutritionnel est perçue par la plante qui modifie tout son développement en conséquence : augmentation de la croissance foliaire et racinaire. Dans la seconde configuration (**B**), la perception au niveau racinaire de la modification de la concentration en nutriments dans le milieu donne lieu à l'induction de signaux conduisant à des modifications locales de l'architecture racinaire afin d'optimiser le prélèvement des nutriments. Ces réponses localisées peuvent se traduire par des augmentations de la croissance racinaire et du diamètre des racines ainsi que par des augmentations du nombre de racines secondaires et de poils absorbants. (D'après Forde & Lorenzo, 2001)

L'augmentation de biomasse de plantules de vigne traitées démontrée par Sivasankari *et al.* (2006) se retrouve dans la majorité des études sur les effets des extraits algaux. La plupart du temps, l'augmentation de biomasse totale résulte principalement d'une augmentation de la biomasse racinaire (fig. I-5). Ainsi, Mugnai *et al.* (2008) et Spinelli *et al.* (2010) rapportent des augmentations de biomasse racinaire sans augmentation de biomasse foliaire pour la vigne et le fraisier traités en application racinaire (arrosage pour le fraisier et ajout dans la solution nutritive pour la vigne) d'extraits algaux commerciaux. Dans l'étude de Mugnai *et al.* (2008), cette augmentation de biomasse racinaire de la vigne s'accompagne d'une modification de l'architecture racinaire et notamment par une augmentation du nombre de racines secondaires par rapport à la plante témoin non traitée. De même, Rayorath *et al.* (2008) montrent que des plantes d'*Arabidopsis thaliana* traitées par un extrait d'*Ascophyllum nodosum* présentent une augmentation de biomasse racinaire accompagnée d'une augmentation de la longueur des racines. En parallèle, ces auteurs montrent, grâce à une construction rapportrice entre le promoteur d'un gène codant un élément de réponse à l'auxine (DR5) et la protéine fluorescente GUS, qu'une réponse auxinique se produit dans la racine d'*Arabidopsis thaliana* suite à un traitement par l'extrait d'algue. Par ailleurs, Mériçout (2006) observe un effet sur la biomasse racinaire associé à un développement des racines latérales chez *Arabidopsis thaliana* traité en pulvérisation foliaire par un extrait d'algues brunes *Ascophyllum nodosum* riches en auxine. Ceci suggère, comme pour l'augmentation du taux de germination, que les effets bénéfiques des extraits algaux sur la biomasse des plantes seraient pour partie dus à l'action de phytohormones apportées par l'extrait. Alternativement, d'autres études portant sur les modifications de l'architecture racinaire montrent que des molécules autres que les phytohormones peuvent être à l'origine de ces modifications. Ainsi, Forde & Lorenzo (2001) et Couée *et al.* (2004) montrent les effets respectivement des nutriments (N, P, K, Fe) et des polyamines (agmatine, putrescine, spermidine...) sur la croissance de la racine principale et l'initiation de racines secondaires et de poils absorbants, ces réponses pouvant être systémiques ou localisées à une partie des racines (fig. I-6). L'ensemble de ces travaux suggère que l'augmentation de croissance racinaire observée en réponse aux extraits algaux puisse résulter de l'action des phytohormones, des nutriments, des polyamines ou à une action conjuguée de tout ou partie de ces facteurs.

En règle générale, cette stimulation de la croissance des plantes se traduit par une plus grande vigueur conduisant à une augmentation du rendement ainsi que de la qualité et de la taille des fruits produits. A titre d'exemple, Rathore *et al.* (2009) montrent chez le soja une

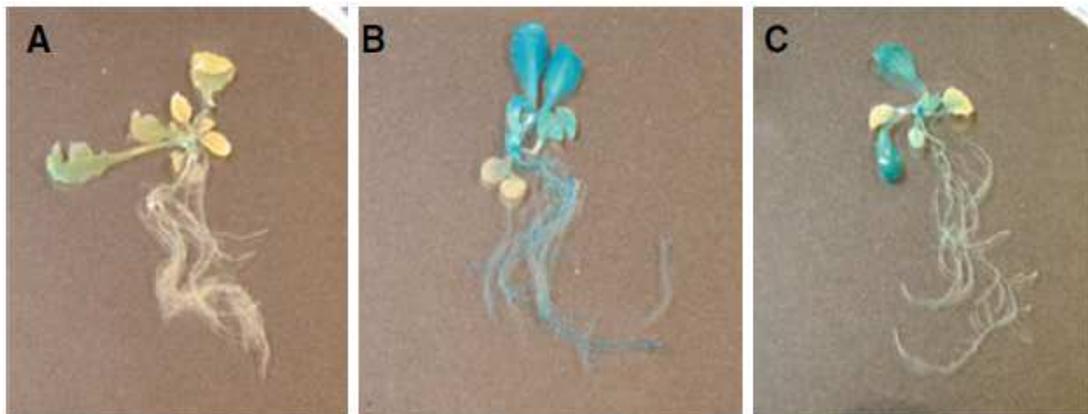


Figure I-7 : Induction d'une activité cytokinine-like chez des plants d'*Arabidopsis thaliana* traitées par un extrait algal d'*Ascophyllum nodosum*. L'induction de l'activité cytokinine-like est mise en évidence grâce à la transformation des plantes d'*Arabidopsis thaliana* avec le gène de la β -glucuronidase (GUS), sous le contrôle du promoteur du gène *ARR5* codant un élément de réponse aux cytokinines. La présence de cytokinines *in planta* provoque l'induction de la protéine GUS caractérisée par l'apparition d'une couleur bleue. **A.** Plante témoin non traitée. **B.** Plante traitée avec un extrait de cytokinine (témoin positif). **C.** Plante traitée par un extrait algal. (Khan *et al.*, 2010)

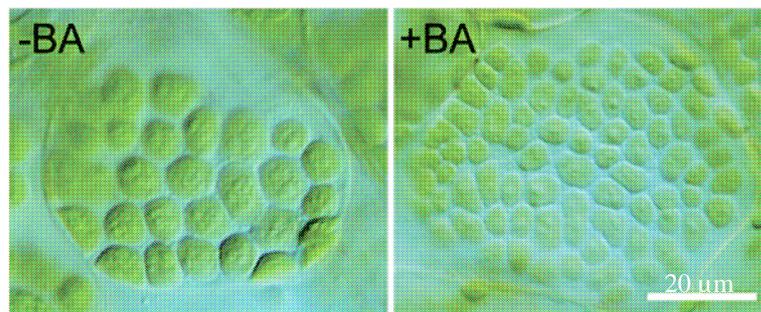


Figure I-8 : Effets des cytokinines sur la division des chloroplastes. Les plants d'*Arabidopsis thaliana* sont cultivés pendant 10 jours en boîte de Pétri sur un milieu solide contenant (+BA) ou non (-BA) 5 μ M de la cytokinine benzyladénine. Les chloroplastes sont ensuite observés dans les cellules du mésophylle des cotylédons. L'application de cytokinine induit une modification de la division des chloroplastes se traduisant par une augmentation de leur nombre et une diminution de leur taille. (D'après Okazaki *et al.*, 2009)

augmentation de la vigueur des plantes (hauteur des plantes, nombres de branches et de gousses par plante plus élevés) et du rendement suite à une pulvérisation foliaire par un extrait de *Kappaphycus alvarezii*. Roussos *et al.* (2009) rapportent une amélioration de l'apparence des fruits ainsi que de leur contenu en polyphénols pour des fraisiers traités en pulvérisation foliaire par un extrait d'*Ascophyllum nodosum*. Tous ces auteurs suggèrent que les effets des extraits algaux pourraient être dus aux phytohormones qu'ils contiennent, principalement les auxines et les cytokinines. Dans ce sens, Khan *et al.* (2011) démontrent, grâce à une construction entre un promoteur de gène de réponse aux cytokinines ARR5 et la protéine fluorescente GUS, qu'une pulvérisation foliaire ou une culture en présence d'un extrait d'*Ascophyllum nodosum* induit une activité cytokinine-like dans les feuilles et les racines d'*Arabidopsis thaliana* (fig. I-7). De même, Okazaki *et al.* (2009) montrent qu'un traitement d'*Arabidopsis thaliana* par des cytokinines se traduit par une augmentation de la division des chloroplastes, conduisant à une augmentation du nombre de chloroplastes par cellules (fig. I-8). Cette étude est donc à mettre en parallèle avec celles de Mancuso *et al.* (2006) et Spinelli *et al.* (2010) montrant une augmentation de la teneur en chlorophylles des feuilles respectivement de vigne et de fraisier après pulvérisation foliaire d'un extrait algal.

II.2.2 Sur le métabolisme des plantes

Rathore *et al.* (2009) montrent pour du soja traité par pulvérisation foliaire d'un extrait de *Kappaphycus alvarezii* une augmentation de l'absorption de l'azote (N), du phosphore (P), du potassium (K) et du soufre (S). Ces nutriments se retrouvent d'ailleurs majoritairement dans le grain, suggérant non seulement une augmentation de l'absorption mais également une meilleure remobilisation au cours de la phase de remplissage des graines. Mancuso *et al.* (2006) montrent également une stimulation de l'absorption de nutriments tels que N, P et K chez la vigne traitée en pulvérisation foliaire par un extrait algal IPA (extrait fourni par la société BiotechMarine). Les mêmes auteurs montrent également une augmentation des teneurs en magnésium dans les feuilles et en zinc dans les tiges et une augmentation de l'influx stomatique de K^+ et Ca^{2+} en réponse à l'extrait algal IPA. Ces deux ions intervenant dans le contrôle de l'ouverture des stomates (Schwartz *et al.*, 1988), Mancuso *et al.* (2006) suggèrent ainsi que l'augmentation de la teneur en nutriments des plantes en réponse à une pulvérisation foliaire d'extrait algal serait, en partie, due à l'entrée des nutriments (contenus dans l'extrait) au niveau des stomates.

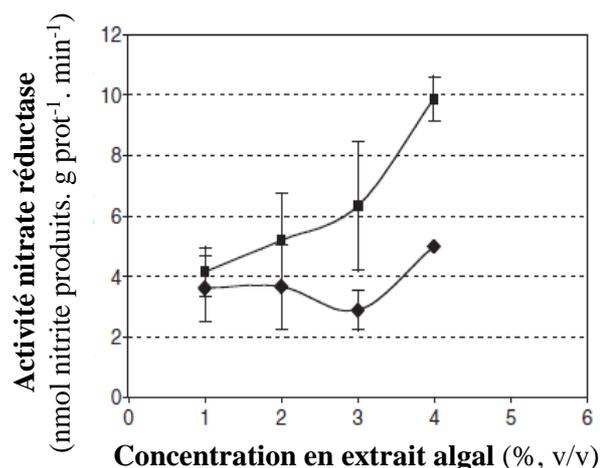


Figure I-9 : Activité de la nitrate réductase dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* traitées ou non par un extrait algal N-PRO (nom commercial d'un extrait manufacturé par le groupe Roullier). Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* sont cultivées pendant 3 semaines en boîte de Pétri sur un milieu solide contenant 9 mM de nitrate comme seule source d'azote. Le milieu solide contient également des doses croissantes d'extrait algal N-PRO (de 0 à 4% (v/v)). Pour la moitié des plantes, le milieu solide contient 1% de saccharose (losanges noirs, milieu de croissance normal). Pour la deuxième moitié, la culture se passe en absence de sucre (carrés noirs, milieu carencé). L'activité nitrate réductase est mesurée *in vitro* dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* au bout des 3 semaines de culture. Pour les plantes cultivées en présence de saccharose, seule la concentration la plus élevée en extrait algal induit une augmentation de l'activité nitrate réductase. Au contraire, en absence de saccharose, l'induction de l'activité nitrate réductase est observée dès 2% d'extrait algal dans le milieu, suggérant que l'effet de l'extrait algal est potentialisé en absence de saccharose dans le milieu. (D'après Durand *et al.*, 2003)



Figure I-10 : Effets de l'application d'un extrait d'*Ascophyllum nodosum* sur la croissance de plants de carotte (*Daucus carotta*) infectés par un agent pathogène (*Alternaria radicina*). Les graines de carotte sont stérilisées puis mises en culture en pot. 8 semaines après la germination, le premier traitement est appliqué : les plantes sont pulvérisées avec de l'eau (**Control**), un extrait d'*Ascophyllum nodosum* à 0,2% (v/v) (**SW**) ou une solution d'acide salicylique à 100 μ M (**SA**). Les plantes sont ensuite inoculées avec l'agent pathogène. Les traitements précédents sont répétés 10 et 20 jours après l'inoculation. Pour le traitement avec un fongicide, une seule application est réalisée 7 jours après inoculation (**Fungicide**). Les photos sont prises 25 jours après inoculation de l'agent pathogène. L'application d'extrait algal protège les plantes contre l'agent pathogène de manière aussi efficace qu'une application de fongicide ou d'acide salicylique. (D'après Jayaraj *et al.*, 2008)

Durand *et al.* (2003) et Mériçout (2006) se sont focalisés sur les modifications du métabolisme azoté induites par les extraits algaux. Mériçout (2006) montre une augmentation du contenu en nitrate dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* traité par pulvérisation foliaire avec un extrait algal. Durand *et al.* (2003) rapportent quant à eux, une augmentation de l'activité nitrate réductase chez *Arabidopsis thaliana* en réponse à un extrait algal N-PRO (nom commercial d'un produit manufacturé par le groupe Roullier) (fig. I-9). De façon intéressante, les auteurs comparent les effets de l'extrait algal à ceux observés après application de cytokinines. Seul l'extrait algal donne des effets bénéfiques sur la nitrate réductase, suggérant ainsi que les cytokinines présentes dans l'extrait ne seraient pas les seules responsables de l'effet bénéfique du N-PRO sur le métabolisme azoté. Contrairement aux études sur la croissance, les auteurs étudiant les effets positifs des extraits algaux sur l'absorption minérale par les végétaux proposent d'autres modes d'action que les phytohormones. Ainsi, certains auteurs suggèrent que les nutriments présents dans les extraits pourraient stimuler le métabolisme nutritionnel des plantes (Durand *et al.*, 2003). Cependant, cette hypothèse est difficilement généralisable à l'ensemble des extraits algaux puisque, suivant l'espèce d'algue considérée, la période de récolte ou le procédé d'extraction, la composition minérale de l'extrait algal peut considérablement varier. Ainsi, bien que les effets bénéfiques d'un apport d'extrait algal sur les plantes soient constatés, il reste beaucoup de zones d'ombre concernant les régulations métaboliques qui permettent *in fine* l'augmentation de la croissance des végétaux.

II.2.3 La résistance aux stress

Les extraits d'algues sont aussi connus pour stimuler les systèmes de défense naturels des plantes en réponse à un stress biotique (Mercier *et al.*, 2001 ; Cluzet *et al.*, 2004 ; Jayaraj *et al.*, 2008 ; Subramanian *et al.*, 2011) ou abiotique (Mancuso *et al.*, 2006 ; Rayirath *et al.*, 2009 ; Khan *et al.*, 2009).

Concernant les stress biotiques, il s'agit majoritairement de la résistance des plantes à des attaques d'agents pathogènes de type fongiques. Ainsi, Subramanian *et al.* (2011) montrent qu'un extrait d'*Ascophyllum nodosum* permet de diminuer la taille et le nombre des lésions des plants d'*Arabidopsis thaliana* infectée par *Pseudomonas syringae* ou *Sclerotinia sclerotiorum*. De même, Jayaraj *et al.* (2008) montrent qu'une pulvérisation foliaire d'un extrait d'*Ascophyllum nodosum* limite les nécroses sur les plants de carotte inoculés avec les pathogènes *Alternaria radicina* (fig. I-10) ou *Botrytis cinerea*. En parallèle de cette réduction

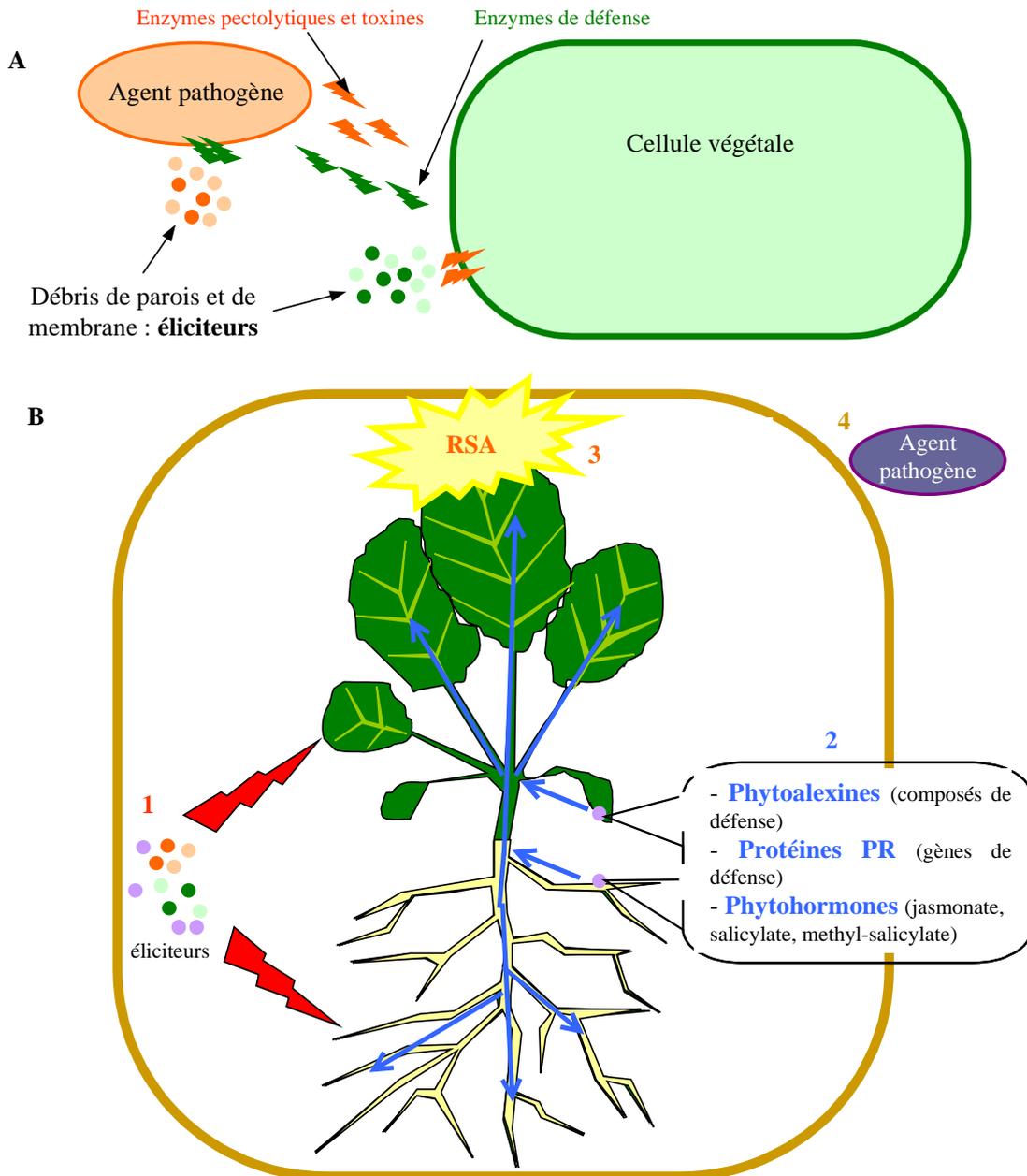


Figure I-11 : L'induction de la résistance aux agents pathogènes chez les plantes. Lors de l'attaque d'une cellule végétale par un agent pathogène (**A**), le pathogène produit des enzymes pectolytiques (pectine méthylesterases, cutinases, glucosidases ...) et des toxines afin de percer la paroi végétale. Suite à cette attaque, la cellule végétale se défend en produisant non seulement des inhibiteurs d'endopolygalacturonase afin de contrer les enzymes de l'agent pathogène mais également des enzymes de défense comme les chitinases ou les pectine méthylestérases. Cette première phase d'interaction entre la plante et l'agent pathogène se produit au niveau foliaire ou racinaire (**B1**) suivant le type de pathogène et libère des débris de parois et de membrane issus de la plante (ronds verts) ou de l'agent pathogène (ronds oranges). Ces débris, constitués majoritairement d'oligosaccharides sont appelés éliciteurs. D'autres oligosaccharides peuvent également jouer le rôle d'éliciteurs de défenses de la plante, par exemple ceux contenus dans les extraits algaux (ronds violets). Ces éliciteurs sont captés par des récepteurs au niveau de la membrane des végétaux et induisent une cascade de réactions conduisant à une première réaction de défense au niveau du site d'infection (**B2**). Elle se traduit par l'induction de gènes de défense (les gènes codant les protéines PR) et par la synthèse de composés de défense (les phytoalexines et les phytohormones). Ces derniers sont actuellement les plus couramment cités pour être des signaux diffusibles capables de se déplacer dans toute la plante pour induire les mécanismes de défense à distance et seraient donc responsables de la mise en place de la Résistance Systémique Acquisée (RSA, **B3**), un état de résistance qui protège la plante pendant quelques jours contre des attaques ultérieures d'un large spectre d'agents pathogènes (**B4**). Cependant, il n'est pas à exclure que d'autres molécules (comme des peptides par exemple) puissent être à l'origine de la mise en place de la RSA. (D'après Vallad *et al.*, 2004 ; Vlot *et al.*, 2008)

de symptômes, les auteurs observent une augmentation de l'activité d'enzymes liées à la protection contre les agents pathogènes (peroxydases ou chitinases par exemple) mais également une induction de l'expression des gènes codant des protéines PR (Pathogenesis-Related) impliquées dans les réactions de défense des plantes. Cette induction est également rapportée par Cluzet *et al.* (2004) chez *Medicago truncatula* traitée à la parasiticéine, un éliciteur protéique purifié à partir du champignon oomycète *Phytophthora parasitica*. D'une manière générale, lors de l'attaque d'agents pathogènes, les molécules élicitrices issues des fragments des parois et des membranes de la plante ou du pathogène générés lors de l'attaque (oligo- ou polysaccharides, protéines, peptides, lipides) vont induire la production de protéines PR, protéines associées aux réactions de défense de la plante (fig. I-11) et qui participeraient notamment à la mise en place, chez la plante, d'une Résistance Systémique Acquise (RSA, fig. I-11). La RSA est une forme de résistance mise en place suite à l'activation de voies de défenses génétiquement programmées dans la plante. Les protéines PR et les phytoalexines induites par la première attaque participent à la mise en place de la RSA et permettent à la plante d'être résistante vis à vis d'un large spectre d'agents pathogènes. L'induction des protéines PR et d'autres gènes de défense par l'extrait algal, sans contact préalable, permettrait donc à la plante de se défendre plus rapidement et plus efficacement vis-à-vis d'une attaque par un agent pathogène. En effet, Cluzet *et al.* (2004) montrent qu'une pulvérisation foliaire d'extrait algal préalablement à l'inoculation du pathogène protège la plante plus efficacement qu'une pulvérisation foliaire concomitante à l'inoculation. Cependant, cette protection ne dure que 2 jours au maximum. L'activité élicitrice des extraits algaux serait due aux alginates qu'ils contiennent, des polysaccharides ayant une structure très proche de celle des éliciteurs produits par dégradation des parois végétales et/ou fongiques lors de l'infection de certains agents pathogènes. Les alginates des extraits algaux mimeraient donc l'action des éliciteurs naturels (Mercier *et al.* 2001, Cluzet *et al.* 2004) et permettrait ainsi une mise en place de la RSA à l'origine d'une meilleure protection de la plante en cas d'attaque par des agents pathogènes.

Les extraits d'algues en pulvérisation foliaire ont donc la propriété de limiter les effets négatifs des attaques d'agents pathogènes fongiques ou bactériens en stimulant les défenses naturelles de la plante. Mais les pathogènes fongiques ne sont pas les seuls concernés par la protection induite par les extraits algaux. Ils diminuent également les attaques des nématodes et des aphides. Ainsi, Wu *et al.* (1998) rapportent une baisse de la fécondité du nématode *Meloidogyne javanica* en réponse au traitement d'*Arabidopsis thaliana* par un extrait

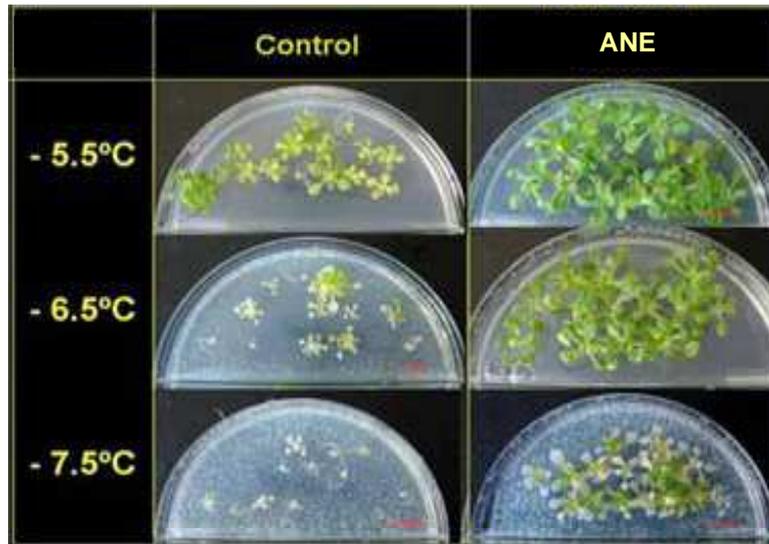


Figure I-12 : Induction de la résistance aux basses températures chez des plantules d'*Arabidopsis thaliana* traitées par un extrait d'*Ascophyllum nodosum*. Les graines d'*Arabidopsis thaliana* sont mises à germer directement en boîte de Pétri sur un milieu solide contenant 1% de saccharose additionné (ANE) ou non (Control) de 1 g.L⁻¹ d'extrait d'*Ascophyllum nodosum*. Les graines sont ensuite mises à germer à 18°C. 10 jours après la germination, la température de la chambre de culture est descendue à -2°C pendant 24h puis baissée progressivement (de 1°C par jour) jusqu'à atteindre la température désirée : -5,5; -6,5 ou -7,5°C. Après 24h à la température désirée, les boîtes de Pétri sont placées 12h à 4°C puis remises dans des conditions normales de culture (18°C). Le taux de survie des plantules est mesuré 48h après le retour aux conditions normales de culture. (D'après Rayirath *et al.*, 2009)

d'*Ascophyllum nodosum*. De même, Hankins et Hockey (1990) montrent une diminution du nombre de parasites du genre *Tetranychus urticae* sur des fraisiers traités par un extrait d'*Ascophyllum nodosum*. Les extraits algaux agiraient par un effet d'inappétence lié aux métaux chélatés qu'ils contiennent (Khan *et al.* 2009). Par ailleurs, Wu *et al.* (1998) montrent également que la réduction de la fécondité du nématode observée en réponse aux extraits algaux est comparable à ce qui a pu être observé en réponse à un traitement par des bêtaïnes. Ces molécules présentes dans les extraits algaux pourraient donc également être responsables de la protection des plantes contre les ravageurs de type nématodes ou aphides. Par ailleurs, outre une meilleure protection des plantes contre les stress biotiques, les extraits algaux sont également bénéfiques pour la résistance des plantes aux stress abiotiques.

En effet, Rayirath *et al.* (2009) montrent une augmentation de la résistance au stress thermique (basses températures) pour des plantules d'*Arabidopsis thaliana* cultivées sur un milieu nutritif supplémenté en extrait d'*Ascophyllum nodosum* et exposées au froid (de -5,5 à -7,5 °C, fig. I-12). Les auteurs rapportent une augmentation du taux de survie ainsi qu'une diminution des dommages visibles sur les feuilles en réponse à l'extrait algal comparé à un témoin non traité. Mancuso *et al.* (2006) montrent, quant à eux, une augmentation de la résistance au stress hydrique pour la vigne suite à la pulvérisation foliaire d'un extrait d'algue IPA. Ce traitement permet de limiter la baisse du potentiel hydrique foliaire, de l'activité photosynthétique et de la conductance stomatique lors de la période de stress mais également d'accélérer le retour à des valeurs normales pour ces mêmes paramètres lors de la levée du stress. Les auteurs attribuent cette protection contre les stress aux composés protecteurs présents dans les extraits algaux comme les bêtaïnes, les oligosaccharides ou les composés lipophiles. Cependant, les composés lipophiles, qui représentent 40% de la composition de l'extrait dans le cas de l'étude de Rayirath *et al.* (2009), sont séduisant comme composés protecteurs mais leur efficacité contre le stress thermique en application seule n'a jamais été démontrée dans la littérature. Les bêtaïnes quant à elles sont bien connues pour faire partie du groupe des solutés compatibles. Ces molécules sont généralement des composés très solubles de faibles poids moléculaires pouvant s'accumuler dans la cellule jusqu'à des concentrations très élevées sans devenir toxiques. Parmi ces molécules, en plus de la bêtaïne, se trouve potentiellement les fructanes, le mannitol, la proline, le sorbitol ou le trehalose. En s'accumulant, ils permettent de protéger la machinerie cellulaire contre des stress tels que le stress hydrique, thermique, salin ou oxydatif (pour revue, Chen & Murata, 2002). C'est pourquoi, certains travaux de recherche se sont orientés vers la création de plantes

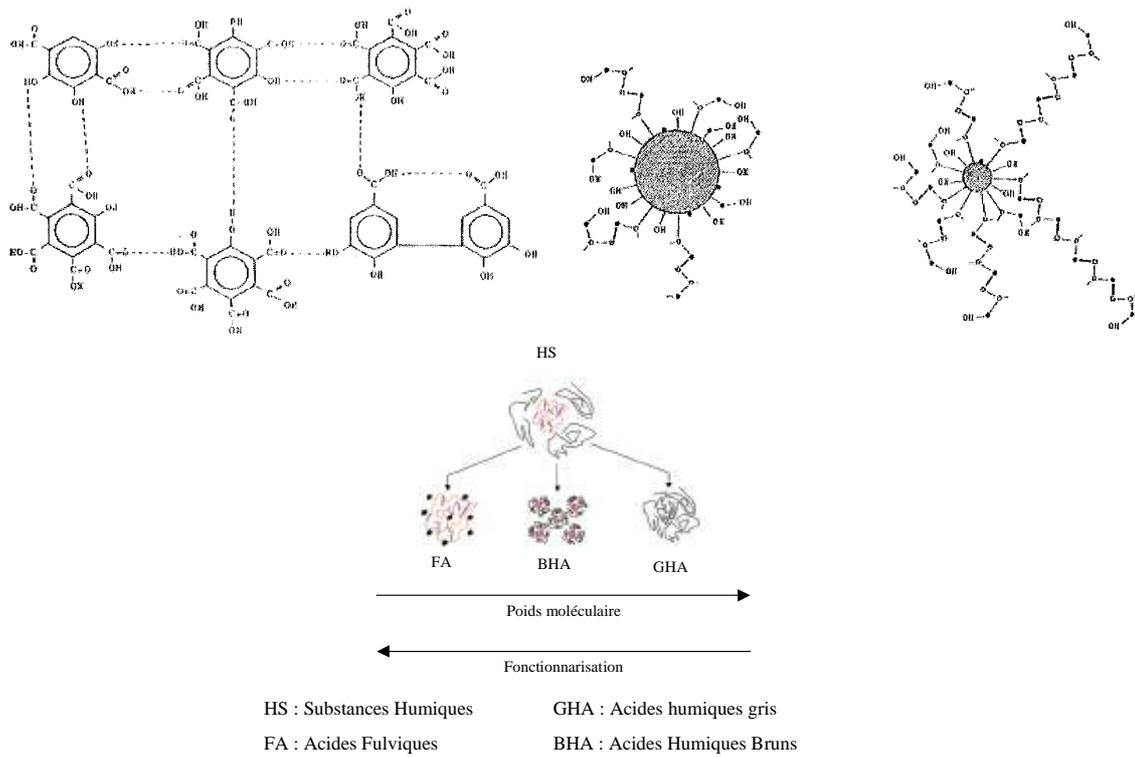


Figure I-13 : Schéma de la structure d'un acide humique. Du fait de leurs fortes masses moléculaires, la structure exacte de ces molécules est difficile à établir. Cependant, il est connu que les acides humiques font partie, avec les acides fulviques, d'un ensemble général appelé "substances humiques". La séparation des différents constituants des substances humiques se réalise facilement en raison de leurs différences de solubilité: les acides humiques sont solubles à pH basique alors que les acides fulviques sont solubles à pH acide (Baigorri *et al.*, 2007).

transgéniques exprimant de façon constitutive les gènes de synthèse des bêtaïnes, ces plantes possédant alors une résistance accrue aux stress (Holmström *et al.*, 2000 ; Sakamoto & Murata, 2002). L'application d'extraits algaux sur les cultures pourrait alors remplacer l'utilisation de plantes transgéniques de par son apport de bêtaïnes, au moins en l'agriculture biologique.

Bien que les effets physiologiques des extraits algaux soient assez bien décrits dans la littérature, il n'en demeure pas moins que les mécanismes d'action de ces extraits sont encore mal connus. En effet, la plupart du temps, les mécanismes d'action sont déduits par analogie avec des effets de composés appliqués séparément sur les cultures. Comme nous venons de le voir, les principaux bénéfices de l'apport d'extrait d'algue aux cultures se manifestent par une augmentation de la croissance et/ou une stimulation des systèmes de défense naturels des plantes. A ce titre, les extraits algaux actuellement commercialisés présentent les qualificatifs «d'activateur de croissance» ou de «stimulateurs des défenses naturelles». Par ailleurs, les extraits algaux ne sont pas les seules molécules commercialisées en tant qu'activateurs de croissance, il existe également des solutions à base d'acide humiques.

III. Application de biostimulants dérivés d'acides humiques

III.1 Les acides humiques : un ensemble de molécules complexes

Les substances humiques sont des composants majeurs des écosystèmes terrestres et aquatiques. Elles résultent de la dégradation de la matière organique par la faune et la microfaune du sol. Les substances humiques sont composées d'un ensemble de composants divers de faible poids moléculaire formant des associations dynamiques stabilisées par des interactions hydrophobes et des interactions hydrogènes (Conte & Piccolo, 1999 ; Smejkalova & Piccolo, 2008) (fig. I-13). Ces associations sont capables de s'organiser en micelles dans des environnements aqueux adéquats (Varga *et al.*, 2000 ; Sutton & Sposito, 2005).

Les substances humiques sont généralement des mélanges complexes d'acides humiques, d'acides fulviques et d'humine (fig. I-13). Le fractionnement des substances humiques en leurs différents constituants se fait sur la base des pH de solubilisation différents de ces constituants. Ainsi, à partir des substances humiques brutes en poudre telles que la tourbe ou les fèces de vers de terre, la dilution dans une solution basique permet de séparer

l'humine (qui va précipiter) des acides humiques et fulviques qui restent solubles. La séparation entre acides humiques et fulvique se fait ensuite par acidification de la solution : les acides humiques précipitent et les acides fulviques restent solubles. Les acides humiques constituent la partie la plus active des substances humiques de par leur capacité d'interactions avec les molécules organiques et inorganiques. Ces capacités d'interactions dépendent de la structure chimique et de la composition de ces acides humiques (Barancikova *et al.*, 1997). Dans ce sens, Kozuch & Pempkowiak (1996), Christl & Kretzschner (2001), Muscolo *et al.* (2007a) et Canellas *et al.* (2010) montrent que les acides humiques présentant les plus faibles masses moléculaires possèdent les plus forts effets sur les plantes.

La structure des acides humiques commence donc à être connue de façon précise grâce à de nouvelles techniques de plus en plus élaborées (HPSEC, RMN...). Cela permet mieux appréhender les relations qui peuvent exister entre les propriétés physico-chimiques des acides humiques et leurs effets sur le sol et/ou les plantes.

III.2 Les effets avérés des acides humiques

De même que pour les extraits algaux, les actions bénéfiques de l'application d'acides humiques sur les cultures est connu empiriquement depuis de nombreuses décennies. Cependant, lorsque les chercheurs ont commencé à étudier les propriétés des acides humiques, deux hypothèses ont rapidement émergé concernant leur mode d'action :

- Un premier groupe d'équipes de recherche (Piccolo *et al.*, 1997a ; Imbufe *et al.*, 2005 ; Abiven *et al.*, 2009) postule que l'effet bénéfique des acides humiques sur les cultures serait dû à l'amélioration des propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol. Cette amélioration du sol créerait des conditions propices au meilleur développement et à la meilleure croissance du végétal observée lors de l'application d'acides humiques.
- Pour d'autres auteurs au contraire (Dell'Agnola & Nardi, 1987 ; Pinton *et al.*, 1999 ; Quaggiotti *et al.*, 2004), l'application d'acides humiques aurait un effet direct sur la plante. De même que pour les extraits algaux, des molécules présentes dans les acides humiques, telles que les phytohormones par exemple, seraient responsables des modifications physiologiques et métaboliques observées chez les plantes en réponse à un traitement aux acides humiques.

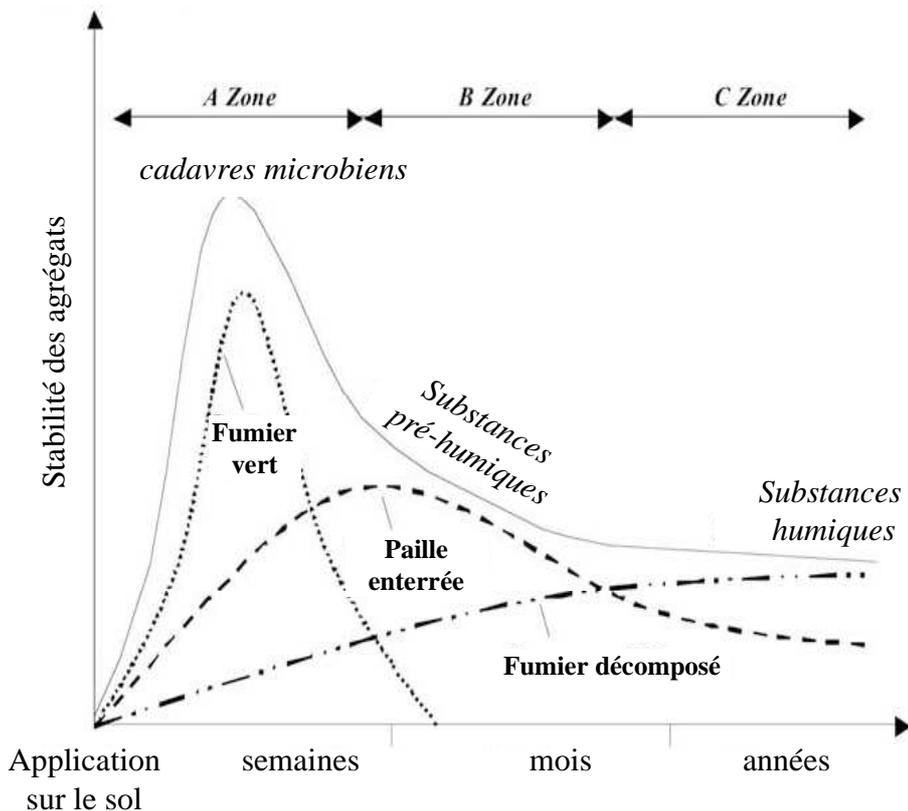


Figure I-14 : Effets de différentes substances humiques sur la stabilité des agrégats du sol. Suivant leurs origines (fumier vert , paille enterrée ---- ou fumier décomposé -.-.-), les substances humiques possèdent un pic de stabilisation du sol plus ou moins longtemps après leur application. Celui-ci correspond au maximum de dégradation ou de compostage de la matière par la microflore microbienne comme le montre la courbe "témoin" pleine. Cette courbe montre l'action sur le sol des substances pré-humiques (après quelques mois de dégradations des fumiers) ou de substances humiques pures (après quelques années de dégradation des fumiers). (D'après Abiven *et al.*, 2008)

Tableau I-1 : Capacité d'échange cationique (CEC) de quelques constituants et horizons de sol. La capacité d'échange cationique des sols est définie par le nombre de moles de charge + par kilogramme de sol sec. Les quatre cations échangeables majeurs sont Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} et Na^{+} . Les constituants et les horizons présentant la plus forte CEC sont les acides humiques et les horizons humifères. (Morel, 1996)

Constituants ou type d'horizon	CEC (en cmol de charge + . kg ⁻¹ de sol)
Argile 1/1 - kaolinite	2 - 15
Argile 2/1 - montmorillonite	80 - 150
Matière organique du sol	60 - 280
Acides humiques purs	485 - 870
Horizon C, sols sableux	1 - 5
Horizon S sur limon d'altération	18
Horizon A, sols argileux-humifères	60 - 80

Nous allons donc dans cette partie présenter les arguments proposés par les auteurs soutenant ces deux principales hypothèses de fonctionnement qui ne sont pas exclusives.

III.2.1 Sur les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol

Les acides humiques sont des constituants fondamentaux du sol, issus de la dégradation de substances organiques non vivantes animales, végétales ou microbiennes par les micro-organismes et la faune du sol. Ils jouent un rôle essentiel dans la qualité du sol et sont en partie responsables de l'amélioration de ses propriétés physiques et chimiques.

Dans le sol, l'alternance d'humidification et de séchage induit la casse des agrégats de grande taille en particules plus petites sujettes à l'érosion et à la dispersion. Un apport supplémentaire d'acide humique permet donc, par stabilisation des agrégats (Piccolo *et al.*, 1997a ; Imbufe *et al.*, 2005 ; Abiven *et al.*, 2008), de limiter l'érosion (Piccolo *et al.* 1997b) et d'éviter le lessivage de l'azote et du carbone (Andersson *et al.*, 2000 ; Bossuyt *et al.*, 2007) (fig. I-14). Les acides humiques sont des substances hétérogènes incluant sur la même molécule des groupements hydrophiles acides et des groupements hydrophobes. Lorsque les groupements acides se dissocient en solution, au contact des agrégats du sol, ils réagissent avec les cations polyvalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}) présents à la surface des argiles. Comme ces groupements acides sont présents sur toute la surface de l'acide humique, la chélation des cations peut intervenir simultanément sur plusieurs particules d'argile, entraînant la stabilisation de la structure (Piccolo *et al.*, 1997a). Les acides humiques ont donc également un effet sur la dynamique des ions dans le sol.

D'une manière générale, les ions présents dans le sol sont disponibles sous deux formes : en solution dans l'eau, forme particulière disponible pour l'alimentation des végétaux, ou adsorbés sur les complexes argilo-humiques, qui constitue une forme de réserve (Duchaufour, 1970). Le passage des ions entre la forme disponible et la forme de réserve est appelé échange. Le sol est alors défini par sa capacité d'échange cationique (CEC). La CEC d'un sol est la quantité de cation qu'il peut retenir. Elle correspond à la somme des principaux cations échangeables fixés sur les sites négatifs de la matrice du sol, il s'agit essentiellement des ions calcium, magnésium, potassium et sodium. Les acides humiques présentent une forte CEC (tableau I-1) liée principalement, comme présenté dans le paragraphe précédent, à leur capacité à former des complexes avec les particules d'argile. Ces complexes participent donc à la séquestration des ions Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ et Na^+ dans le sol puis à leur libération progressive

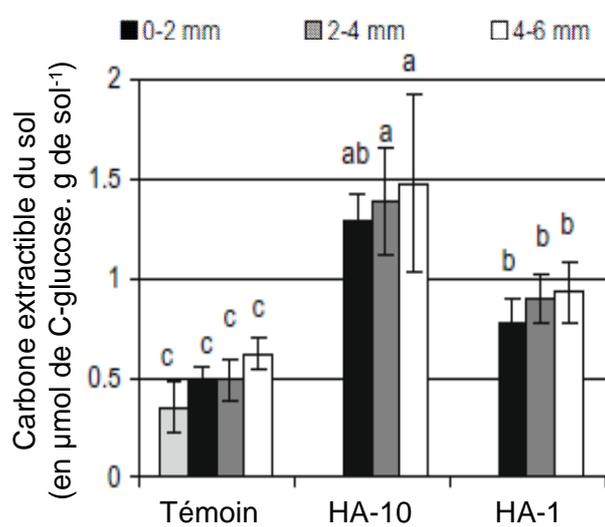


Figure I-15 : Effets de l'application de différentes concentrations en acide humique sur la quantité de carbone extractible du sol. L'expérience est conduite en système de rhizobox, des boîtes en Plexiglas séparées en 2 compartiments (un au dessus "supérieur" et un au dessous "inférieur") par une membrane. Le compartiment supérieur est celui qui reçoit le traitement: soit aucune addition de matière organique (Témoin), soit 140 mg de carbone organique par kg de sol (HA-10) soit 14 mg de carbone organique par kg de sol (HA-1). La membrane séparant les deux compartiments empêche le passage des grosses molécules dans le compartiment inférieur. Juste après le traitement du sol, des graines de maïs sont mises à germer dans les rhizobox. 10 jours après la germination, la membrane séparant les deux compartiment de la rhizobox est enlevée de manière à laisser passer les racines. 15 jours plus tard, le sol du compartiment inférieur est analysé 0-2 mm, 2-4 mm et 4-6 mm après la membrane. (D'après Puglisi *et al.*, 2009)

selon les besoins de la plante. En plus de ces ions, caractéristiques de la CEC, les acides humiques ont également la capacité de chélater les ions métalliques (Fe^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} par exemple), les rendant ainsi plus facilement disponibles pour les plantes (Esparza *et al.*, 2005 ; Garcia-Mina, 2006).

De plus, l'application d'acides humiques sur le sol aurait des effets bénéfiques sur la communauté bactérienne en augmentant la quantité de carbone et d'azote extractible. Ainsi, une augmentation de la biomasse microbienne a été montrée pour des cultures de fraisiers sur du sol amendé avec du vermicompost (acides humiques extraits de fèces de vers de terre, Arancon *et al.*, 2006). Dans ce cas, l'application de vermicompost augmente significativement le contenu en azote et en ammonium extractible du sol. Cookson *et al.* (2005) obtiennent des résultats similaires dans leur expérimentation où la suppression de la matière organique du sol diminue le contenu en azote potentiellement minéralisable du sol, suggérant que la matière organique soit le substrat préférentiel de la flore du sol. Puglisi *et al.* (2009) quant à eux, montrent non seulement une augmentation de la biomasse microbienne mais également un changement dans les communautés microbiennes présentes dans la rhizosphère du maïs. Il est intéressant de noter dans cette étude que les bacs de terre servant pour l'expérimentation sont divisés en deux dans le sens de la longueur, les acides humiques étant appliqués sur la partie supérieure alors que les effets sur les communautés bactériennes ont été mesurés dans la partie inférieure (fig. I-15). Pour les auteurs, les effets des acides humiques dans la partie inférieure ne peuvent donc être médiés que par la physiologie de la plante et non pas par un effet direct des acides humiques. Puglisi *et al.* (2009) suggèrent alors que ces effets bénéfiques sur la communauté bactérienne seraient dus à l'augmentation de la sécrétion de carbone organique par les racines des plantes traitées. Cette étude fait donc le lien entre les deux hypothèses qui s'affrontent sur le mode d'action des acides humiques : un effet bénéfique des acides humiques sur le sol qui crée un environnement de culture plus propice pour les plantes et alternativement ou de façon additionnelle une action directe des extraits sur la plante.

III.2.2 Sur la croissance et le cycle de développement des plantes

Pour tester l'hypothèse d'un effet direct des acides humiques sur les plantes, les cultures sont réalisées majoritairement en hydroponie, s'affranchissant ainsi totalement de l'élément sol. Les acides humiques peuvent également être appliqués directement en pulvérisation foliaire, toujours pour éviter toute interférence avec le compartiment sol.

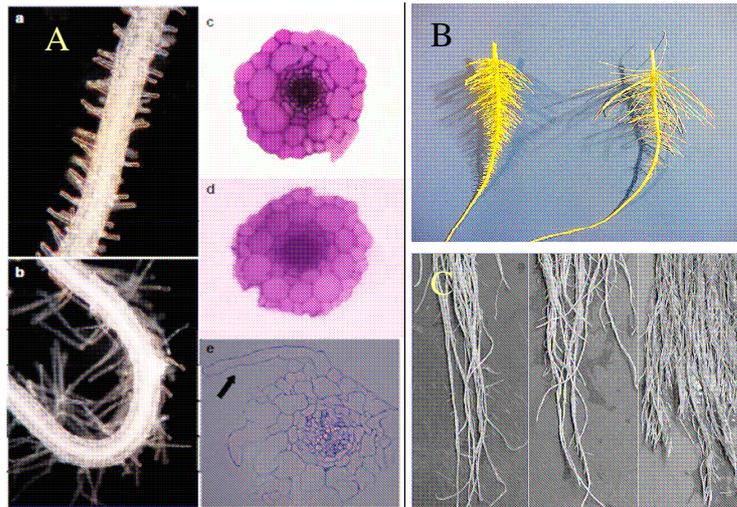


Figure I-16 : Effets d'un traitement aux acides humiques sur l'architecture racinaire des plantes. A. Effets sur *Arabidopsis thaliana* : a- poils absorbants des plantes témoin, b- poils absorbants des plantes traitées, c- section racinaire des plantes témoin, d- et e- section racinaire des plantes traitées par un acide humique. B. Effets sur le maïs (*Zea mays*) : Système racinaire des plantes traitées par un acide humique (à gauche) et des plantes témoin (à droite). C. Effets sur le concombre (*Cucumis sativus*) : Architecture racinaire des plantes témoin (à gauche) et traitées par un acide humique à une concentration de 5 mg.L⁻¹ de Carbone (au centre) ou de 100 mg.L⁻¹ de Carbone (à droite). Tous les auteurs, quelle que soit la plante étudiée, constatent une modification de l'architecture racinaire en réponse à un apport racinaire d'acides humiques. Cette modification intervient non seulement au niveau du nombre de racines secondaires mais également au niveau du nombre de poils absorbants. La surface racinaire en contact avec le milieu s'en trouve ainsi grandement augmentée pour les plantes traitées. (D'après Schmidt *et al.*, 2007; Eyheraguibel *et al.*, 2008; Mora *et al.*, 2010)

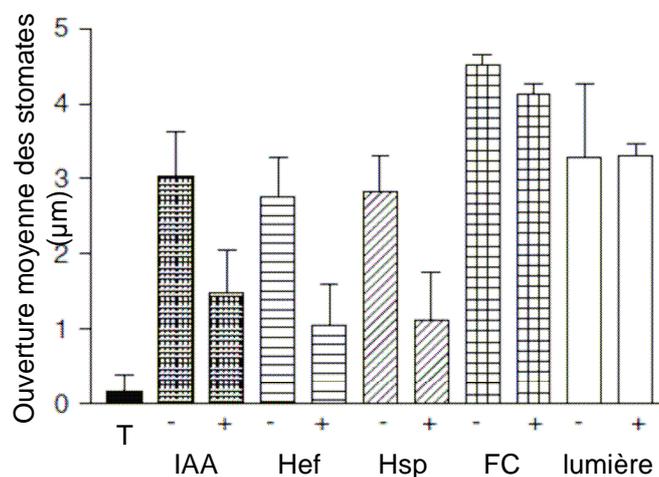


Figure I-17 : Effets de l'application de différents traitements sur l'ouverture des stomates du pois (*Pisum sativum*). Les plants de pois sont mis en culture pendant 3 à 5 semaines sur du sol. A l'issue de la culture, l'épiderme inférieur des feuilles complètement développées est prélevé puis mis à flotter dans du tampon MES. Les échantillons sont alors incubés pendant 1h à l'obscurité puis les traitements suivants sont appliqués pendant 5 min : Témoin sans traitement (T), 1μM d'auxine (IAA), 100 mgC.L⁻¹ d'acide humique à faible poids moléculaire (<3500 Da, Hef) ou fort poids moléculaire (>3500 Da, Hsp), 500 nM de fusicoccin (FC). L'effets de chacun de ces traitements sur l'ouverture des stomates est mesuré en absence (-) ou en présence (+) d'un inhibiteur de la phospholipase A2 (ETYA : acide 7,7-diméthyl-5,8-éicosadiénoïque). Le traitement aux acides humiques donne une réponse similaire à celle obtenue par un traitement à l'auxine, alors que la lumière donne un profil différent. Les résultats suggèrent que la voie de signalisation des acides humiques est la même que celle de l'auxine, au moins pour leurs actions sur les stomates. (D'après Russell *et al.*, 2006)

Dans ces conditions, Eyheraguibel *et al.* (2008) rapportent une germination et un passage au stade reproducteur plus rapide pour des maïs en contact avec un extrait d'acide humique dans la solution nutritive. Ce cycle de développement plus rapide s'accompagne d'une augmentation significative de la biomasse des plantes traitées résultant majoritairement d'une modification de l'architecture racinaire et plus particulièrement d'une prolifération du système racinaire secondaire. Cette prolifération du système racinaire secondaire en réponse à une application d'acides humiques semble être l'effet principal observé dans la mesure où il est rapporté par la majorité des auteurs (par exemple sur *Arabidopsis*, maïs et concombre, fig. I-16). Ainsi, Atiyeh *et al.* (2002) et Mora *et al.* (2010) montrent qu'une application racinaire sur concombre d'acide humique provenant de résidus organiques compostés ou extrait de sédiments provoque une augmentation significative de la biomasse racinaire comparé à des plantes témoin non traitées. Pour compléter ces études sur l'augmentation de la biomasse racinaire, Schmidt *et al.* (2007) montrent une modification de l'architecture racinaire d'*Arabidopsis thaliana* et en particulier de la formation des poils absorbants en réponse à un acide humique extrait de tourbe. Parallèlement, il est constaté une augmentation de la longueur de ces poils absorbants. Ayuso *et al.* (1996) quant à eux, comparent les effets de deux types d'acides humiques sur une culture d'orge et obtiennent des résultats similaires aux études précédentes sur la biomasse racinaire accompagnée d'une augmentation de la biomasse aérienne. De même que pour les extraits algaux (paragraphe §II.2.2), les auteurs attribuent majoritairement ces effets aux phytohormones contenues dans les acides humiques ou à leur action hormone-like. Par ailleurs, certains auteurs rapportent que les effets positifs sur la croissance des plantes pourraient également être dus aux nutriments (Forde et Lorenzo, 2001) et/ou aux polyamines (Couée *et al.*, 2004) présents dans l'extrait.

Par ailleurs, dans plusieurs études, cette augmentation de la biomasse aérienne est accompagnée d'une augmentation de l'ouverture des stomates et de la teneur en chlorophylles des feuilles. Russell *et al.* (2006) observent chez *Pisum sativum* une ouverture des stomates à l'obscurité en réponse à un traitement aux acides humiques issus de fèces de vers de terre (fig. I-17). Cette ouverture des stomates est inférieure à celle induite par la lumière blanche, cependant, elle est du même ordre de grandeur que l'ouverture des stomates induite par un traitement à l'auxine à l'obscurité. De même, des expériences d'inhibition de la phospholipase PLA2, connue pour modérer les effets de l'auxine sur les stomates mais pas l'effet de la lumière blanche, diminue également l'ouverture induite par les acides humiques, suggérant que l'effet de ces derniers sur les stomates emprunte la même voie de signalisation que

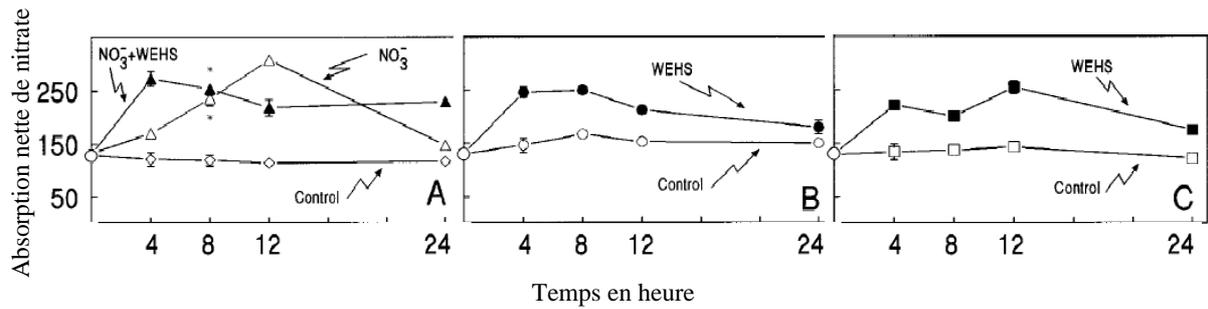


Figure I-18 : Effets d'un traitement par un acide humique issu de tourbe (WEHS) sur l'absorption nette de nitrate (en $\text{nmol NO}_3^- \cdot \text{g MF}^{-1} \text{ racinaire} \cdot \text{min}^{-1}$) par le maïs (*Zea mays*). Les plants de maïs sont cultivés pendant 4 jours en présence d'une solution nutritive contenant $200 \mu\text{M}$ de nitrate puis mis en contact pendant 4, 8, 12 ou 24h avec des solutions ayant les compositions suivantes: **A.** Control = solution contenant $25 \mu\text{M}$ d'ammonium, NO_3^- = solution contenant $25 \mu\text{M}$ d'ammonium + $200 \mu\text{M}$ de nitrate, NO_3^- +WEHS = solution contenant $25 \mu\text{M}$ d'ammonium + $200 \mu\text{M}$ de nitrate + 5 mg de carbone organique. L^{-1} d'acide humique. **B.** Solution nutritive sans azote avec (WEHS) ou sans (Control) addition de 5 mg de carbone organique. L^{-1} d'acide humique. **C.** Solution de CaSO_4 à 5 mM avec (WEHS) ou sans (Control) addition de 5 mg de carbone organique. L^{-1} d'acide humique.

A l'issue de ces traitements, les racines des plantes sont collectées, rincées puis immergées pendant 10 min dans une solution contenant $200 \mu\text{M}$ KNO_3 et 4 mM CaSO_4 . L'absorption nette de nitrate est alors mesurée par la disparition du nitrate dans la solution. (D'après Pinton *et al.*, 1999)

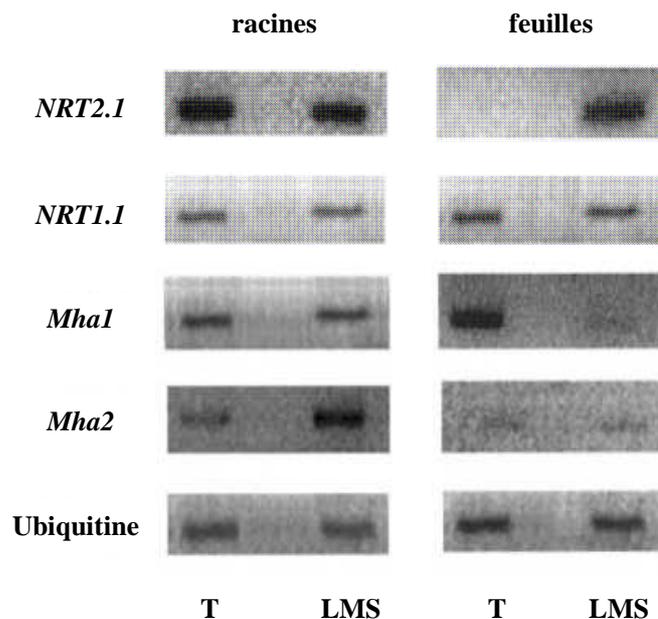


Figure I-19 : Effets d'un apport d'acide humique de faible masse moléculaire sur le niveau d'expression des gènes impliqués dans le transport du nitrate chez le maïs (*Zea mays*). Les graines de maïs sont mises à germer pendant 96h puis les plantules sont cultivées pendant 14 jours sur de la solution nutritive Hoagland. Les plantes sont ensuite incubées pendant 48h soit dans une solution d'acide humique de faible masse moléculaire à $0,75 \text{ mgC} \cdot \text{L}^{-1}$ (LMS) soit dans une solution de CaSO_3 à 1 mM (T). A la fin du traitement les ARN sont extraits puis analysés par PCR semi-quantitative. Le niveau d'expression de 4 gènes est alors mesuré dans les feuilles et les racines des plantes traitées et témoin : le transporteur de nitrate à haute affinité *NRT2.1*, le transporteur de nitrate à faible affinité *NRT1.1* ainsi que deux isoformes de la pompe H^+ /ATPase membranaire, *Mha1* et *Mha2*. Le gène de l'ubiquitine est utilisé comme contrôle de charge et de PCR. (D'après Quaggiotti *et al.*, 2004)

l'auxine. Cette conclusion rejoint alors les études précédentes et suggère que les effets des acides humiques seraient médiés par les phytohormones. Cependant, il est connu que les stomates réagissent aux stimuli extérieurs comme les radiations lumineuses, la température, le vent ou l'humidité (Jones, 1998). Dans les études précédemment citées, il devient alors difficile de savoir si les modifications d'ouverture des stomates induites par les acides humiques sont dues aux conditions expérimentales (le morceau de feuille étant baigné dans du tampon) ou plus spécifiquement à l'auxine contenue dans l'extrait. Quoi qu'il en soit, ces effets sur les stomates s'accompagnent de modifications des activités respiratoires et photosynthétiques. En outre, Tejada & Gonzalez (2004) montrent que du riz traité avec des acides humiques présente une teneur significativement supérieure au témoin en chlorophylles a et b ainsi qu'en caroténoïdes. En parallèle, les auteurs montrent une augmentation des teneurs foliaires en nutriments (N, K, Mn, Cu, Zn), suggérant ainsi une activation du métabolisme général de la plante et en particulier de l'absorption de ces nutriments.

III.2.3 Sur le métabolisme des plantes

a. Absorption des nutriments.

Les acides humiques sont connus pour leurs effets positifs sur l'absorption de nutriments, en particulier pour l'azote. Ainsi, Dell'Agnola & Nardi (1987), Pinton *et al.* (1999) et Nardi *et al.* (2000a) montrent que l'application d'une fraction d'acide humique de faible masse moléculaire (< 3500 Da) issus de fèces de lombric augmente significativement l'absorption de nitrate par *Cynodon dactylon* et par le maïs (fig. I-18). Keeling *et al.* (2003) obtiennent des résultats comparables chez le colza et le blé traités avec du compost. Chez le maïs, en parallèle de cette augmentation de l'absorption de nitrate, Quaggiotti *et al.* (2004) rapportent l'induction de gènes impliqués dans le transport du nitrate (*NRT2.1* dans les feuilles, fig. I-19). Une partie des auteurs attribuent cet effet positif sur l'absorption de nitrate aux phytohormones contenues dans les acides humiques. Ainsi, Dell'Agnola & Nardi (1987) comparent les effets des acides humiques sur l'absorption de nitrate à ceux observés en réponse à l'application d'auxine ou de gibberellines. Pinton *et al.* (1999) et Quaggiotti *et al.* (2004) quant à eux, attribuent cet effet à l'activation des pompes H^+ /ATPases membranaires racinaires (fig. I-19). Ces pompes sont connues pour maintenir le gradient de protons entre le cytoplasme et le milieu extra-cellulaire, permettant ainsi l'entrée des ions dans la cellule. Ces pompes sont normalement activées par le nitrate qui active sa propre voie d'absorption et d'assimilation. Pinton *et al.* (1999) montrent que l'activation de ces pompes en réponse aux

acides humiques est supérieure à ce qui a pu être observé en réponse à un apport de nitrate seul, suggérant ainsi que l'effet bénéfique ne serait pas dû à un simple «signal nitrate» et pourrait potentiellement modifier l'absorption d'autres éléments minéraux.

En effet, la littérature rapporte des effets stimulant des acides humiques sur l'absorption de macronutriments comme P ou S mais également sur l'absorption de plusieurs micronutriments, notamment Fe, Cu ou Zn pour les plus cités. Ainsi, Ayuso *et al.* (1996) rapportent une augmentation de l'absorption de P chez l'orge traitée avec du compost ou des acides humiques extraits de tourbe. De même, Eyheraguibel *et al.* (2008) montrent une augmentation des teneurs en S foliaires et racinaires en réponse à un traitement avec un acide humique issu de compost. Pour ces deux auteurs, ces accumulations de P et S se font en parallèle d'une accumulation d'azote. Ces mêmes auteurs montrent également des enrichissements des plantes en manganèse, fer et cuivre (Ayuso *et al.*, 1996 ; Cesco *et al.*, 2002 ; Eyheraguibel *et al.*, 2008). Garcia-Mina *et al.* (2004) obtiennent des résultats comparables chez le blé et le trèfle en testant des complexes humus-métal sur différents types de sol. En effet, même si les résultats peuvent varier en fonction du type de sol, ces auteurs montrent qu'un traitement aux acides humiques permet d'augmenter le prélèvement en fer, cuivre et zinc. Selon ces auteurs, ces effets sur les nutriments seraient dus à la capacité des complexes humus-métal à chélater les nutriments, limitant ainsi le lessivage des microéléments tout en augmentant leur disponibilité pour le végétal (Garcia-Mina *et al.*, 2004). Eyheraguibel *et al.* (2008) suggèrent quant à eux que cette augmentation de l'absorption résulte de l'augmentation de la biomasse racinaire et/ou de l'augmentation du flux hydrique. En effet, des travaux réalisés chez le maïs montrent que les acides humiques stimulent les flux hydriques de la plante. Cette plus grande consommation d'eau pourrait permettre l'augmentation de l'absorption des nutriments puisque ces deux phénomènes sont partiellement liés. Quoi qu'il en soit, il est généralement admis que les modifications de flux hydriques et d'absorption minérale s'accompagnent d'une augmentation du métabolisme cellulaire essentiel à l'assimilation des nutriments et à l'augmentation de la production de biomasse. De ce fait, on peut donc s'attendre à ce que l'apport d'acide humique induise, chez les plantes traitées, des modifications du métabolisme cellulaire

b. Métabolisme cellulaire

Nardi *et al.* (2000b) et Carletti *et al.* (2008) montrent qu'une application d'acides humiques issus de fèces de vers de terre modifie le protéome du maïs. Ainsi, les protéines

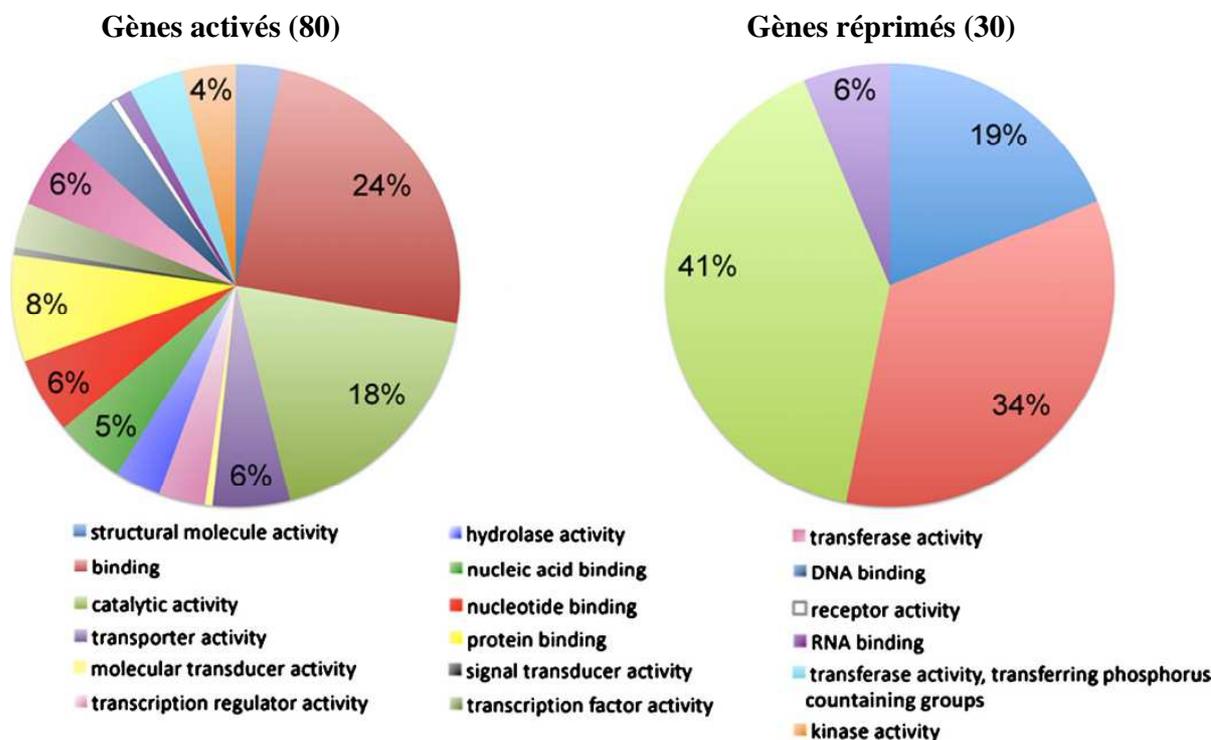


Figure I-20 : Principales voies métaboliques activées ou réprimées chez *Arabidopsis thaliana* en réponse à un traitement par 1 mgC.L⁻¹ d'acide humique. Les graines d'*Arabidopsis thaliana* sont mises à germer sur un milieu solide. Au quatrième jours après la germination, les plantules sont incubées pendant 30 ou 120 min dans une solution d'acide humique à 1 mgC.L⁻¹. Deux témoins sont réalisés, un premier au temps T₀ d'incubation et un autre à chaque point de cinétique avec des plantes incubées dans de l'eau distillée, afin de sélectionner uniquement les gènes de réponse à l'acide humique et de supprimer l'interférence de gènes liés au développement ou au stress. A chaque récolte, les ARN de 70 plantes sont extraits puis analysés selon la méthode cDNA-AFLP. Seuls les gènes différentiellement exprimés en réponse à l'acide humique et communs aux deux points de cinétique (30 et 120 min) sont retenus puis classés selon Gene Ontology. Les graphiques indiquent alors le pourcentage de gènes activés ou réprimés appartenant à chaque voie métabolique. Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre total de gènes activés ou réprimés. (D'après Trevisan *et al.*, 2011)

dont le niveau d'accumulation est affecté par les acides humiques peuvent être classées en cinq catégories (Carletti *et al.*, 2008) :

- métabolisme et énergie (sucrose synthase, malate déshydrogénase, méthionine synthase...),
- transporteurs et facilitateurs (ATPases...),
- interaction avec l'environnement (protéines 14-3-3, allène oxyde synthase...),
- signalisation (lipoxygénases, calcium-dépendante protéine kinase...),
- défense et protection de la cellule (lipoxygénases, phenylalanine ammonia-lyase...).

La majorité des protéines identifiées est réprimée en réponse à l'acide humique. A titre d'exemple, on peut citer des protéines enzymatiques impliquées dans la néoglucogénèse, telles que la glyceraldéhyde 3 phosphate deshydrogène, la phosphoglycerate mutase ou l'énolase (Muscolo *et al.*, 2007b). En outre, Nardi *et al.* (2002a, 2007) montre une activation des voies d'absorption et d'assimilation de l'azote, ainsi que de la glycolyse et du cycle de Krebs, chez des plantules de maïs en réponse à un traitement aux acides humiques. Muscolo *et al.* (1999) quant à eux rapportent une augmentation de l'activité enzymatique de la glutamate deshydrogène, de la glutamine synthase et de la phosphoenolpyruvate carboxylase pour des plants de carotte traités avec des acides humiques. De façon surprenante, la plupart de ces enzymes interviennent dans le métabolisme azoté de la plante et sont donc susceptibles d'être induits par le nitrate. Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle les acides humiques agiraient sur la plante en modifiant la disponibilité des nutriments. Cependant, dans une étude plus récente sur les effets des acides humiques, Trevisan *et al.* (2011) se concentrent sur des techniques moléculaires (AFLP et PCR) pour montrer un effet majoritairement positif, avec un acide humique contenant des auxines, sur une centaine de gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire primaire, la croissance et le développement (fig. I-20). Parmi ces gènes dont l'expression est augmentée par le traitement, on trouve notamment des gènes de réponse aux phytohormones, des gènes codant les protéines des photosystèmes I et II, ainsi que des gènes codant des facteurs de transcription. Ces résultats confirment alors les études physiologiques rapportant les effets des acides humiques sur les différentes voies métaboliques des plantes comme la glycolyse, le cycle de Krebs ou la photosynthèse.

Ainsi, comme nous venons de la voir, les acides humiques entraînent des modifications métaboliques du végétal en réprimant certaines voies comme la néoglucogénèse, et en

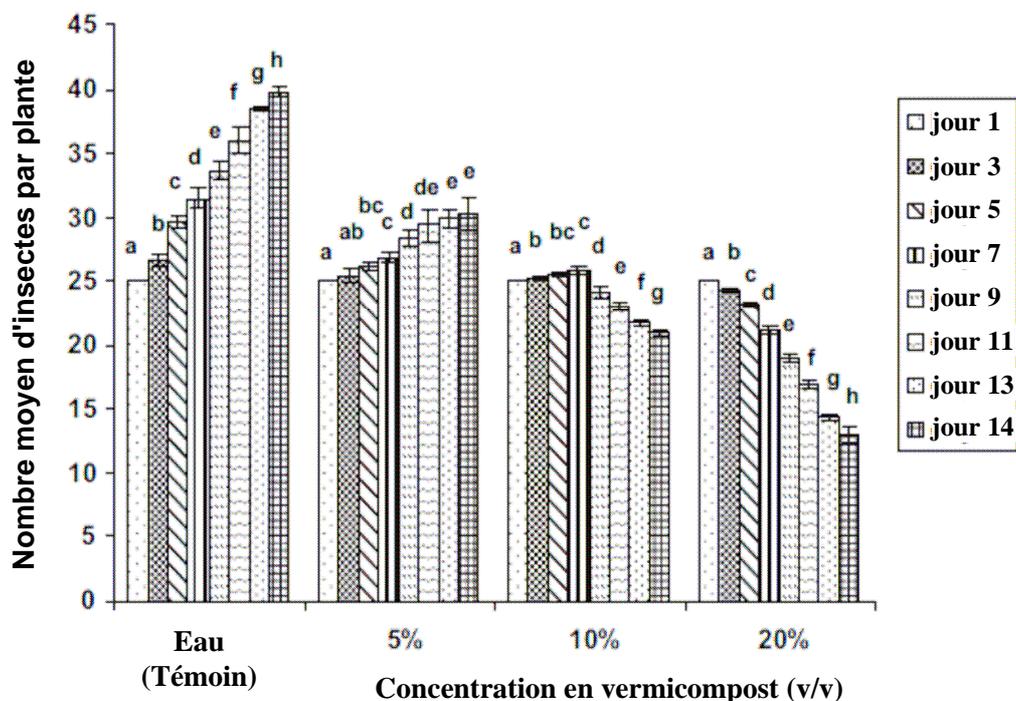


Figure I-21 : Effets d'un traitement par du vermicompost (acides humiques issus de fèces de vers de terre) sur le développement d'insectes (*Myzus persicae*) sur les plants de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Les plants de tomates sont cultivés pendant 4 semaines sur sol puis placés dans des cages en Plexiglas à raison de 4 plantes par cages. Le sol des pots est ensuite arrosé par de l'eau ou par une solution d'acide humique, puis 100 insectes sont lâchés dans chaque cage. Le nombre d'insectes par plante est ensuite mesuré entre 1 et 14 jours après le début du traitement. Les valeurs sont exprimées en nombre moyen d'insectes par plante au cours du temps en fonction de la concentration en acide humique appliquée. Pour un même traitement, les moyennes suivie d'une même lettre ne sont pas significativement différente à $p < 0,05$. (D'après Edwards *et al.*, 2010)

activant d'autres, comme le cycle de Krebs ou le métabolisme azoté. Pour la majorité des auteurs, ces régulations métaboliques en réponse aux extraits humiques seraient dues à des composés à activités hormone-like ou aux phytohormones contenues dans ces extraits. Dans ce sens, Muscolo *et al.* (1998, 1999, 2007b) démontrent la présence d'auxine dans des fractions d'acide humique présentant une forte activité biologique. Le mode d'extraction des acides humiques a également son importance. Ainsi, Nardi *et al.* (2002b, 2000a) étudient les effets physiologiques d'acides humiques extraits de manière traditionnelle (à l'eau ou à l'aide d'une solution de KOH), comparé à des acides humiques extraits à l'aide d'une solution d'exsudats racinaires de maïs. Les auteurs rapportent alors que les acides humiques extraits à l'aide d'exsudats racinaires présentent une activité biologique supérieure aux acides humiques extraits traditionnellement. Les auteurs proposent alors que cette activité accrue soit liée au fait que les acides humiques extraits par les exsudats racinaires présentent une plus forte concentration en phytohormones (Nardi *et al.*, 2000c) et une plus faible masse moléculaire (Nardi *et al.*, 2005). Toutes ces études soulignent donc les relations qui peuvent exister entre la structure de l'acide humique et son activité biologique, suggérant ainsi que les acides humiques de faible masse moléculaire seraient plus actifs sur les plantes.

III.2.4 Sur la résistance aux stress

Les acides humiques permettraient également de protéger la plante contre les stress biotiques et abiotiques. Edwards *et al.* (2010) montrent par exemple, pour des cultures de tomate (*Lycopersicon esculentum*) et de concombre (*Cucumis sativa*) dont le sol a été imbibé de solution d'acide humique (5, 10 et 20%, v/v), une suppression de l'établissement des parasites (*Myzus persicae*, *Pseudococcus citri*, *Tetranychus urticae*), une diminution de leur taux de reproduction et même une mortalité élevée lors des traitements avec les solutions les plus concentrées en acide humique (fig. I-21). Arancon *et al.* (2005) rapportent également une diminution de la population des insectes, associée à une diminution des dommages sur des plants de poivre lorsque ceux-ci sont traités par un extrait de vermicompost. Ces auteurs proposent différents mécanismes pour expliquer la diminution des effets néfastes des agents pathogènes. Une première hypothèse propose que cette diminution soit due à l'inappétence des plantes traitées liée aux phénols solubles présents dans les extraits. Ces phénols seraient absorbés par la plante et diminueraient ainsi sa digestibilité pour les insectes (Edwards *et al.*, 2010). Le second mécanisme, proposé par Arancon *et al.* (2005), repose sur la différence de nutrition entre les plantes traitées et non-traitées par le vermicompost. Ainsi, ils montrent que la substitution d'un engrais par le vermicompost diminue très fortement les attaques d'agents

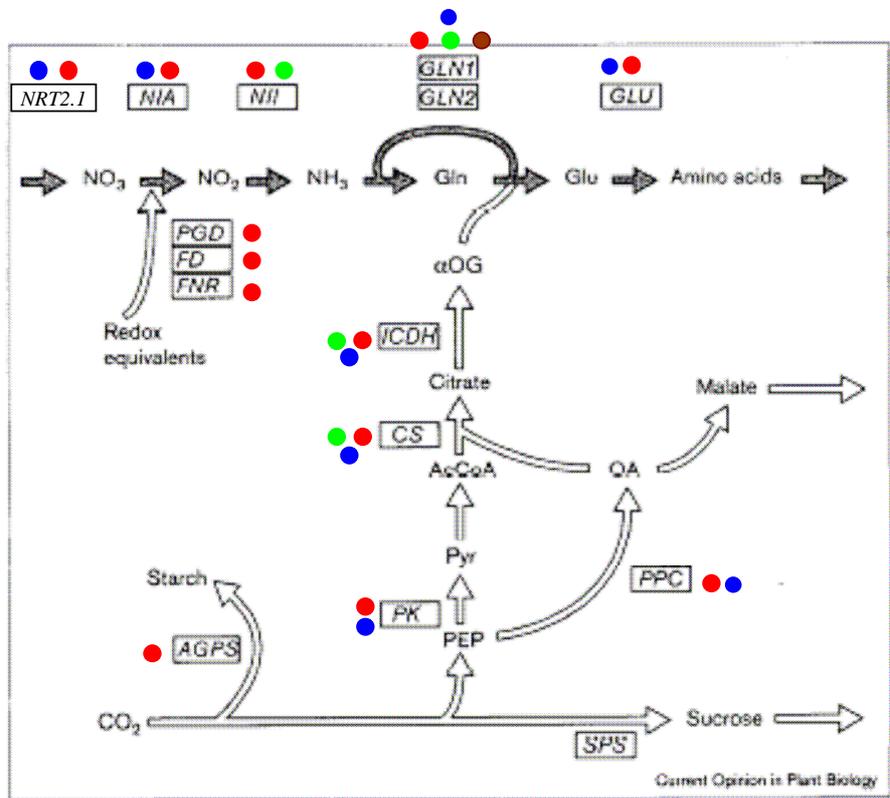
pathogènes. Le changement de disponibilité des nutriments ou le changement dans leur répartition dans le sol modifierait la morphologie de la plante de façon à la rendre plus résistante aux stress (Patriquin *et al.*, 1995). Selon les auteurs, cette dernière hypothèse permettrait également d'expliquer les effets bénéfiques des acides humiques concernant la résistance des plantes aux stress abiotiques.

En effet, plusieurs auteurs se sont intéressés à la résistance au stress salin induite par un traitement aux acides humiques. L'application d'acides humiques sur un sol contaminé par des eaux salées permet alors de limiter l'effet du stress. Dans ce contexte, Lakhdar *et al.* (2008) montrent un maintien de la croissance, de la teneur en chlorophylles et de la teneur en Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase (Rubisco) chez l'orge maritime stressé et traité par des acides humiques. De même, Liang *et al.* (2005) montrent que dans des sols soumis à salinisation, l'application d'acide humique permet d'augmenter les activités enzymatiques des uréases, phosphatases et deshydrogénases ainsi que la respiration au niveau de la rhizosphère. Selon ces auteurs, les effets bénéfiques des acides humiques sur le stress salin pourraient être dus aux nutriments qu'ils contiennent. En effet, l'enrichissement du sol en calcium et potassium suite à l'apport d'acides humiques permettrait de limiter l'absorption de sodium par les plantes, diminuant ainsi les effets délétères de celui-ci sur l'activité cellulaire. Ces effets sur les activités cellulaires sont également montrés par Gorova *et al.* (2005) qui mettent en évidence le maintien d'un cycle mitotique et d'une synthèse protéique normale chez des plantes traitées par un acide humique puis exposées à un stress abiotique (herbicide ou irradiation des graines). Ainsi, les acides humiques auraient la capacité de maintenir le métabolisme de la plante à un niveau normal malgré le stress (maintien de la synthèse protéique, maintien de l'absorption des nutriments). Par ailleurs, les acides humiques auraient une action anti-mutagène qui limiterait les modifications chromosomiques pouvant être induites par les herbicides ou les irradiations.

Les effets des acides humiques sur le sol et la plante sont donc assez bien décrits dans la littérature. Il existe cependant une différence entre les deux types d'acides humiques généralement utilisés dans ces études qui sont extraits soit de compost transformé par des lombrics, soit directement des sédiments comme la tourbe. En dépit de différences de composition et de doses utilisées, ces deux types d'acides humiques ont des effets bénéfiques sur les plantes relativement similaires (Aysuo *et al.*, 2006). Cependant, comme pour les extraits algaux, les mécanismes à l'origine de ces effets sont majoritairement supposés et

Tableau I-2 : Comparatif entre les principaux effets rapportés dans la littérature pour les extraits algaux et les acides humiques.

Effets physiologiques constatés	Mécanismes proposés et bibliographie associée	
	extraits algaux	acides humiques
Effets bénéfiques sur les propriétés du sol	/	Propriétés de chélation des ions et des métaux (Piccolo <i>et al.</i> , 1997 ; Esparza <i>et al.</i> , 2004 ; Cookson <i>et al.</i> , 2005 ; Imbufe <i>et al.</i> , 2005 ; Abiven <i>et al.</i> , 2008 ; Arançon <i>et al.</i> , 2006 ; Garcia-Mina, 2006 ; Puglisi <i>et al.</i> , 2009)
Accélération du cycle de développement	Action hormone-like (Sivasankari <i>et al.</i> , 2009 ; Roussos <i>et al.</i> , 2009 ; Rathore <i>et al.</i> , 2009)	Action hormone-like (Eyheraguibel <i>et al.</i> , 2008)
Augmentation de la biomasse de la plante liée à la modification de l'architecture racinaire	Action hormone-like (Mengout, 2006 ; Sivasankari <i>et al.</i> , 2006 ; Rayorath <i>et al.</i> , 2008 ; Mugnai <i>et al.</i> , 2008 ; Spinelli <i>et al.</i> , 2010)	Action hormone-like (Ayuso <i>et al.</i> , 1996 ; Atyeh <i>et al.</i> , 2002 ; Schmidt <i>et al.</i> , 2007 ; Mora <i>et al.</i> , 2010)
Augmentation de la teneur des feuilles en chlorophylles	Protection contre la dégradation (Mancuso <i>et al.</i> , 2006 ; Spinelli <i>et al.</i> , 2010)	Protection contre la dégradation (Tejada & Gonzalez, 2004)
Activation de l'absorption des nutriments	Apport de nutriments par l'extrait (Mancuso <i>et al.</i> , 2006 ; Rathore <i>et al.</i> , 2009)	Action hormone-like, implication des pompes H ⁺ /ATPase, propriétés de chélation des ions et métaux (Dell'Agnola & Nardi, 1987 ; Ayuso <i>et al.</i> , 1996 ; Pinton <i>et al.</i> , 1999 ; Nardi <i>et al.</i> , 2000 ; Cesco <i>et al.</i> , 2002 ; Keeling <i>et al.</i> , 2003 ; Quaggiotti <i>et al.</i> , 2004 ; Garcia-Mina <i>et al.</i> , 2004 ; Eyheraguibel <i>et al.</i> , 2008)
Activation du métabolisme global	Action hormone-like (Durand <i>et al.</i> , 2003 ; Mengout, 2006)	Action hormone-like (Nardi <i>et al.</i> , 2000b, 2002a, 2007 ; Muscolo <i>et al.</i> , 1999, 2007 ; Carletti <i>et al.</i> , 2008 ; Trevisan <i>et al.</i> , 2011)
Résistance aux stress abiotiques	Protection par les bêtaïnes (Mancuso <i>et al.</i> , 2006 ; Rayirath <i>et al.</i> , 2009 ; Khan <i>et al.</i> , 2009)	Apport de nutriments par l'extrait (contre-ions) (Gorova <i>et al.</i> , 2005 ; Liang <i>et al.</i> , 2005 ; Lakhdar <i>et al.</i> , 2008)
Résistance aux stress biotiques	Protection par les bêtaïnes et inappétence des métaux chélatés (Mercier <i>et al.</i> , 2001 ; Chuzet <i>et al.</i> , 2004 ; Jayaraj <i>et al.</i> , 2008 ; Subramanian <i>et al.</i> , 2011)	Inappétence des phénols solubles (Arançon <i>et al.</i> , 2005 ; Edwards <i>et al.</i> , 2010)
Induction de la synthèse de protéines PR	Les alginates miment les oligosaccharides panétaux (Mercier <i>et al.</i> , 2001 ; Chuzet <i>et al.</i> , 2004)	/



- | | | | | |
|---|------|---------------------------------|--------|---------------------------------|
| ● Régulation positive par le nitrate | AGPS | ADP-glucose pyrophosphorylase | NIA | Nitrate réductase |
| ● Régulation positive par un extrait d' <i>Ulva ssp</i> | CS | Citrate synthase | NII | Nitrite réductase |
| ● Régulation positive par un extrait de Laminaria | FD | ferrédoxine | NRT2.1 | Transporteur de nitrate |
| ● Régulation positive par les acides humiques | FNR | Ferrédoxine NADP oxydoreductase | PGD | Phosphogluconate deshydrogenase |
| | GLN1 | glutamine synthétase | PK | pyruvate kinase |
| | GLN2 | Glutamine synthétase | PPC | phosphoenolpyruvatecarboxylase |
| | GLU | GOGAT | SPS | Sucrose P synthase |
| | ICDH | NAPS isocitrate déshydrogènes | | |

Figure I-22 : Effets du nitrate, d'un apport d'extraits d'algues ou d'acides humiques sur le métabolisme azoté des végétaux. Le nitrate active l'expression de tous les gènes codant les enzymes intervenant dans son propre métabolisme. Les extraits d'algues et les acides humiques miment cette activation pour une partie des gènes. (D'après Muscolo *et al.*, 1996; Stütt, 1999; Cluzet *et al.*, 2004; Mérigout, 2006; Nardi *et al.*, 2007).

rarement démontrés. Néanmoins, des solutions d'acides humiques sont déjà vendues dans le commerce comme activateur de croissance, autant pour les particuliers que pour les agriculteurs. Comme pour les extraits algaux, ces produits sont le plus souvent estampillés «utilisable en agriculture biologique». On voit alors que malgré les différences qui peuvent exister entre les extraits algaux et humiques, ils entraînent chez les plantes des effets similaires pouvant être mis en parallèle.

III.3 Parallèles entre les extraits algaux et les acides humiques

Les extraits algaux et les acides humiques présentent des effets similaires sur les plantes. Les auteurs rapportent à chaque fois des augmentations de croissance, principalement dues à l'augmentation de la biomasse racinaire, des activations du métabolisme et des protections contre le stress (tableau I-2). On peut, par exemple, citer le métabolisme azoté, processus essentiel pour les plantes et donc largement étudié, pour lequel il est possible de retrouver les mêmes gènes activés en réponse à un acide humique, à un extrait d'algue brune ou verte et au nitrate. La figure I-22 montre ainsi qu'il existe un certain nombre d'analogies portant sur les gènes impliqués dans le métabolisme azoté et dont l'expression est induite à la fois par le nitrate et les extraits algaux ou humiques, que ce soit pour l'absorption du nitrate (NRT2 .1) ou son assimilation (Nii, Nia, GLN1 et 2), comme c'est aussi le cas pour les gènes codant des enzymes assurant la dégradation du pyruvate. Cependant, pour certains extraits notamment les extraits algaux (Durand *et al.*, 2003), les auteurs précisent que la quantité de nitrate contenue dans l'extrait n'est pas suffisante pour expliquer à elle seule les réponses observées lors de l'application de l'extrait sur la plante. Par ailleurs, pour les extraits algaux, la protection des plantes contre le stress est beaucoup plus détaillée dans la littérature. Cela résulte probablement d'un effet spécifique des extraits algaux qui n'est pas retrouvé chez les acides humiques tel que l'induction des protéines PR (Cluzet *et al.*, 2004). De même, pour les acides humiques, les effets sur le sol sont beaucoup plus étudiés que pour les extraits algaux.

On peut alors se demander comment ces deux extraits, en apparence si différents peuvent donner des effets très proches sur la physiologie du végétal. La réponse se trouve peut-être dans les modes d'action proposés. Pour la plupart des auteurs, les effets bénéfiques des extraits algaux et humiques sont majoritairement médiés par les phytohormones qu'ils contiennent. La plupart des extraits présentés, qu'ils soient issus d'algues ou d'acides humiques, possèdent une action hormone-like (induction d'une synthèse de phytohormone *de*

novo dans la plante) ou contiennent des phytohormones telles que l’auxine ou les cytokinines principalement. Les effets de ces deux hormones sur les plantes sont déjà bien décrits dans la littérature. Ainsi, les cytokinines seraient impliquées dans la division cellulaire, l’émergence et la croissance des tiges, le retard de la sénescence, l’accumulation de pigment et le développement et la division des plastes (pour revue, Heyl *et al.*, 2011). L’auxine, quant à elle, serait impliquée dans la division et la différenciation cellulaire, le contrôle de la dominance apicale, les réponses trophiques et, plus en rapport avec nos extraits, la formation et le développement des racines. Dans ce sens, Pilet *et al.* (1979) et Evans *et al.* (1980) rapportent que les faibles concentrations en IAA augmentent l’elongation racinaire alors que les fortes concentrations auraient plutôt un effet inhibiteur. Cet effet inhibiteur des fortes concentrations en auxine est bien connu puisqu’il sert de base pour la composition de certains herbicides (Kelley & Riechers, 2007). Ces herbicides possèdent un cycle aromatique proche de celui de l’auxine et peuvent donc se fixer sur les récepteurs auxiniques de la plante pour, à faible dose, mimer les effets des hormones endogènes et, à forte dose, induire des malformations chez les dicotylédones. L’effet des phytohormones passe donc par l’interaction entre la phytohormone et son récepteur dans la plante. Cependant, selon différents auteurs, les récepteurs des phytohormones dans la plante restent encore en majorité à identifier. De l’identification de ces récepteurs dépend l’identification des cibles réelles des phytohormones dans les plantes et peut-être une meilleure appréhension des effets des extraits algaux et humiques sur la physiologie de la plante.

Par ailleurs, les extraits algaux et les acides humiques possèdent plusieurs cibles dans la plante et les études réalisées jusqu’à présent ne permettent pas à ce jour d’en faire une liste exhaustive. Les études les plus avancées sont celles réalisées en réponse à des acides humiques par Carletti *et al.* (2008) et Trevisan *et al.* (2011) sur les modifications de l’expression de certains gènes ou de certaines protéines. Néanmoins, il s’agit à chaque fois de données parcellaires sur un ou deux points de cinétique, sur une centaine de gènes/protéines cibles choisis *a priori*. Il est donc difficile de tirer des conclusions générales sur les cibles métaboliques de ces extraits dans la plante. A notre connaissance, il n’existe pas d’études plus globales sur des effets des extraits algaux sur les modifications transcriptomiques et protéomiques chez les plantes.

IV. Hypothèses et objectifs de recherche

L'utilisation d'extrait algaux et d'acides humiques en substitution, ou plus raisonnablement en complément, des fertilisants de synthèse actuellement utilisés pourrait contribuer à réduire la consommation de fertilisants en permettant aux plantes d'être plus efficaces dans le prélèvement des nutriments. Cette augmentation du prélèvement et l'amélioration de la structure des sols réduirait également les pollutions des eaux par la diminution du lessivage du nitrate. Cependant, les études menées jusqu'à présent sur les acides humiques et les extraits algaux laissent de nombreuses questions sans réponse, notamment sur les modalités d'actions de ces extraits sur les plantes.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet AZOSTIMER qui a notamment pour but de développer des stratégies pour gagner des points d'efficacité nutritionnelle chez les plantes de grande culture tout en protégeant l'environnement. Il s'intéresse donc naturellement aux potentialités des molécules biologiques comme les extraits algaux et les acides humiques. Ce travail de thèse est alors basé sur deux hypothèses de travail principales :

Hypothèse 1 : L'activité des extraits algaux et des acides humiques peut être potentialisée par des modifications chimiques ou des nouveaux procédés d'extraction.

Les effets des extraits algaux sont majoritairement dus, comme nous venons de le voir, aux molécules qui les composent : phytohormones, bêtaïnes, nutriments... On peut alors supposer que le procédé de fabrication des extraits à partir des algues fraîches a un impact non négligeable sur les effets de ces extraits sur la plante. De même, l'activité biologique des acides humiques peut être liée non seulement aux phytohormones et aux nutriments qu'ils contiennent mais également à leurs propriétés chélatrices. Ces propriétés améliorent non seulement la mise à disposition pour la plante des métaux et des nutriments dans le sol, mais serait également à l'origine d'une meilleure stabilisation des sols. Dans la mesure où la capacité de chélation est étroitement liée aux fonctions chimiques présentes sur les molécules d'acides humiques, il peut être supposé qu'une augmentation du nombre de ces fonctions pourrait se traduire par une augmentation des capacités chélatrices de l'acide humique et de ce fait à une augmentation son activité biologique.

Afin de vérifier cette hypothèse de travail, nos partenaires industriels (CIPAV Pampelune et BiotechMarine, groupe Roullier) nous ont fourni 5 extraits algaux et 10 extraits humiques. Les 5 extraits algaux proviennent de mélanges de deux algues : *Ascophyllum*

nodosum et *Fucus serratus*. Le but étant de sélectionner la meilleure espèce d'algue en identifiant le(s) extrait(s) ayant un impact positif sur la croissance et la nutrition minérale du colza. Concernant les acides humiques, il s'agissait de comparer des molécules natives à des molécules modifiées chimiquement. Nous avons donc testé 3 acides humiques natifs, un extrait de léonardite (roche riche en substances humiques provenant de la République Tchèque), un extrait de tourbe (matériaux produit à partir de la fossilisation de débris végétaux provenant de Galice en Espagne) et un extrait phénolique de Quebracho (extrait de l'écorce riche en tannin d'un arbre de la famille des mimosas). Les 7 autres acides humiques AH1 à AH7 résultent, pour AH1 à AH3 de l'oxydation de la tourbe par le quebracho et pour AH4 à AH7 de l'oxydation de la léonardite par le quebracho.

Ces 15 extraits sont testés pour leurs effets sur le colza en suivant des paramètres physiologiques définis à partir de la littérature et communs à tous les extraits tels que l'augmentation de croissance, l'augmentation de la teneur en chlorophylles et l'augmentation de l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA). Cette étape de criblage offrant l'opportunité de comparer tous les extraits sur une même base de conditions de culture et de paramètres mesurés, il sera alors possible (i) d'évaluer l'effet du procédé d'extraction ou de la modification chimique sur l'activité biologique de la molécule mais également (ii) de comparer les effets d'un extrait algal et d'un acide humique sur une même plante : le colza. Ce dernier point permettra de réaliser une étude comparative des effets des deux types d'extraits sur la croissance et la nutrition minérale du colza, comparatif qui extrêmement difficile à évaluer à partir de la littérature puisqu'en règle générale ces deux types d'extraits sont étudiés séparément sur des plantes différentes et par des équipes différentes. Consécutivement, tout extrait algal ou humique ayant un effet bénéfique sur tout ou partie des paramètres définis précédemment (augmentation de la biomasse, de la teneur en chlorophylles et de l'EUA) sera retenu, et donnera lieu à un ensemble d'expérimentations visant à mieux appréhender les voies métaboliques régulées *in planta* par cet extrait.

Cette première approche de criblage constituera le premier chapitre de résultat qui suivra une présentation des matériels et méthodes utilisés.

Hypothèse 2 : Les extraits algaux et les acides humiques induisent, *in planta*, des modifications métaboliques à l'origine d'une meilleure croissance du végétal.

Ces modifications métaboliques ont été montrées en partie dans la littérature pour les acides humiques. Cependant, il s’agit toujours d’études à petite échelle sur quelques gènes cibles choisis dans les métabolismes d’intérêt. Carletti *et al.* (2008) et Trevisan *et al.* (2011) ont réalisé des études un peu plus complètes sur le métabolisme du maïs en réponse aux acides humiques. Mais il s’agit à chaque fois de descriptions de résultats non confirmés par des études physiologiques plus poussées. Par ailleurs, à notre connaissance, ce genre d’étude n’a jamais été réalisé pour les extraits algaux.

Afin de déterminer, de la manière la plus précise possible, les modifications métaboliques régulées dans la plante par les extraits ainsi que leurs principales cibles moléculaires, nous avons combiné une analyse transcriptomique à grande échelle à des analyses physiologiques telles que des analyses enzymatiques, des analyses de contenu des plantes en nutriments et des observations en microscopie. Pour cela, une puce ADN spécifique du colza et récemment disponible sera utilisée. Cette approche transcriptomique comparative (entre les plantes traitées avec l’extrait algal ou humique et les plantes témoin), permettra d’identifier les gènes dont l’expression est modulée par l’apport d’extrait et ainsi de cibler les voies métaboliques pouvant être à l’origine de l’augmentation de croissance observée au niveau physiologique. Selon les voies concernées, des analyses physiologiques plus poussées seront menées afin de confirmer que l’activation ou la répression observée au niveau génétique se retrouve bien au niveau physiologique. Pour ces études, seuls les extraits sélectionnés à l’issue de l’étape de criblage seront utilisés. Les objectifs et les résultats afférents à cette seconde hypothèse de travail feront l’objet du deuxième chapitre de résultat. A l’issue de ce dernier une conclusion générale de ce travail de recherche sera présentée et la discussion des résultats permettra de dégager des perspectives de recherche.

Globalement, l’ensemble de ce travail a fait l’objet des manuscrits de publications suivants :

- Laëtitia Jannin, Mustapha Arkoun, Philippe Etienne, Philippe Laîné, Didier Goux, Maria Garnica, Marta Fuentes, Sara San Francisco, Roberto Baigorri, Florence Cruz, Fabrice Houdusse, José-Maria Garcia-Mina, Jean-Claude Yvin, Alain Ourry. *Brassica napus* growth is promoted by *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. seaweed extract: Microarray

analysis and physiological characterization of N, C and S metabolisms. SOUMIS A JOURNAL OF PLANT GROWTH REGULATION.

- Laëtitia Jannin, Mustapha Arkoun, Alain Ourry, Philippe Laîné, Didier Goux, Maria Garnica, Marta Fuentes, Sara San Francisco, Roberto Baigorri, Florence Cruz, Fabrice Houdusse, José-Maria Garcia-Mina, Jean-Claude Yvin, Philippe Etienne. Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: Involvement of N, C and S metabolisms. SOUMIS A PLANT AND SOIL.

Par ailleurs, dans le cadre de mon activité doctorale, j'ai été associée en tant qu'auteur au manuscrit de publication suivant :

- Mustapha Arkoun, Laëtitia Jannin, Philippe Laîné, Philippe Etienne, Céline Masclaux-Daubresse, Maria Garnica, José-Maria Garcia-Mina, Jean-Claude Yvin, Alain Ourry. A physiological and molecular study of the effects of nickel deficiency and Phenylphosphorodiamidate (PPD) application on urea metabolism in oilseed rape (*Brassica napus* L.). EN RÉVISION POUR PLANT AND SOIL.

J'ai également, dans le cadre de colloques, présenté les posters suivants :

- Laëtitia Jannin, Maria Garnica, Sara San Francisco, Roberto Baigorri, Marta Fuentes, José-Maria Garcia-Mina, Philippe Laîné, Philippe Etienne, Alain Ourry, Jean-Claude Yvin. Relationship between physico-chemical properties of two humic acids and their effects on growth of rapeseed and wheat. 15th World Fertilizer Congress of the International Scientific Center for fertilizers (CIEC): Meeting the fertilizer demand on a changing globe. Bucarest, Roumanie, 29 août – 2 septembre 2010.
- Laëtitia Jannin, Maria Garnica, Sara San Francisco, Roberto Baigorri, Marta Fuentes, José-Maria Garcia-Mina, Philippe Laîné, Philippe Etienne, Alain Ourry, Jean-Claude Yvin. Effects of two humics acids on growth of winter of winter oilseed rape (*Brassica napus*) and wheat (*Triticum aestivum*). 13th International Rapeseed Congress. Prague, République Tchèque, 05-09 juin 2011.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

L'ensemble des protocoles retenus a été discuté avec les partenaires du projet AZOSTIMER afin d'aboutir à des démarches communes pour les travaux portant sur le colza (UMR INRA-UCBN 950 EVA, travaux présentés dans cette thèse) et sur le blé (CIPAV Pampelune). Afin d'éviter les redondances, seuls seront détaillés dans cette partie les méthodes et matériels qui n'ont pas déjà été décrits dans les publications incluses dans ce manuscrit de thèse.

I. Matériel végétal et conditions de culture

Toutes les cultures sont conduites en conditions contrôlées en serre. La thermopériode est de 20°C/17°C jour/nuit avec une photopériode de 16h. La lumière naturelle est complétée avec des lampes sodium haute pression (Philips, MASTER Green Power T400W) délivrant un PAR (Photosynthetically Active Radiation) d'environ 280 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ à la surface de la canopée des plantes.

I.1 Le colza d'hiver

La variété de colza d'hiver (*Brassica napus* L.) utilisée pour les différentes expérimentations est la variété Capitot. Ce colza est une lignée pure connue comme étant précoce à la reprise de végétation (février) et mi-tardive à la floraison et à maturité. Les rendements sont en général de l'ordre de 30 quintaux par hectare (CETIOM). Le choix du modèle d'étude s'est porté sur la variété Capitot en raison des nombreuses études réalisées par l'équipe INFlux de l'UMR INRA-UCBN 950 EVA sur cette variété, que ce soit sur ses capacités d'absorption ou sur ses processus d'allocation et de remobilisation de l'azote (Rossato *et al.*, 2001 ; Noquet *et al.*, 2004 ; Malagoli *et al.*, 2005a,b ; Desclos *et al.*, 2008, 2009) et du soufre (Abdallah *et al.*, 2011 ; Dubousset *et al.*, 2009) en conditions de plein champ, en serre ou en phytotron.

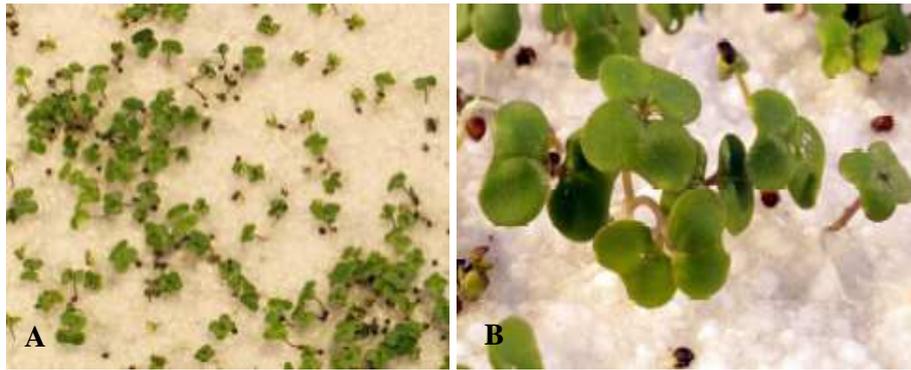


Figure II-1 : La germination des graines de colza (*Brassica napus* var. *Capitol*). **A** : Les graines de colza sont stérilisées puis mises à germer à l'obscurité pendant 48h sur de la perlite. **B** : Les plantules sont ensuite mises à la lumière ambiante pendant 1 semaine puis repiquées sur les bacs de culture hydroponique (cf. fig. II-2).

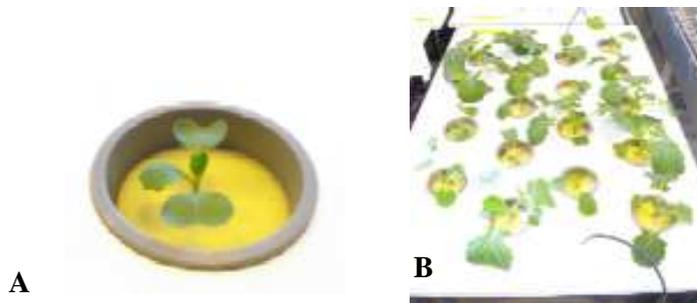


Figure II-2 : Dispositif de culture hydroponique en serre. **A** : L'hypocotyle des plantules de colza est inséré dans un cylindre de mousse inséré dans un manchon en plastique. **B** : chaque manchon est disposé sur des plaques (18 plantes par plaque) de façon à ce que seule la racine plonge dans la solution nutritive (20 L). Des tuyaux en plastiques, plongés dans la solution, assurent un bullage d'air comprimé permettant l'oxygénation des racines.



Figure II-3 : Dispositif de culture sur sol en serre. Les plantules de colzas sont repiquées à raison de 1 plante par pot dans 2 kg de substrat composé soit de 2/3 de sol et 1/3 de sable, soit de 1/2 sol et 1/2 perlite. Une solution nutritive de type Hoagland sans azote est apportée par arrosage automatique à raison de 30 ml par jour afin de compléter la fertilisation azotée marquée apportée en début et au milieu de culture ($K^{15}NO_3$) de façon à éviter toute carence minérale au cours de la culture.

I.2 Germination des graines

Pour toutes nos cultures, les graines de colza sont tamisées puis stérilisées à l'éthanol (80%) pendant 30 s puis à l'hypochlorite de sodium (5% de chlore) pendant 10 min. Après 10 lavages à l'eau distillée, les graines peuvent être semées ou mises à germer. Pour les cultures en hydroponie, les graines de colza sont mises à germer sur perlite pendant 48h à l'obscurité puis les plantules sont placées une semaine à lumière ambiante (fig. II-1). Pour les cultures sur sol, les graines sont semées sur un mélange constitué de 2/3 de terreau et 1/3 de perlite puis laissées en culture sur le terreau pendant deux semaines avant le repiquage sur sol. Quel que soit le type de culture, les plantules obtenues sont repiquées juste après l'émergence de la première feuille.

I.3 La culture en hydroponie

Les plantules sont repiquées sur des bacs d'hydroponie contenant 20 L de solution nutritive Hoagland (fig. II-2) ayant la composition suivante : KNO_3 1mM ; CaCl_2 1,25 mM ; KCl 250 mM ; KH_2PO_4 0,25 mM ; MgSO_4 0,5 mM ; EDTA-2NaFe 0,2 mM ; H_3BO_3 14 μM ; MnSO_4 5 μM ; ZnSO_4 3 μM ; CuSO_4 0,7 μM ; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0,7 μM ; CoCl_2 0,1 μM . Cette solution nutritive est renouvelée tous les deux jours afin de prévenir une éventuelle carence en nutriments. Des contrôles de sa concentration, en particulier en nitrate, sont également réalisés afin de s'assurer que la baisse des concentrations est au maximum de 50% entre deux changements de solution.

L'homogénéité des plantes est contrôlée par un comptage journalier du nombre de feuilles par plante.

I.4 La culture sur sol

Les plantules sont repiquées à raison d'une plante par pot. Les plantes sont ensuite arrosées avec une solution nutritive Hoagland diluée, possédant une composition semblable à celle décrite au § I.3 sans azote (celui-ci sera apporté par la fertilisation marquée), pendant toute la durée de la culture (30 mL par jour) pour d'éviter les carences minérales (fig. II-3). Afin de cerner les conditions optimales pour obtenir les meilleurs effets des extraits sur les plantes, plusieurs conditions de cultures ont été testées.

Tableau II-1 : Caractéristiques principales des sols utilisés pour les cultures en serre. Seules les valeurs de pH, texture, teneur en matière organique et en chaux sont montrées dans ce tableau. Les analyses ont été réalisées par le laboratoire LANO (Laboratoire Agronomique Normand, Saint-Lô, France)

Caractéristiques	sol alcalin	sol acide
- pH	8,2	5,5
- Texture	Limoneuse	Limoneux-argilo-sableux
- Teneur en matière organique (en g / kg)	21	31
- Chaux (en g / kg)	6,06 (élevé)	1,48 (insuffisant)

Deux sols, distingués par leurs pH respectifs : alcalin et acide (Tableau II-1) ont été utilisés. Pour chaque type de sol, deux types de préparations sont réalisés afin de les alléger : un mélange sol-sable (2/3-1/3 (v/v)) ou sol-perlite (1/2-1/2 (v/v)). Enfin, une fertilisation azotée est apportée à raison de 150 kg N/ha (apportée en deux fois 75 kg N/ha, juste après le repiquage puis au bout de 2 semaines de culture). Cette fertilisation est composée de nitrate de potassium marqué au ^{15}N (K^{15}NO_3) avec un excès isotopique d'environ 2%.

Dans tous les cas, les pots sont remplis avec 2 kg de substrat (sol+perlite ou sol+sable).

II. Origine des extraits et traitement des plantes

II.1 Origine des extraits

Les extraits algaux, fournis par la société Biotechmarine (Pontrieux, France), sont des extraits aqueux d'algues brunes des genres *Ascophyllum nodosum* et *Fucus serratus*. Les algues fraîches ont été récoltées sur l'archipel de Bréhat en octobre 2008. Elles sont ensuite lavées, broyées puis mises dans de l'eau. Cette solution est acidifiée par de l'acide sulfurique à 95% jusqu'à atteindre un pH de 3. Le mélange est alors homogénéisé jusqu'à micro-rupture des cellules algales puis centrifugé et filtré. La solution finale est alors concentrée selon la méthode décrite par Briand (1998). La quantité de substances actives présentes dans l'extrait varie selon les saisons et les conditions environnementales. C'est pour cette raison que les extraits ainsi obtenus sont finement caractérisés, notamment pour leur contenu en phytohormones (pour la méthode détaillée, cf. Article 1). Ces extractions sont réalisées par la société BiotechMarine, Groupe Roullier (Pontrieux, France). Cinq extraits nommés AZAL1 à AZAL5 ont été testés lors du criblage.

Les extraits humiques, fournis par le CIPAV, groupe Roullier (Pampelune, Espagne) sont extraits selon le protocole indiqué par la International Humic Substances Society (IHSS, Swift 1996) et décrit par Aguirre *et al.* (2009). Brièvement, 100g d'acides humiques bruts sont mixés avec 1,5 L de NaOH à 0,1M. Après 48h d'agitation à 25°C à l'obscurité, le surnageant contenant l'extrait humique (non fractionné) est séparé de la fraction solide par centrifugation à 7650g pendant 30 min. L'acide humique est ensuite obtenu par précipitation en acidification un aliquote de l'extrait alcalin par ajout d'acide chlorhydrique (HCl) 6M jusqu'à atteindre un pH de 1,5. Après 12h d'incubation, l'extrait acide est centrifugé à 7650g pendant 30 min pour séparer l'acide humique (ayant précipité) du surnageant contenant les

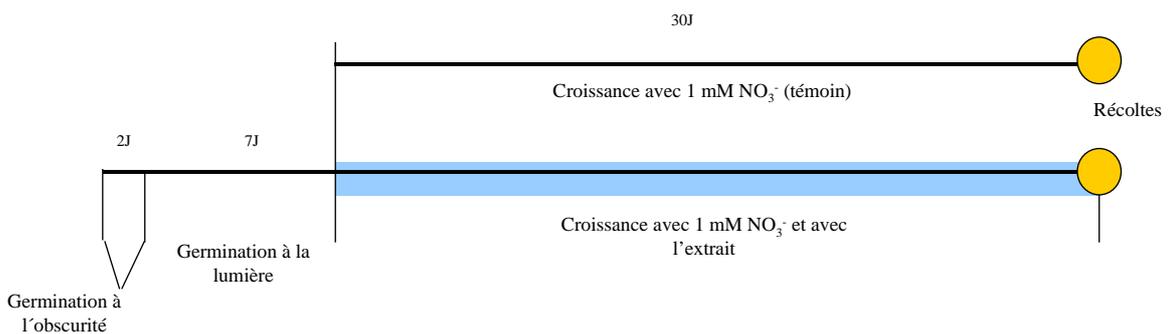


Figure II-4 : Protocole utilisé pour le criblage des extraits d'intérêt. Toutes les graines de colza sont stérilisées et mises à germer en même temps. Les plantules sont ensuite séparées en deux lots au moment du repiquage. Le premier lot est mis en culture sur de la solution nutritive Hoagland à 1 mM de nitrate. Le second lot, matérialisé ici par le rectangle bleu, est mis en culture sur la même solution nutritive que précédemment additionnée de l'extrait à tester. Les différents extraits testés lors du criblage des extraits d'intérêt sont :

- l'extrait algal AZAL1 à 0,2; 0,3; 0,4 ou 0,5% (v/v)
- les extraits algaux AZAL2, 3, 4 et 5 à 0,1% (v/v)
- les acides humiques natifs Tourbe, léonardite et Quebracho à 10 et 100 mg de carbone organique.L⁻¹
- les acides humiques modifiés AH1 à AH7 à 10 et 100 mg de carbone organique.L⁻¹

Les récoltes sont réalisées 30 jours après le repiquage.

acides fulviques. Après lavage pour éliminer la contamination aux ions chlorures, l'acide humique est alors lyophilisé. Après lyophilisation, la poudre d'acide humique est reprise dans de l'eau milli-Q afin d'obtenir des extraits liquides. Ce procédé d'extraction a été mis en place par le CIPAV, groupe Roullier (Pampelune, Espagne).

Dix acides humiques ont été testés lors du criblage. Il s'agit de trois acides humiques natifs non modifiés et de sept extraits humiques modifiés. Les trois acides humiques non modifiés correspondent à un extrait de tourbe de Galice (Espagne), un extrait de léonardite de République Tchèque et un extrait phénolique issu de Quebracho (*Aspidosperma quebracho-blanco*). Les sept extraits humiques modifiés sont des produits d'oxydation de la tourbe par le Quebracho (AH1 à AH3) ou de la léonardite par le Quebracho (AH4 à AH7).

II.2 Mode d'apport des extraits et traitement des plantes

II.2.1 Modalité d'apport des extraits en condition de cultures hydroponiques

II.2.1.a Criblage des extraits d'intérêt

Les extraits d'algues ou d'acides humiques sont ajoutés dans la solution nutritive selon les recommandations respectivement de Biotechmarine et du CIPAV. Le protocole expérimental est précisé au sein de la figure II.4. Brièvement les plantes sont cultivées pendant 30 jours en l'absence (témoin) ou en présence de l'extrait algal ou humique. Les concentrations utilisées sont de 0,1% (v/v) pour les extraits algaux et de 10 et 100 mg.L⁻¹ de carbone organique pour les acides humiques. Les extraits sont ajoutés à la solution nutritive à chaque changement de solutions (tous les 2 jours), évitant ainsi des éventuels changements de concentration ou dégradation des molécules au cours des 4 semaines de cultures des plantes (fig. II-4). Au cours de ces 4 semaines de culture, les paramètres de teneur en chlorophylles, d'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA) et de croissance du végétal sont mesurés et comparés à des cultures de colzas témoin non traités (cf. paragraphe §III). Après analyse de ces résultats, seuls les extraits et les concentrations d'extraits ayant donné des valeurs significativement supérieures au témoin pour les paramètres mesurés seront retenus pour les analyses ultérieures. Ces cultures constituent donc un criblage des extraits d'intérêt.

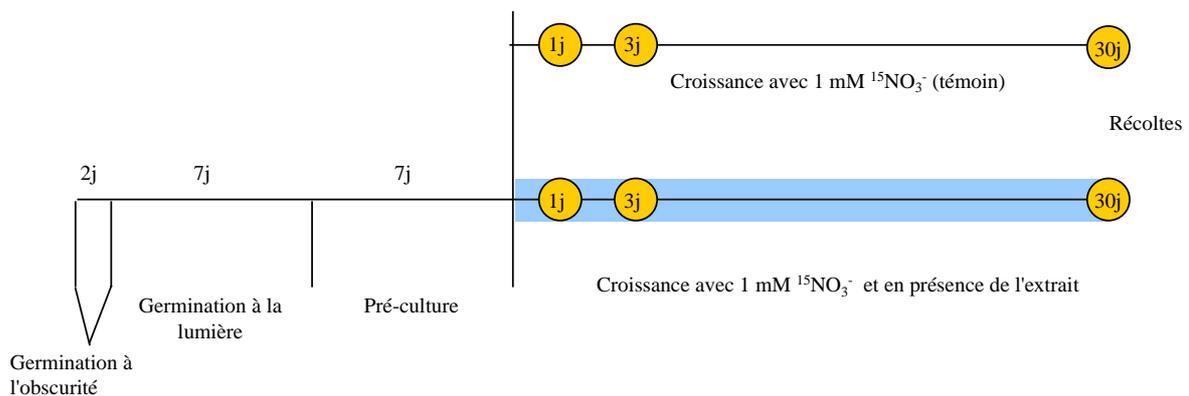


Figure II-5 : Protocole utilisé pour les cultures préalables aux analyses biochimiques et transcriptomiques. Toutes les graines de colza sont stérilisées et mises à germer en même temps. Les plantules sont ensuite toutes repiquées sur de la solution nutritive Hoagland à 1 mM de nitrate puis laissées en culture pendant 1 semaine. A l'issue de cette pré-culture, les plantes sont séparées en deux lots. Le premier lot est mis en culture sur de la solution nutritive Hoagland à 1 mM de nitrate. Le second lot, matérialisé ici par le rectangle bleu, est mis en culture sur la même solution nutritive que précédemment additionnée de l'extrait à tester. Il s'agit dans ce cas de l'extrait algal AZAL5 à 0,1% (v/v) ou de l'acide humique modifié AH7 à 100 mg de C.L⁻¹. Les récoltes sont alors effectuées 1, 3 et 30 jours après la séparation des plantes en deux lots.

II.2.1.b Cultures préparatoires aux analyses biochimiques et transcriptomiques

A l'issue des cultures de criblage, les extraits et les concentrations donnant les meilleurs effets ont été sélectionnés. Des cultures ont été relancées afin de confirmer les résultats obtenus précédemment (cultures de criblage). Elles seront ensuite utilisées pour les analyses biochimiques et transcriptomiques. Ainsi, les plantes sont mises en culture sur de la solution nutritive Hoagland contenant 1 mM de nitrate pendant 1 semaine puis divisée en deux lots selon le protocole décrit à la figure II-5 : le premier lot sur de la solution Hoagland seule (témoin), le second sur de la Hoagland additionnée de l'extrait d'intérêt (extraits identifiés l'issue de l'étape de criblage et utilisés aux concentrations indiquées ci-dessus). De même que pour le criblage, les extraits sont apportés à chaque changement de solution nutritive. Les récoltes sont alors effectuées après 1 jour, 3 jours et 30 jours de contact avec les extraits. A chaque date de récolte, les paramètres physiologiques de la plante décrits précédemment sont mesurés (cf. paragraphe §III). Un marquage isotopique reposant sur un apport de $K^{15}NO_3$ (Excès isotopique (Ei) = 2%) est apporté en continu et à chaque changement de solution nutritive afin d'estimer précisément l'absorption du nitrate.

II.2.2 Modalité d'apport des extraits en condition de cultures sur sol

Les extraits d'intérêt sont apportés en application liquide sur le sol, en une seule fois juste après le repiquage des plantules. Pour l'extrait algal, deux concentrations ont été testées : 2 et 4 ml d'extrait / kg de substrat. Pour les acides humiques, trois concentrations ont été testées : 200, 400 et 600 mg de Carbone organique / kg de substrat.

III. Mesure des paramètres physiologiques de la plante

III.1 Détermination des teneurs foliaires en chlorophylles

III.1.1 Le SPAD

Pendant les cultures, la teneur en chlorophylles est mesurée 1 jour et 3 jours après l'application de l'extrait puis une fois par semaine jusqu'à la récolte. La teneur relative en chlorophylles est estimée par une méthode non destructive : la mesure SPAD (Soil Plant Analysis Development, Minolta, SPAD-502 model, Tokyo, Japon). A chaque temps de

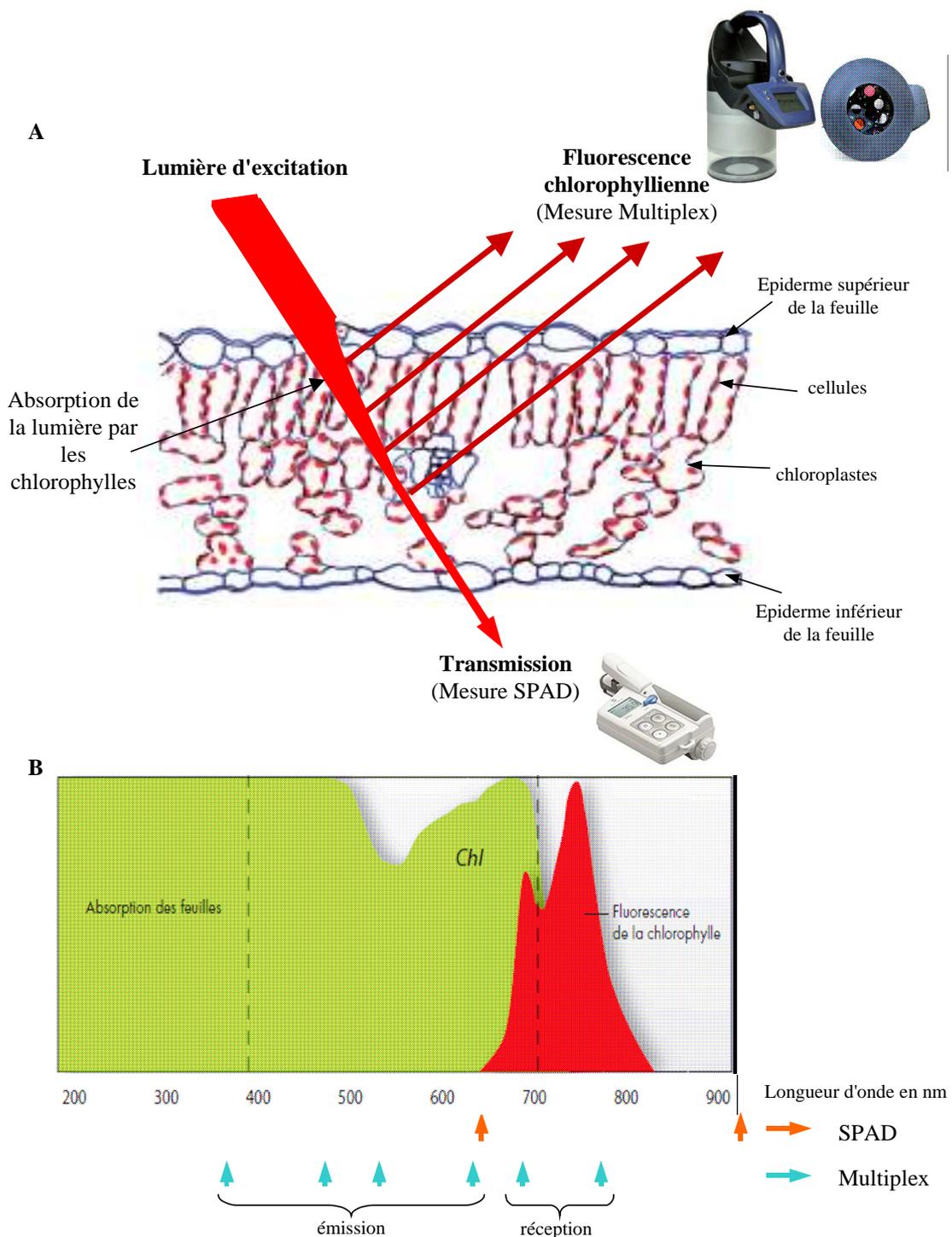


Figure II-6 : Principes de fonctionnement des deux outils utilisés dans la thèse pour la mesure de la teneur en chlorophylles des échantillons, le SPAD et le Multiplex. **A.** Les deux appareils éclairent l'échantillon avec une lumière d'une longueur d'onde précise puis le SPAD mesure la lumière transmise par l'échantillon alors que le Multiplex mesure la fluorescence de l'échantillon. Les longueurs d'onde d'émission et de réception sont donc différentes pour les deux appareils. **B.** Pour mesurer la lumière transmise, le SPAD émet et reçoit dans les mêmes longueurs d'ondes. Afin de séparer l'absorption des chlorophylles de celle des autres composés, il réalise une mesure à 650 nm (pic d'absorption des chlorophylles) et une à 940 nm (longueur d'onde que les chlorophylles n'absorbent pas). Le Multiplex émet de la lumière dans 4 longueurs d'onde différentes et reçoit aux deux pics de fluorescence des chlorophylles (680 et 750 nm).

cinétique, 10 mesures par feuille sont réalisées et ce sur 5 feuilles de chaque réplicat. Les valeurs indiquées sont une moyenne calculée à partir des moyennes obtenues pour chaque feuille (valeurs des 10 mesures) \pm l'erreur standard.

La valeur mesurée par le SPAD est corrélée à la quantité de chlorophylles présentes dans la plante. Elle est déterminée à partir de la quantité de lumière transmise par la feuille dans deux longueurs d'ondes pour lesquelles l'absorbance de la chlorophylle est différente : 650 nm (zone rouge, pour laquelle l'absorbance est forte mais n'est pas affectée par les carotènes) et 940 nm (zone infrarouge, pour laquelle l'absorbance des chlorophylles est très faible) (fig. II-6). En principe l'échantillon de feuille est éclairé par le dessus par des LED émettant dans le rouge et l'infrarouge. La lumière traverse l'échantillon végétal puis est mesurée par un récepteur au-dessous de l'échantillon végétal. Le récepteur transforme alors la lumière en signal électrique qui est utilisé par l'appareil pour calculer la valeur SPAD de l'échantillon.

III.1.2 Le capteur sans contact Multiplex

Le capteur sans contact «Multiplex», fourni par la société FORCE-A (Orsay, France), permet de déterminer simultanément les teneurs foliaires en chlorophylles, flavonoides et anthocyanes. Ce capteur permet également le calcul d'un ratio chlorophylles/flavonoides, appelé le «Nitrogen Balance Index» (NBI) dont la valeur est proportionnelle à la quantité d'azote contenue dans la plante. Ces mesures non destructives sont réalisées en fin de culture sur les rangs foliaires photosynthétiques les plus développés (les feuilles les plus jeunes sont trop étroites pour la mesure, pour le témoin les premiers rangs foliaires ont chuté au moment de la récolte). Les valeurs indiquées sont une moyenne calculée à partir des valeurs obtenues pour chaque feuille de la plante \pm l'erreur standard.

Contrairement au SPAD, la fenêtre de mesure du Multiplex est un cercle de 6 cm de diamètre. Il est donc possible de ne réaliser qu'une mesure par feuille. De même, la mesure Multiplex est basée non plus sur la transmission de la lumière par l'échantillon végétal mais sur la fluorescence de l'échantillon (fig. II-6). Pour mesurer la teneur en chlorophylles de l'échantillon, le Multiplex se base sur le ratio de la fluorescence chlorophyllienne mesurée dans l'infrarouge (750 nm) sur la fluorescence chlorophyllienne mesurée dans le rouge (680 nm) quelle que soit l'excitation dans le visible : UV (380 nm), bleu (480 nm), vert (520 nm) et

rouge (620 nm). En raison du chevauchement des spectres d'absorption et l'émission de fluorescence (fig. II-6), la réabsorption se produit aux longueurs d'onde les plus courtes (rouge) mais pas aux plus élevées (infrarouge).

III.2 Mesure de l'activité photosynthétique nette

La mesure de l'activité photosynthétique est réalisée 1 jour et 3 jours après l'application de l'extrait puis une fois par semaine jusqu'à la récolte. L'activité photosynthétique est mesurée sur les feuilles par un analyseur de CO₂ couplé à une chambre de mesure (LI-6400, LICOR, Lincoln, Nebraska, Etats-Unis) à 23°C sous concentration atmosphérique ambiante en CO₂ (375 à 400 ppm). La mesure s'effectue à 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR afin de se situer dans des conditions de luminosité non limitantes. A chaque temps de cinétique, 10 mesures par feuille sont réalisées et ce sur 5 feuilles de chaque réplicat. Les valeurs indiquées sont une moyenne calculée à partir des moyennes obtenues pour chaque feuille (valeurs des 10 mesures) \pm l'erreur standard.

III.3 Détermination des biomasses foliaires, racinaires et totales

A chaque date de récolte et pour chaque traitement, 10 plantes sont prélevées (1 plante = 1 répétition biologique). Les parties aériennes (feuilles et tiges) et racinaires de chaque plante sont séparées, pesées (biomasse fraîche) puis séparées en deux lots. Le premier est étuvé à 60°C pendant 48h. Les biomasses sèches sont alors déterminées par pesée. Des aliquotes de matière sèche sont finement broyées au broyeur à billes avant analyses isotopiques du ratio ¹⁵N/¹⁴N par IRMS, du contenu en nitrate et sulfate par chromatographie ionique Dionex et de la teneur en soufre par ICP-OES (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectroscopy). Le second lot est immédiatement plongé dans l'azote liquide puis conservé à – 80°C pour les futures extractions d'ARN.

IV. Analyses biochimiques

IV.1 Dosage des minéraux et des ions

IV.1.1 Détermination des teneurs en N total et ¹⁵N

IV.1.1.a Préparation des échantillons et mesures IRMS

Un aliquote de chaque organe (feuille ou racine) réduit en poudre fine est placé dans une capsule de façon à analyser entre 60 et 80 µg d'azote. L'azote total et l'excès isotopique en ¹⁵N sont analysés à l'aide d'un spectromètre de masse isotopique en flux continu, IRMS (Isoprime, GV Instrument, Manchester, Royaume Uni) couplé à un analyseur élémentaire C/N/S (EA3000, Euro Vector, Milan, Italie).

L'azote total (N_{tot}) contenu dans un tissu (i) à un temps donné (t) est calculé selon la formule (1) :

$$\mathbf{N_{tot,i,t} = \frac{\% N_{i,t} \times MS_{i,t}}{100}}$$

où %N_{i,t} est le pourcentage d'azote contenu dans le tissu i au temps t et MS_{i,t} est la biomasse sèche du tissu i au temps t.

L'abondance naturelle en ¹⁵N du N₂ atmosphérique (0,36636±0,0004%) est utilisée comme référence pour l'analyse du ¹⁵N dans les échantillons. L'excès isotopique (E_i) de l'échantillon est la différence entre l'abondance isotopique de l'échantillon (A_i) et l'abondance de référence. Par conséquent (2) :

$$\mathbf{E_i = A_i - 0,3663}$$

IV.1.1.b Quantité d'azote issu de l'absorption et détermination de la vitesse d'absorption du nitrate

La quantité d'azote provenant de l'absorption (N_{abs}) dans un tissu i à un temps donné t est calculé grâce à l'analyse du ¹⁵N contenu dans les tissus selon la formule (3) :

$$\mathbf{N_{abs,i,t} = \frac{N_{tot,i,t} \times E_{i,t}}{E_s}}$$

Où E_{i,t} est l'excès isotopique du tissu i au temps t et E_s est l'excès isotopique de la solution nutritive (ici 3%).

La vitesse d'absorption du nitrate est calculée en ramenant cette quantité d'azote absorbé par unité de masse (du végétal) et de temps.

IV.1.1.c Calcul de l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA)

L'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA) est définie, au stade étudié (rosette), par la quantité de biomasse produite par la plante par gramme d'azote présent dans la plante (N_{tot}),

qui correspond également à la quantité d'azote absorbé au cours des 30 jours. Par conséquent (4) :

$$\text{EUA} = \text{MS} / \text{N}_{\text{tot}}$$

L'EUA calculée ici correspond donc à l'inverse de la teneur en azote des échantillons.

IV.1.2 Détermination des teneurs en soufre

La détermination du contenu des échantillons en soufre est réalisée à l'aide d'un ICP-OES (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectroscopy, Thermo Elemental Co. Iris Intrepid II XDL). Elle est précédée d'une digestion des échantillons par micro-onde en milieu acide (8 mL de HNO₃ concentré et 2 mL de H₂O₂ pour 0,5g de matière sèche). Ces analyses ont été réalisées par le CIPAV, groupe Roullier (Pampelune, Espagne).

IV.1.3 Dosages du nitrate et du sulfate

Le nitrate et le sulfate sont extraits comme décrit précédemment (Abdallah *et al.* 2011) à partir de 30 mg de matière sèche (feuille ou racine) dans 1,5 ml d'une solution d'éthanol 50% à 40°C pendant 1h. Après centrifugation (20 min, 10000 g), le surnageant (appelé S1) est récupéré et 1,5 ml d'éthanol est ajouté au culot. Après incubation (1 h, 40°C) et centrifugation (20 min, 10000 g), le surnageant est récupéré et ajouté au précédent (S1). Toutes ces opérations (incubation and centrifugation) sont répétées deux fois avec 1,5 ml d'eau ultra-pure et des incubations de 1h à 95°C. Tous les surnageants sont finalement regroupés et concentrés sous vide pendant 16 h à température ambiante (Concentrator Evaporator RC 10.22 Jouan, Saint Herblain, France). Les résidus secs obtenus et contenant le nitrate et le sulfate sont solubilisés dans 1 ml d'eau ultra-pure. La concentration en nitrate et sulfate de chaque tissu est déterminée par chromatographie ionique (HPLC, ACS3000, Dionex corp. Sunnyvale, CA, Etats-Unis). La solution d'élution, composée de 1,8 mM Na₂CO₃ et 1,7 mM Na₂HCO₃, est pompée de façon isocratique à travers une colonne de garde AS17.

V. Exploitation statistique des données

Pour les mesures de croissance, d'absorption du nitrate ainsi que les dosages SPAD et IRMS, les expérimentations sont réalisées avec 10 répétitions. Pour les dosages ICP et DIONEX, 6 répétitions ont été utilisées.

Toutes les données sont analysées avec le test de Student et le taux de significativité est en général indiqué par des astérisques lorsqu'elles sont significativement différentes par rapport au témoin (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ et *** : $p < 0.001$).

Des méthodes statistiques plus spécifiques ont été utilisées et sont décrites plus précisément dans les paragraphes « matériels et méthodes » des publications insérées dans ce manuscrit de thèse.

Chapitre III

*Effets des extraits algaux et
des acides humiques sur la croissance,
la teneur en chlorophylles et l'efficacité
d'utilisation de l'azote par le colza*

CHAPITRE III

EFFETS DES EXTRAITS ALGAUX ET DES ACIDES HUMIQUES SUR LA CROISSANCE, LA TENEUR EN CHLOROPHYLLES ET L'EFFICIENCE D'UTILISATION DE L'AZOTE.

Afin de vérifier si les espèces d'algues utilisées (extraits algaux) ou la modification chimique de la molécule biologique (acides humiques) pouvait avoir un impact bénéfique sur la croissance et la nutrition azotée du colza, une procédure de criblage des extraits a été mise en place. Compte tenu du nombre assez important d'extraits à tester (15 extraits), un choix de conditions de culture permettant de maximiser l'effet des extraits et d'un ensemble de traits physiologiques simples à mesurer devait être fait. Ainsi, les jeunes plantules de colza ont été cultivées en conditions hydroponiques en présence (ou non, plantes témoins) de la molécule à tester pendant une durée de 30 jours, selon les conditions décrites dans le chapitre «Matériel et Méthodes», paragraphe II. Au terme des 30 jours de contact avec la molécule, la production de biomasses foliaire et racinaire, la teneur foliaire en chlorophylles ainsi que le dosage du contenu en azote des tissus végétaux ont été réalisés. Cette dernière analyse permet de mieux appréhender l'effet de la molécule sur l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA), définie au cours de cette étude comme la quantité de Matière Sèche (MS) produite par gramme d'azote absorbé (qui correspond également à l'inverse de la teneur en azote de la MS à l'échelle de la plante entière) au cours des 30 jours de développement végétatif du colza. Au terme de ce criblage, un extrait ayant tout ou partie de ces paramètres significativement supérieurs aux plantes témoin sera considéré comme un extrait d'intérêt et fera l'objet d'une caractérisation physiologique plus fine *via* des approches Microarray et d'analyses transcriptomiques ciblées.

I. Criblage des 5 extraits algaux et des 10 acides humiques en conditions optimales de croissance

Cinq extraits algaux (nommés AZAL1 à AZAL5), 3 acides humiques natifs (Tourbe, Léonardite et Quebracho, nommés respectivement Trb, Lrtd et Qbc) et 7 acides humiques modifiés (nommés AH1 à AH7) ont été testés en hydroponie dans les conditions décrites dans

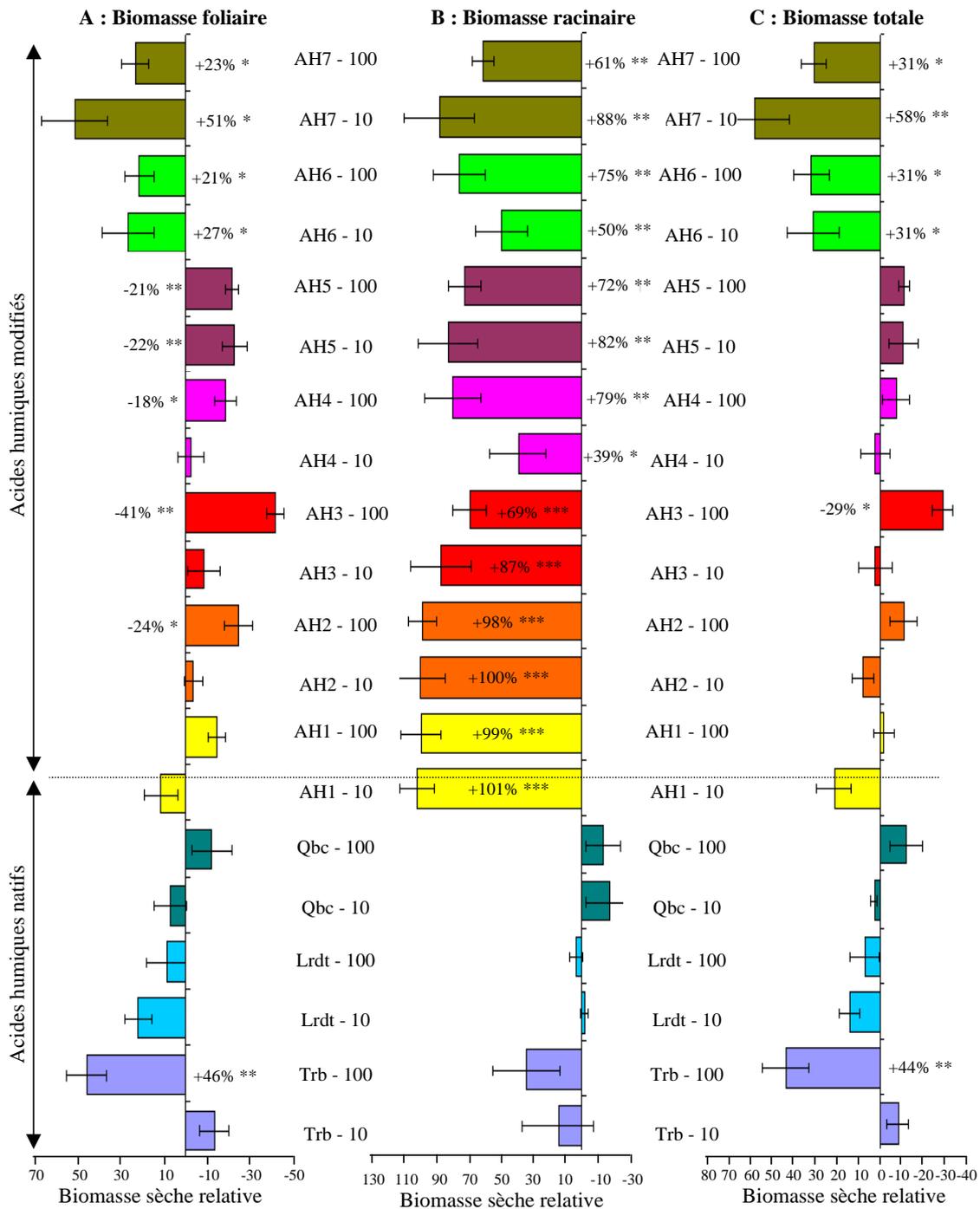


Figure III-1 : Evolution des biomasses sèches foliaires (A), racinaires (B) et totales (C) de colzas cultivés pendant 30 jours en présence d'acides humiques natifs ou modifiés. Les biomasses sont exprimées relativement et en pourcentage de celle du témoin (T) dont la valeur relative est égale à 0 dans ce cas. La valeur absolue de la biomasse des colzas témoin pour les cultures considérées est de 3.38 ± 0.23 g pour la biomasse foliaire, 0.92 ± 0.29 g pour la biomasse racinaire et de 4.29 ± 0.51 g pour la biomasse totale. Pour chaque acide humique, deux concentrations sont représentées : 10 et 100 mg de carbone organique par litre de solution nutritive. Trb (Tourbe), Lrdt (Léonardite) et Qbc (Quebracho) représentent les 3 acides humiques natifs. AH1 à AH7 sont les 7 acides humiques modifiés. AH1 à AH3 sont issus de l'oxydation de la Tourbe par l'extrait phénolique de Quebracho, AH5 à AH7 sont issus de l'oxydation de la Léonardite par l'extrait phénolique de Quebracho. Les barres horizontales représentent l'erreur standard de la moyenne pour $n=10$. Les étoiles indiquent un effet significatif par rapport au témoin pour une probabilité $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.001$ (***).

le chapitre «Matériel et Méthode», paragraphe II. Pour mémoire, les acides humiques modifié AH1 à 3 sont issus de la tourbe oxydée par l'extrait phénolique de quebracho et les acides humiques modifiés AH4 à 7 sont issus de la léonardite oxydée par l'extrait de quebracho. Quant aux extraits algaux (AZAL1 à AZAL5), ils correspondent à des extraits d'*Ascophyllum nodosum* et *Fucus serratus*.

I.1 Sur la production de biomasse du colza

I.1.1 Acides humiques natifs et modifiés

Les biomasses totales, racinaires et aériennes des plants de colza ont été mesurées après 30 jours de contact avec l'extrait (apporté dans la solution nutritive selon 2 doses : 10 et 100 mg de carbone organique.L⁻¹) et comparées aux biomasses des plantes témoins (cultivées sans apport de molécule). L'ensemble des résultats obtenus est présenté au sein de la figure III-1, les biomasses étant exprimées de façon relative en pourcentage des valeurs mesurées pour les plantes témoin. Concernant les acides humiques natifs, la léonardite, quelle que soit la dose apportée (10 ou 100 mg de carbone.L⁻¹), ne modifie pas significativement la production de biomasse foliaire ou racinaire (Fig. III-1). Par ailleurs, les plants de colza traités avec la dose la plus forte d'acide humique quebracho (100 mg de C.L⁻¹) présentent des biomasses totales, racinaires et foliaires inférieures aux plantes témoins. Toutefois, l'absence de significativité des résultats ne permet pas de conclure à un éventuel effet délétère de cet extrait sur la croissance du colza. Parmi les extraits natifs testés, comparé aux colzas témoin non traités, seule la tourbe à 100 mgC.L⁻¹ entraîne une augmentation significative des biomasses totales (+44%, Fig. III-1C) et foliaires (+47%, Fig. III-1A) des colzas traités mais n'affecte pas de manière significative la biomasse racinaire (Fig. III-1B). Ces résultats obtenus en réponse aux acides humiques natifs, montrent que ces extraits n'ont que peu d'effet sur la croissance du colza (avec pour exception la tourbe à 100 mg de C.L⁻¹) et justifie l'intérêt de tester l'effet de nouveaux acides humiques modifiés (AH1 à AH7).

Concernant les acides humiques modifiés (AH1 à AH7), les résultats obtenus montrent que, quelle que soit la dose utilisée (10 ou 100 mg C.L⁻¹), une augmentation de biomasse racinaire du colza est observée après 30 jours de contact avec ces extraits (Fig. III-1B). A titre d'exemple, comparativement aux plantes témoin, l'augmentation de biomasse racinaire la plus faible est observée pour l'acide humique modifié AH4 à la dose de 10 mgC.L⁻¹ (+39%) et la plus forte en réponse à l'acide humique AH1 utilisé à la dose de 10 mg.C.L⁻¹ (+101%). Il

est toutefois intéressant de noter que l'effet sur la biomasse racinaire n'est pas systématiquement proportionnel à la dose d'extrait utilisée. En effet, une augmentation racinaire de 88% est observée en réponse à un traitement avec l'acide humique AH7 utilisé à la dose de 10 mgC.L⁻¹ alors que cette augmentation n'est que de 61 % en réponse à ce même acide humique utilisé à la dose de 100 mgC.L⁻¹. Par ailleurs, cette augmentation n'est pas aussi générale au niveau de la biomasse foliaire (fig. III-1A), pour laquelle la majorité des acides humiques modifiés (AH1 à AH5) présentent un effet délétère (jusqu'à -41% de biomasse foliaire comparé au témoin pour AH3 à 100 mgC.L⁻¹). Seuls les acides humiques modifiés AH6 et AH7 présentent un effet significativement positif sur la croissance des parties aériennes et ce, quelle que soit la dose utilisée (entre +21% pour AH6 à 100 mgC.L⁻¹ et + 51% pour AH7 10 mgC.L⁻¹, fig. III-1A). Ces résultats ont des conséquences directes sur l'évolution de la biomasse totale des plantes en réponse aux différents extraits. En effet, compte tenu que la biomasse foliaire du colza est plus importante que la biomasse racinaire, seuls les extraits AH6 et AH7 (qui ont un effet positif sur la production de biomasse foliaire) augmentent significativement la biomasse totale et ce, quelle que soit la dose appliquée (entre +31% et +58%, fig. III-1C). *A contrario*, les extraits qui affectent seulement la biomasse racinaire (*i.e.* les extraits AH1 à AH5) n'entraînent aucune modification significative de la biomasse totale à l'exception de AH3 à une dose de 100 mgC.L⁻¹ qui présente un effet négatif avec une réduction de la biomasse totale de -29% (fig. III-1C), comparativement au plantes témoin non traitées.

A l'issue de cette première étape de criblage, basée essentiellement sur la production de biomasse après 30 jours de contact avec les acides humiques, on observe que la modification chimique des acides humiques change le profil de réponse des colzas par rapport aux acides humiques natifs que sont la tourbe, le quebracho et la léonardite. Ainsi, à partir d'acides humiques natifs ne présentant pas d'effets significatifs sur la biomasse du colza (en particulier la léonardite et le quebracho) ou au mieux un effet sur la biomasse foliaire (tourbe), on obtient en majorité des acides humiques modifiés présentant un fort effet sur la biomasse racinaire et peu ou pas d'effet sur la biomasse foliaire (AH1 à AH5). Ainsi, parmi les 7 acides humiques modifiés, seuls deux (AH6 et AH7) induisent une stimulation de la croissance racinaire et foliaire. Comparativement à des colzas non traités, il est à noter que l'activation de croissance la plus importante (+51 % de biomasse foliaire, + 88% de biomasse racinaire et + 58% de biomasse totale) est observée en réponse à l'extrait AH7 utilisé à une dose de 10 mgC.L⁻¹ (Fig. III-1).

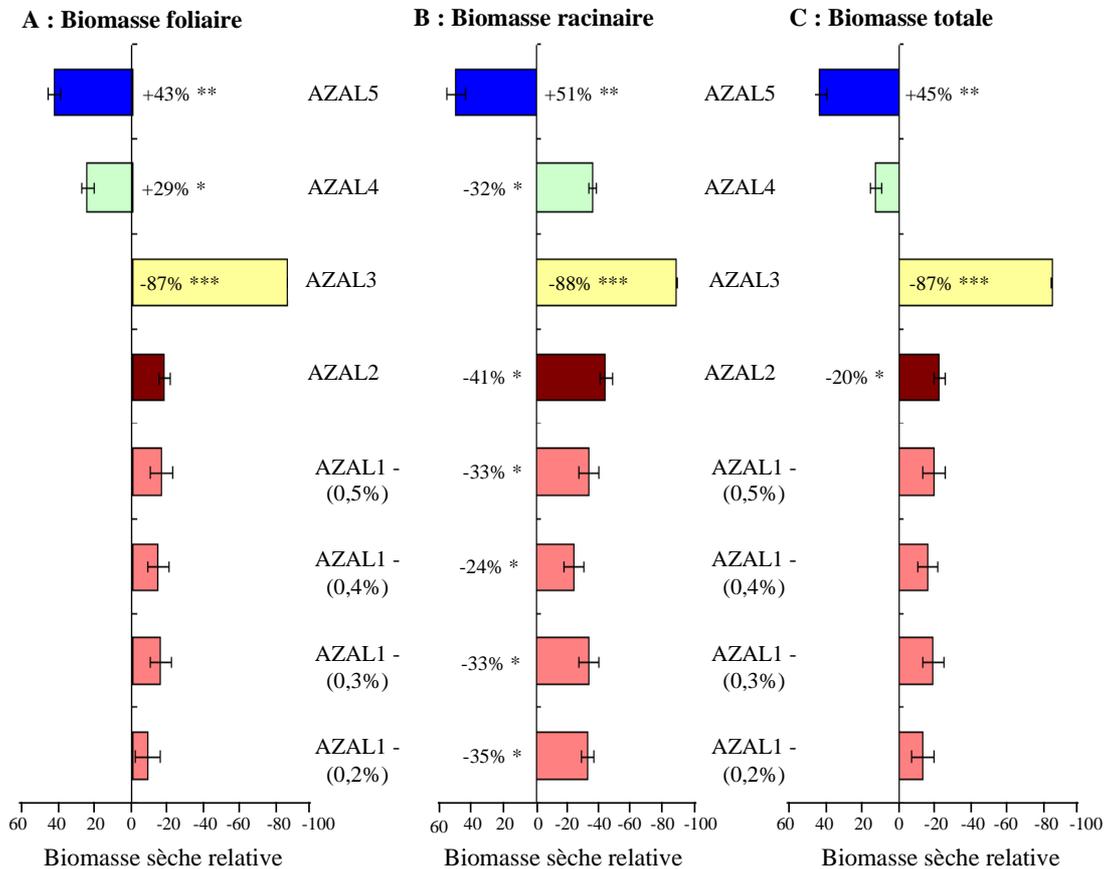


Figure III-2 : Evolution des biomasses sèches foliaires (A), racinaires (B) et totales (C) de colzas cultivés pendant 30 jours en présence d'extrait algal. Les biomasses sont exprimées relativement et en pourcentage de celle du témoin (T) dont la valeur relative est égale à 0 dans ce cas. La valeur absolue de la biomasse des colzas témoin pour les cultures considérées est de 3.21 ± 0.05 g pour la biomasse foliaire, 0.71 ± 0.06 g pour la biomasse racinaire et de 3.92 ± 0.12 g pour la biomasse totale. Pour l'extrait algal AZAL1, quatre concentrations ont été testées : 0,2 ; 0,3 ; 0,4 et 0,5 % (v/v). Pour les extraits AZAL2 à 5, une seule concentration est utilisée : 0,1 % (v/v). Les barres horizontales représentent l'erreur standard de la moyenne pour n=10. Les étoiles indiquent un effet significatif par rapport au témoin pour une probabilité $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.001$ (***)

1.1.2 Extraits algaux

La figure III-2 présente les effets des extraits algaux sur l'évolution des biomasses racinaires, foliaires et totales des plants de colza traités comparativement aux plantes témoins. Ainsi, en réponse à un traitement par ces extraits algaux, on observe une tendance générale allant dans le sens d'une diminution de biomasse racinaire et foliaire qui affecte pour certains extrait la biomasse totale de la plante. L'extrait AZAL3 (utilisé à une dose de 0,1% v/v) présente l'effet le plus marqué avec une diminution hautement significative ($p < 0,001$) des biomasses foliaires (-87%), racinaires (-88%) et totales (-80%) par rapport aux colzas témoin non traités (fig. III-2). En ce qui concerne l'extrait AZAL1, la même tendance est observée avec cependant des diminutions de biomasse racinaire (fig. III-2B) plus faibles (de l'ordre -20 à -30 %) et des productions de biomasses foliaires et totales non significativement différentes des plantes témoin (bien qu'une tendance à la diminution de ces deux paramètres soit observable respectivement fig. III-2A et C). Par ailleurs, il est intéressant de noter que cet extrait à été apporté selon plusieurs doses (0,2 à 0,5 % v/v). Cependant, les résultats présentés fig. III-2 montrent que la réponse de la plante à l'extrait AZAL1 n'est pas dépendante de la dose utilisée et sont observables dès la dose la plus faible (0,2 % v/v). Sur les recommandations de Biotechmarine qui nous a fourni les extraits, seuls AZAL1 a été testé à plusieurs dose. Pour les autres extraits AZAL2 à 5, une seule dose était préconisée : 0,1 % v/v.

Comparativement aux plantes témoin, les extraits AZAL2 et 4 entraînent une diminution significative de la biomasse racinaire respectivement de -41% et -32% (fig. III-2B). Au niveau de la biomasse foliaire, les effets de ces deux extraits sont contrastés, puisque comparativement aux plantes témoins, l'extrait AZAL2 n'entraîne aucune modification de biomasse foliaire alors que l'extrait AZAL4 entraîne une augmentation significative de la biomasse foliaire de 29% (fig. III-2A). En conséquence, en réponse au traitement par l'extrait AZAL2, on observe respectivement soit une diminution de la biomasse totale des plantes (-20% en réponse à AZAL2 par rapport aux plantes témoins), soit une absence d'effet (AZAL4, fig. III-2C) . Le criblage des extraits AZAL1 à 4 a donc permis de montrer que tous ces extraits avaient des effets délétères sur la production de biomasse racinaire et des effets plus ou moins contrastés sur la production de biomasse foliaire. Quoi qu'il en soit, aucune augmentation significative de biomasse totale des plantes n'a pu être mise en évidence en réponse à ces 4 extraits.

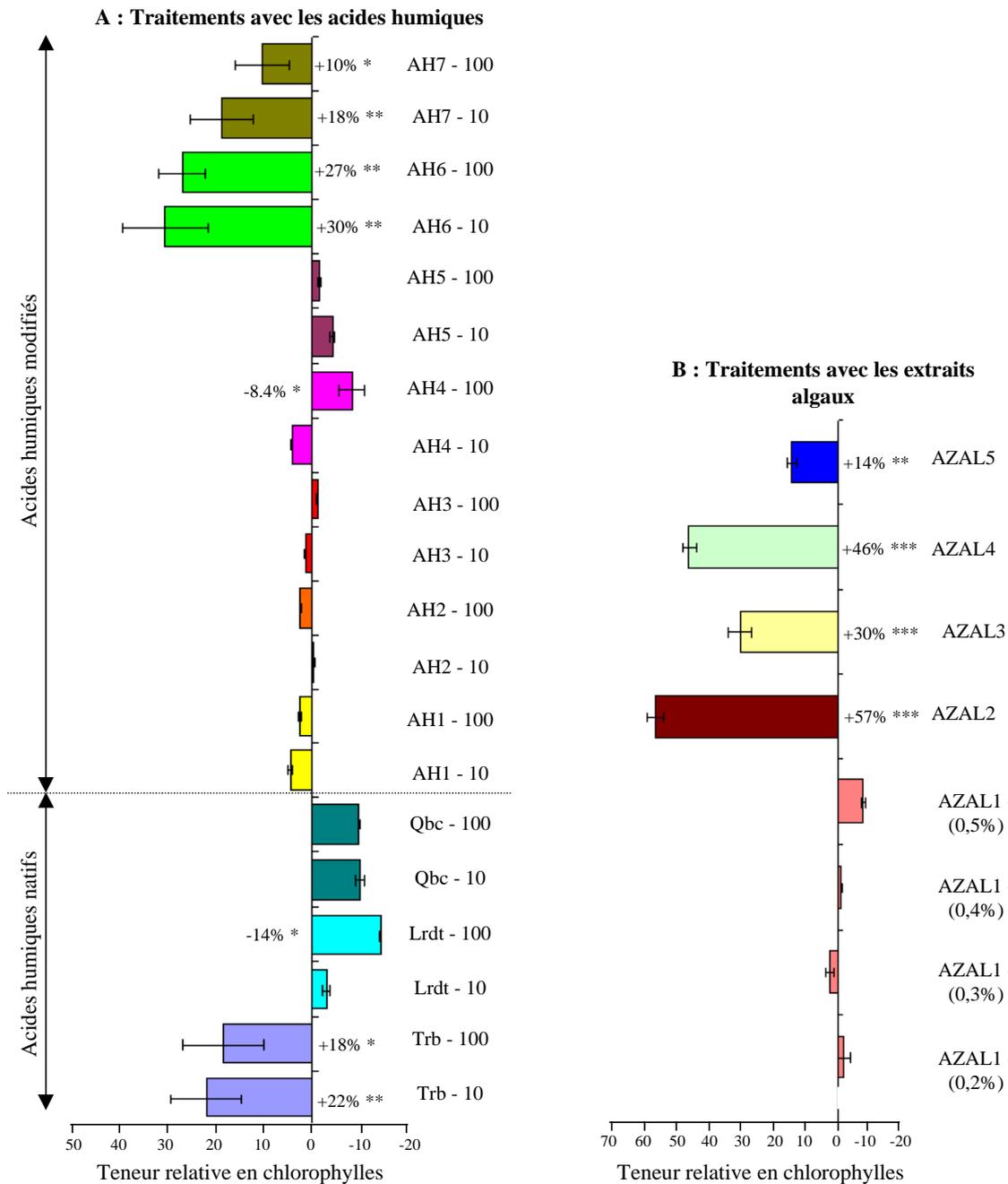


Figure III-3 : Evolution des teneurs relatives en chlorophylles de colzas cultivés pendant 30 jours en présence d'acides humiques (A) ou d'extraits algaux (B). Les teneurs en chlorophylles sont exprimées relativement et en pourcentage de celle du témoin (T) dont la valeur relative est égale à 0 dans ce cas. La valeur absolue de la teneur en chlorophylles des colzas témoin pour les cultures considérées est de 3.5 ± 0.4 pour les colzas traités par les acides humiques et dont la teneur en chlorophylles a été mesurée par Multiplex; et de 36.5 ± 0.6 pour les colzas traités par les extraits algaux et dont la teneur en chlorophylles a été mesurée par SPAD. Pour chaque acide humique, deux concentrations sont représentées : 10 et 100 mg de carbone organique par litre de solution nutritive. Trb (Tourbe), Lrdt (Léonardite) et Qbc (Quebracho) représentent les 3 acides humiques natifs. AH1 à AH7 sont les 7 acides humiques modifiés issus de l'oxydation de la Tourbe ou de la Léonardite par l'extrait phénolique de Quebracho. Pour l'extrait algal AZAL1, quatre concentrations ont été testées : 0,2 ; 0,3 ; 0,4 et 0,5 % (v/v). Pour les extraits AZAL2 à 5, une seule concentration est utilisée : 0,1 % (v/v). Les barres horizontales représentent l'erreur standard de la moyenne pour $n=10$. Les étoiles indiquent un effet significatif par rapport au témoin pour une probabilité $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.001$ (***).

Concernant le dernier extrait testé, à savoir l'extrait AZAL5, les réponses des plantes sont très différentes de celles observées pour les 4 autres extraits algaux (AZAL1 à 4). En effet, comparativement aux plantes témoins, l'extrait AZAL5 entraîne une augmentation hautement significative des biomasses foliaires (+43%, fig. III-2A) et racinaires (+51%, fig. III-2B). Ces augmentations de biomasses racinaires et foliaires se traduisent par une forte augmentation de biomasse totale (+45%, fig. III-2C) des plantes traitées par AZAL5. Ainsi, à cette étape du criblage, **l'extrait AZAL 5 est le seul extrait algal à présenter un effet bénéfique sur la croissance du colza**. Toutefois, à ce stade de notre étude, les effets négatifs des extraits (AZAL1 à 4) ou au contraire positif d'AZAL5 méritent d'être confirmés (ou infirmés) en suivant d'autres paramètres physiologiques tels que l'évolution des teneurs en chlorophylles ou encore les paramètres d'efficacité d'utilisation de l'azote.

I.2 Sur les teneurs en chlorophylles du colza

I.2.1 Acides humiques

L'effet d'un traitement par les acides humiques sur la teneur en chlorophylles des colzas est largement variable selon les extraits, qu'il s'agisse des acides humiques natifs ou modifiés. Pour les acides humiques natifs, seule la tourbe entraîne une augmentation significative de la teneur en chlorophylles et ce, quelle que soit la concentration utilisée (+22% et +18% à 10 et 100 mg de carbone organique.L⁻¹ respectivement, Fig. III-3A). Pour les deux autres acides humiques natifs (léonardite et quebracho), ils ne présentent soit aucun effet significatif sur la teneur en chlorophylles par rapport au témoin (léonardite à 10 mg C.L⁻¹ et quebracho) soit un effet délétère (-14% pour la léonardite à 100 mgC.L⁻¹). Pour ce paramètre, la tourbe est donc de nouveau le seul acide humique natif présentant une action bénéfique.

Concernant les acides humiques modifiés, la figure III-3A montre que, comparativement aux plantes témoin, un traitement par les extraits AH1 à 5 n'entraîne aucune modification de la teneur en chlorophylles des colzas, quelle que soit la concentration à laquelle ils sont appliqués (à l'exception de l'extrait AH4 à 100 mgC.L⁻¹ qui provoque une baisse significative de la teneur en chlorophylles de -8.4%). Au contraire, en réponse au traitement par les extraits AH6 et AH7, on observe une augmentation significative de la

teneur en chlorophylles des plantes traitées, variant de +10% pour AH7 à 100 mgC.L⁻¹ à +30% pour AH6 à 10 mgC.L⁻¹.

1.2.2 Extraits algaux

D'une manière générale, avant même la mesure des teneurs en chlorophylles par Multiplex ou SPAD, il a été constaté que les plantes traitées avec les différents extraits algaux présentaient des feuilles beaucoup plus vertes que les plantes témoin non traitées. Cette observation, bien que visuelle (et de ce fait très peu précise), permet de penser que les plantes traitées avec les extraits algaux pourraient présenter des teneurs en chlorophylles plus élevées que les plantes témoin. Cette observation a été confirmée par la mesure des teneurs en chlorophylles effectuées sur les plantes traitées par les extraits algaux AZAL2 à 5 notamment. En effet, comparativement aux plantes témoin, il a été constaté une augmentation hautement significative des teneurs en chlorophylles de 57, 30, 46 et 14% respectivement en réponse aux extraits AZAL2, 3, 4 et 5 (Fig. III-3B). Concernant l'extrait AZAL1, aucune différence de teneur en chlorophylles n'a pas pu être mise en évidence par rapport aux plantes témoins (fig. III-3B).

A ce stade du criblage, on constate que seuls l'acide humique natif «tourbe», (utilisé à la dose 100 mg C.L⁻¹), les acides humiques AH6 et AH7 et l'extrait algal AZAL5 entraînent une augmentation de biomasse totale (Fig. III-2C) et une augmentation des teneurs en chlorophylles.

I.3 Sur l'Efficiencia d'Utilisation de l'Azote (EUA)

Le dernier paramètre mesuré lors de ce criblage est l'Efficiencia d'Utilisation de l'Azote des colzas (EUA). Pour rappel, il s'agit dans notre cas de la quantité de biomasse sèche produite par gramme d'azote absorbé au terme des 30 jours de culture. Une augmentation de l'EUA suppose une meilleure valorisation de l'azote et permettrait donc *a priori* d'apporter moins d'azote à la culture pour obtenir la même biomasse et/ou au final le même rendement.

1.3.1 Extrait d'acides humiques

Pour les acides humiques natifs, seule la tourbe, quelle que soit la concentration à laquelle elle est appliquée, entraîne une augmentation significative de l'EUA (+77% pour la

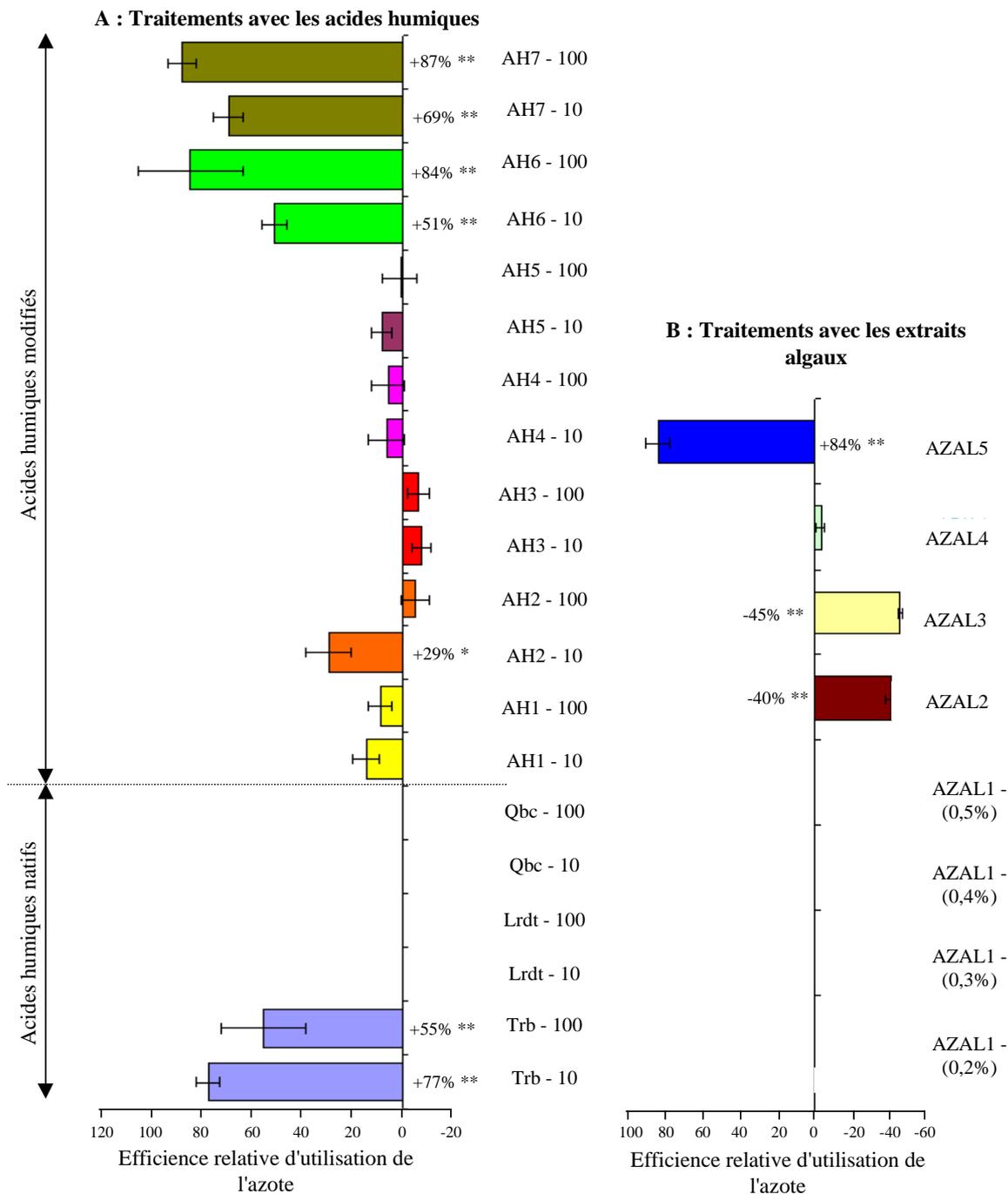


Figure III-4 : Evolution de l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA : grammes de matière sèche produite par gramme d'azote absorbé) de colzas cultivés pendant 30 jours en présence d'acides humiques (A) ou d'extraits algaux (B). Les EUA sont exprimées relativement et en pourcentage de celle du témoin (T) dont la valeur relative est égale à 0 dans ce cas. La valeur absolue de l'EUA des colzas témoin pour les cultures considérées est de $50.41 \pm 7.32 \text{ gMS.gN}^{-1}$ pour les colzas traités par les acides humiques et de $45.55 \pm 10.10 \text{ gMS.gN}^{-1}$ pour les colzas traités par les extraits algaux. Pour chaque acide humique, deux concentrations sont représentées : 10 et 100 mg de carbone organique par litre de solution nutritive. Trb (Tourbe), Lrdt (Léonardite) et Qbc (Quebracho) représentent les 3 acides humiques natifs. AH1 à AH7 sont les 7 acides humiques modifiés issus de l'oxydation de la Tourbe ou de la Léonardite par l'extrait phénolique de Quebracho. Pour l'extrait algal AZAL1, quatre concentrations ont été testées : 0,2 ; 0,3 ; 0,4 et 0,5 % (v/v). Pour les extraits AZAL2 à 5, une seule concentration est utilisée : 0,1 % (v/v). Les barres horizontales représentent l'erreur standard de la moyenne pour n=10. Les étoiles indiquent un effet significatif par rapport au témoin pour une probabilité $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.001$ (***)

tourbe à 10 mgC.L^{-1} et $+55\%$ à 100 mgC.L^{-1} , fig. III-4A). Les deux autres extraits natifs (léonardite et quebracho) ne conduisent pas à une variation significative de l'EUA par rapport aux plantes témoin non traitées. Pour les acides humiques modifiés, les extraits AH1 à AH5 n'entraînent aucune modification significative de l'EUA (sauf AH2 à 10 mgC.L^{-1} : $+29\%$, fig. III-4A), alors que les extraits AH6 et AH7 entraînent entre $+51\%$ (pour AH6 à 10 mgC.L^{-1}) et $+87\%$ (pour AH7 à 100 mgC.L^{-1}) d'augmentation de l'EUA (fig. III-4A) par rapport aux plantes témoins non traitées. L'acide humique natif tourbe et les acides humiques modifiés AH6 et 7 présentent donc des effets positifs sur l'efficacité d'utilisation de l'azote.

1.3.2 Extraits algaux

Concernant les extraits algaux, les extraits AZAL1 et 4 n'entraînent pas de modification significative de l'EUA, quelle que soit la concentration d'extrait utilisée (fig. III-4B). Les extraits AZAL2 et 3 quant à eux, conduisent à une réduction de l'EUA de -40% et -45% respectivement et par comparaison avec le témoin non traité. Seul l'apport d'AZAL5 (fig. III-4B) se traduit par une augmentation significative de l'EUA ($+84\%$) par rapport au témoin non traité.

I.4 Conclusion

Ce criblage permet donc de mettre en évidence des effets physiologiques différents des différents extraits algaux et d'acides humiques. **Parmi les acides humiques natifs, seule la tourbe entraîne une augmentation significative des différents paramètres mesurés au cours de cette étape de criblage, c'est-à-dire la biomasse, la teneur en chlorophylles et l'EUA du colza.** La léonardite et le quebracho, quant à eux, n'ont aucun effet significatif sur ces paramètres. Pour les acides humiques modifiés, les extraits AH1 à AH5 présentent un fort effet sur la biomasse racinaire mais ne modifient pas significativement les biomasses foliaires, totales, la teneur en chlorophylles et l'EUA. **Seuls les extraits AH6 et 7 possèdent un effet significativement positif pour tous les paramètres mesurés.** Concernant les extraits algaux, les résultats sont plus tranchés. **Seul le traitement par l'extrait AZAL5 augmente significativement la biomasse, la teneur en chlorophylles et l'EUA du colza.** La majorité des extraits testés (AZAL1 à 3) présentent un effet clairement délétère sur la culture de colza, donnant des plantes chétives. L'extrait AZAL4 quant à lui, ne présente qu'un effet positif sur la biomasse foliaire.

Les acides humiques AH6 et AH7 ainsi que l'extrait algal AZAL5 présentaient des effets intéressants sur la culture du colza, justifiant une caractérisation plus fine des réponses physiologiques de la plante. Cependant, dans le cadre du programme de recherche Azostimer, l'ensemble des extraits testés sur le colza a également été testé sur le blé par l'équipe du CIPAV de Pampelune (Espagne). Sur le blé, seuls les extraits AH7 et AZAL 5 ont eu des effets comparables à ceux obtenus pour le colza (résultats non montrés). En conséquence, en concertation avec les collègues du CIPAV ainsi qu'avec les différents partenaires du programme Azostimer, il a été convenu que seuls les extraits ayant à la fois des effets bénéfiques sur les cultures de blé et de colza, à savoir **AH7 et AZAL5**, feraient l'objet d'une caractérisation plus fine.

Un préalable à ces caractérisations plus fines, a consisté à faire de nouvelles cultures de colza (en présence de ces deux molécules) dans les mêmes conditions de culture, de durée et d'application que précédemment afin de confirmer (ou d'infirmer) les résultats obtenus lors de l'étape de criblage. En effet, en serre, milieu moins contrôlé qu'une chambre de culture par exemple, il peut exister des variations des conditions environnementales (luminosité, durée de la photopériode, température) entre une culture réalisée en janvier et une autre en juillet. Ces expérimentations complémentaires ont permis de confirmer les résultats précédemment obtenus lors de l'étape de criblage. **Ainsi, quel que soit l'extrait utilisé (AH7 ou AZAL5), il a été mis en évidence des augmentations significatives de biomasses totales, de teneurs en chlorophylles et de l'EUA des colzas traités par rapport aux plantes témoin non traitées.** A l'issue de ces cultures de «confirmation» et compte tenu des effets potentiellement bénéfiques des acides humiques et des extraits algaux sur les plantes en situation de stress relatés dans la littérature (voir chapitre I, paragraphes II.2.3 et III.2.4), nous avons entrepris d'autres expérimentations afin de vérifier si les extraits d'intérêt pouvaient permettre aux plantes de mieux résister à des situations de stress abiotiques (stress salin en particulier).

II. Effets de AH7 et AZAL5 sur la croissance du colza en conditions de stress salin

Généralement, il est reconnu dans la littérature que les extraits algaux et les acides humiques pourraient contribuer à protéger les plantes traitées contre les stress biotiques et abiotiques (Mercier *et al.*, 2001 ; Liang *et al.*, 2005 ; Mancuso *et al.*, 2006). Afin de vérifier cette hypothèse en réponse à nos extraits (AH7 et AZAL5), nous avons réalisé des cultures de colzas en situation de stress, un stress assez commun sur les terres cultivées et irriguées. En

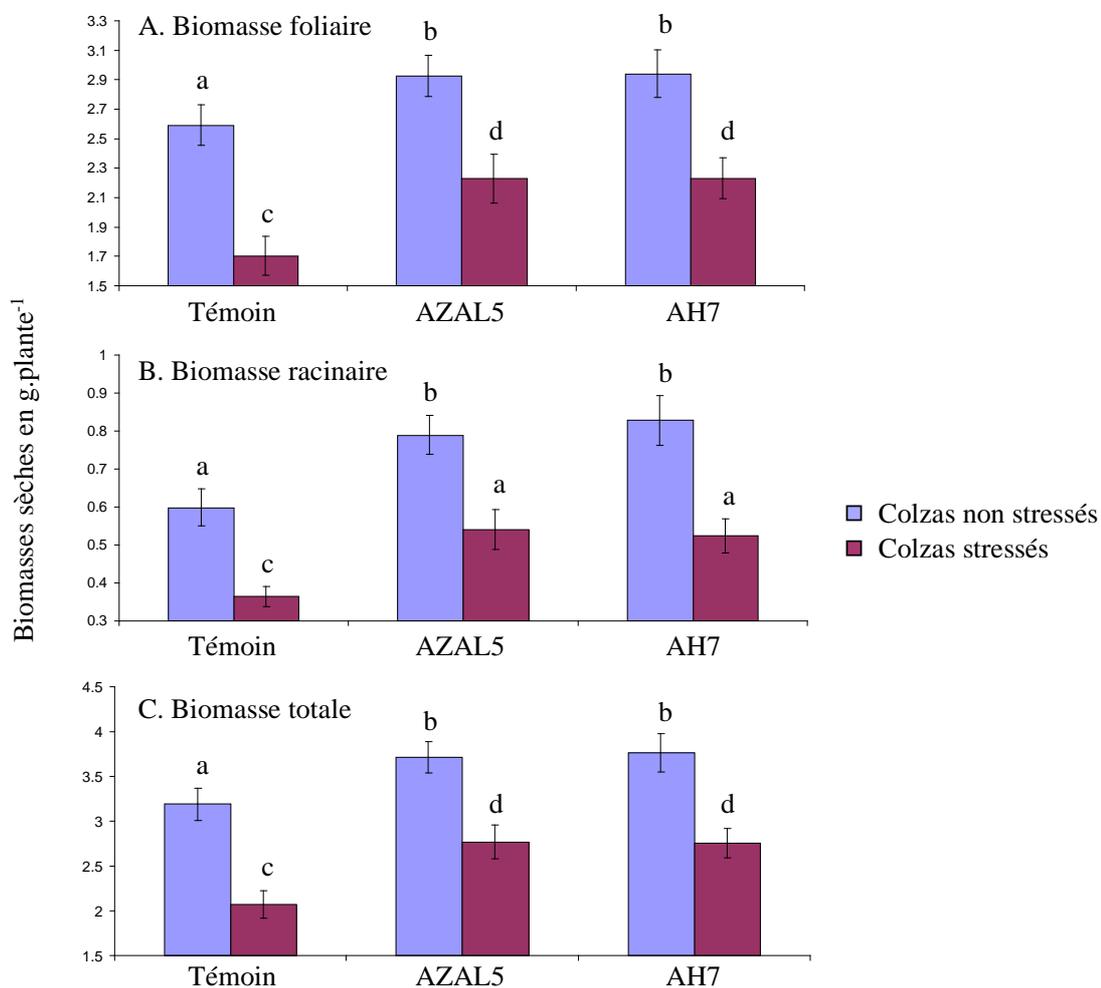


Figure III-5 : Evolution des biomasses sèches foliaires (A), racinaires (B) et totales (C) de colzas cultivés pendant 30 jours en présence de l'extrait algal AZAL5 ou de l'acide humique AH7 et soumis (colzas stressés, histogrammes roses) ou non (colzas non stressés, histogrammes bleus) à un stress salin de 50 mM de NaCl. Les biomasses sont exprimées en gramme par plante. Les barres verticales représentent l'erreur standard de la moyenne pour n=10. Pour chaque graphique, deux lettres différentes indiquent deux moyennes significativement différentes à $p < 0.05$.

effet, la FAO estime que la salinisation des sols réduit les superficies irriguées du monde de 1 à 2% par an. Dans ce contexte, augmenter la résistance des plantes à ce stress, *via* l'apport de substances humiques et/ou d'extrait algaux, pourrait alors présenter un intérêt majeur pour maintenir ou augmenter la production agricole dans les régions arides et semi-arides.

II.1 Sur la production de biomasse

On remarque dans un premier temps que pour les plantes non soumises à un stress, l'augmentation des biomasses foliaires, racinaires et totales observée en réponse à AH7 et AZAL5 lors du criblage est retrouvée lors de cette culture (fig. III-5), démontrant une nouvelle fois, la reproductibilité des résultats précédemment obtenus (étape de criblage et cultures de « confirmation »).

Dans nos conditions, le stress salin (application de 50 mM de NaCl dans la solution nutritive) provoque une diminution générale des biomasses totales des plantes par rapport aux conditions non stressées (fig. III-5C). Cependant, il est particulièrement intéressant de noter que cette diminution est plus importante pour le témoin (-34%) que pour les plantes traitées par AH7 (-24%) ou AZAL5 (-23%), suggérant un effet potentiellement «protecteur» de ces deux traitements en conditions de stress salin. Ce résultat est en accord avec les travaux de par Lakhdar *et al.* (2008) sur *Hordeum maritimum*, qui montrent que l'application d'acides humiques sur les plantes soumises à un stress salin minimise la perte de biomasse des plantes traitées par rapport aux plantes témoins (stressées et non traitées par l'extrait humique) : -45% pour les plantes stressées non traitées et -15% pour les plantes stressée mais traitées par l'acide humique. Ainsi, comparativement à des plantes témoin stressées, les traitements par AH7 et AZAL5 permettent une meilleure production de biomasse chez les plantes cultivées en situation de stress salin. Cependant, il est à noter que la biomasse des plantes stressées et traitées par les extraits restent toujours significativement inférieures à celles de plantes non stressées (fig. III-5A, B et C). Ces résultats suggèrent que la présence de l'extrait, bien que bénéfique, ne permet pas une protection totale contre le stress salin.

II.2 Sur les teneurs en chlorophylles et l'EUA

Contrairement aux résultats obtenus lors du criblage, aucune différence significative du contenu relatif en chlorophylles n'est observée entre les plantes témoins non stressée et les

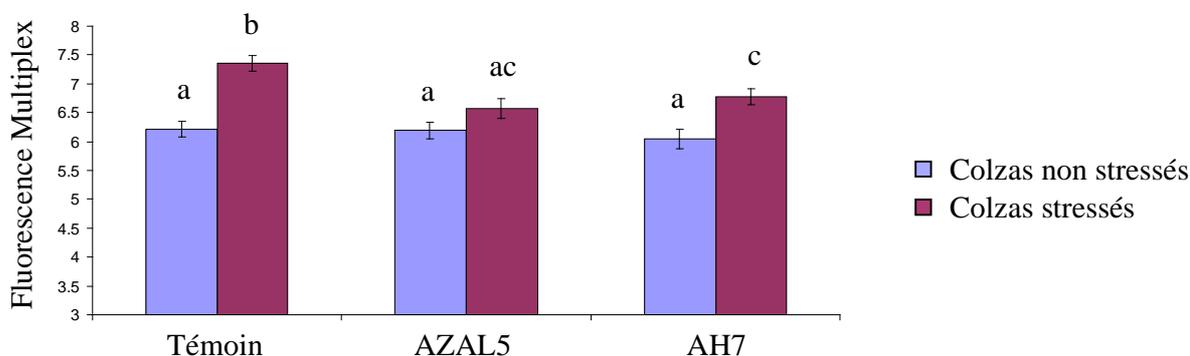


Figure III-6 : Evolution des teneurs en chlorophylles de colzas cultivés pendant 30 jours en présence de l'extrait algal AZAL5 ou de l'acide humique AH7 et soumis (colzas stressés, histogrammes roses) ou non (colzas non stressés, histogrammes bleus) à un stress salin de 50 mM de NaCl. Les teneurs en chlorophylles sont mesurées par Multiplex. Les barres verticales représentent l'erreur standard de la moyenne pour n=10. Deux lettres différentes indiquent deux moyennes significativement différentes à p<0.05.

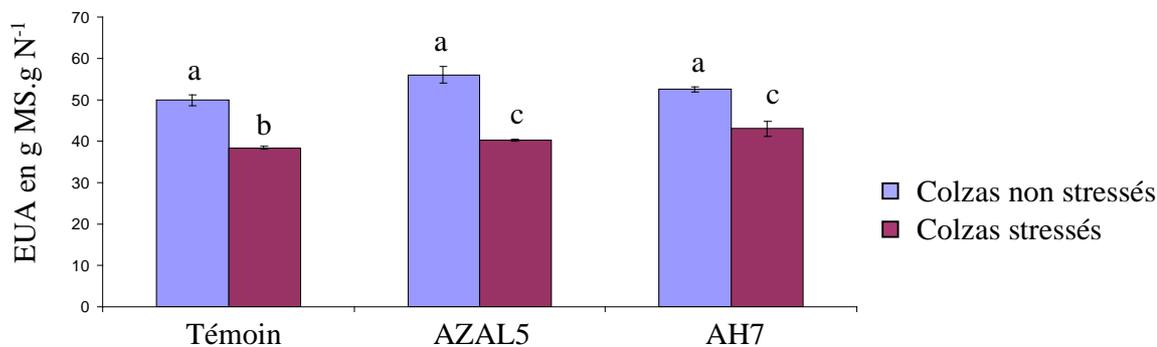


Figure III-7 : Evolution de l'Efficienc d'Utilisation de l'Azote pour des colzas cultivés pendant 30 jours en présence de l'extrait algal AZAL5 ou de l'acide humique AH7 et soumis (colzas stressés, histogrammes roses) ou non (colzas non stressés, histogrammes bleus) à un stress salin de 50 mM de NaCl. Les EUA sont exprimées en grammes de matière sèche produite par gramme d'azote absorbé (gMS.gN⁻¹). Les barres verticales représentent l'erreur standard de la moyenne pour n=10. Deux lettres différentes indiquent deux moyennes significativement différentes à p<0.05.

plantes non stressées traitées pendant 30 jours par AH7 et AZAL5 (fig. III-6). Cependant, les plantes stressées présentent des teneurs en chlorophylles significativement supérieures aux plantes non stressées. Cette constatation est en accord avec la littérature. De nombreux auteurs ont déjà montré des augmentations de teneurs en chlorophylles en réponse à un stress, notamment les stress induits par la présence de métaux lourds comme le cadmium ou le zinc dans le milieu de culture (Singh *et al.*, 2006 ; Jiang *et al.*, 2007 ; Jia *et al.*, 2010 ; Najeeb *et al.*, 2011). De même, pour les plantes cultivées en présence d'extraits (AH7 ou AZAL5), on observe également des teneurs en chlorophylles plus fortes lors de l'application d'un stress salin (comparativement aux plantes cultivées en présence d'extraits mais non stressé). Cependant, l'augmentation est moins importante que chez les plantes témoins non traitées par les extraits, pouvant suggérer une action des extraits contre le stress salin.

L'apport de NaCl aux plantes témoin non traitées (fig. III-7) diminue l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA) d'environ 23%. C'est à dire que la quantité de biomasse synthétisée par gramme d'azote absorbé est plus faible dans ces conditions. Compte tenu d'une biomasse plus faible chez ces plantes témoin (-35%, fig. III-5C), cela peut permettre de conclure que le stress salin diminue plus la croissance que l'absorption d'azote, aboutissant ainsi à une baisse de l'EUA. L'apport des extraits AH7 ou AZAL5 à ces plantes stressées par le NaCl ne modifie pas significativement la baisse de l'EUA. Ainsi, elle est de -18% et -28% respectivement pour AH7 et AZAL5, conservant donc une amplitude équivalente à celle mesurée pour les plantes témoin non traitées.

II.3 Conclusions

Le traitement par l'extrait algal AZAL5 ou l'acide humique AH7 confère une relative protection aux plantes vis-à-vis du NaCl puisque la chute de biomasse sèche est moins importante pour les plantes traitées que pour les plantes témoin (fig. III-5). Ces traitements permettent même de rétablir une biomasse fraîche équivalente à celle de colzas non traités et non stressés (résultats non montrés). AZAL5 et AH7 réduisent l'augmentation des teneurs en chlorophylles observée chez les plantes témoin soumises au NaCl (fig. III-6). De plus, les traitements AH7 et AZAL5 ne modifient pas la baisse de l'EUA observée pour les plantes témoin. Ces résultats sont conformes à la littérature, puisque la plupart des auteurs montrent un maintien de la biomasse et de teneurs en chlorophylles en réponse au traitement par un extrait algal ou un acide humique. Ainsi Lakhdar *et al.* (2008), en plus du maintien de la

biomasse pour les plantes soumises à un stress salin et traitées par les acides humiques, rapportent en parallèle un maintien des teneurs en chlorophylles (autour de 40% de réduction pour les plantes soumises au NaCl et seulement 10% de réduction pour les plantes traitées par l'acide humique en plus du stress salin). Pour chaque paramètre, les pourcentages de diminution rapportés dans cette étude correspondent avec ceux obtenus dans notre cas sur le colza, bien que Lakdar *et al.* (2008) cultivent l'*Hordeum maritimum* sur sol alors que notre étude a été réalisée à partir de colzas cultivés en hydroponie.

III. Culture sur sol

Le passage d'une culture hydroponique, à une culture sur un sol, pour lequel les interactions avec les nutriments mais aussi les extraits algaux ou humiques sont plus fortes, requiert potentiellement des doses d'extraits plus élevées afin d'observer des effets physiologiques comparables. En effet, lors de la culture en hydroponie, les racines des plantes sont en contact permanent avec l'extrait algal ou humique qui est renouvelé à chaque changement de solution (tous les 2 jours). L'extrait est donc toujours présent à la même concentration et sous la même forme tout au long de la culture. Ce contact plante/extrait est modifié lors des cultures sur sol. Les extraits, apportés lors d'un arrosage, doivent infiltrer le sol avant d'arriver au contact des racines. Ils sont donc en partie adsorbés sur les complexes argilo-humiques et/ou dégradé par la microflore et la microfaune du sol. D'autre part, l'apport d'extrait n'est réalisé qu'une à deux fois au cours de la culture. La quantité et la qualité de l'extrait parvenant au contact des racines du colza peuvent alors être largement modifiées par rapport aux cultures hydroponiques. Concernant les extraits AZAL5 et AH7, l'objectif des expérimentations décrites ci-dessous consistait à optimiser les conditions de culture des plantes sur sol ainsi que les conditions d'apport d'extraits (en particulier en déterminant les doses d'apport) afin d'obtenir des réponses physiologiques comparables à celles obtenues en cultures hydroponiques.

Pour cela, comme indiqué dans le chapitre II «Matériels et Méthodes» nous avons utilisé deux sols présentant deux pH contrasté (un sol dit « acide » et un sol dit « alcalin »). Au moment de la mise en pot, afin de limiter une compaction trop importante des sols et de favoriser les processus d'écoulement de la solution lors de l'apport des extraits, les sols ont été mélangés soit avec du sable soit avec de la perlite. Au cours de ces expérimentations,

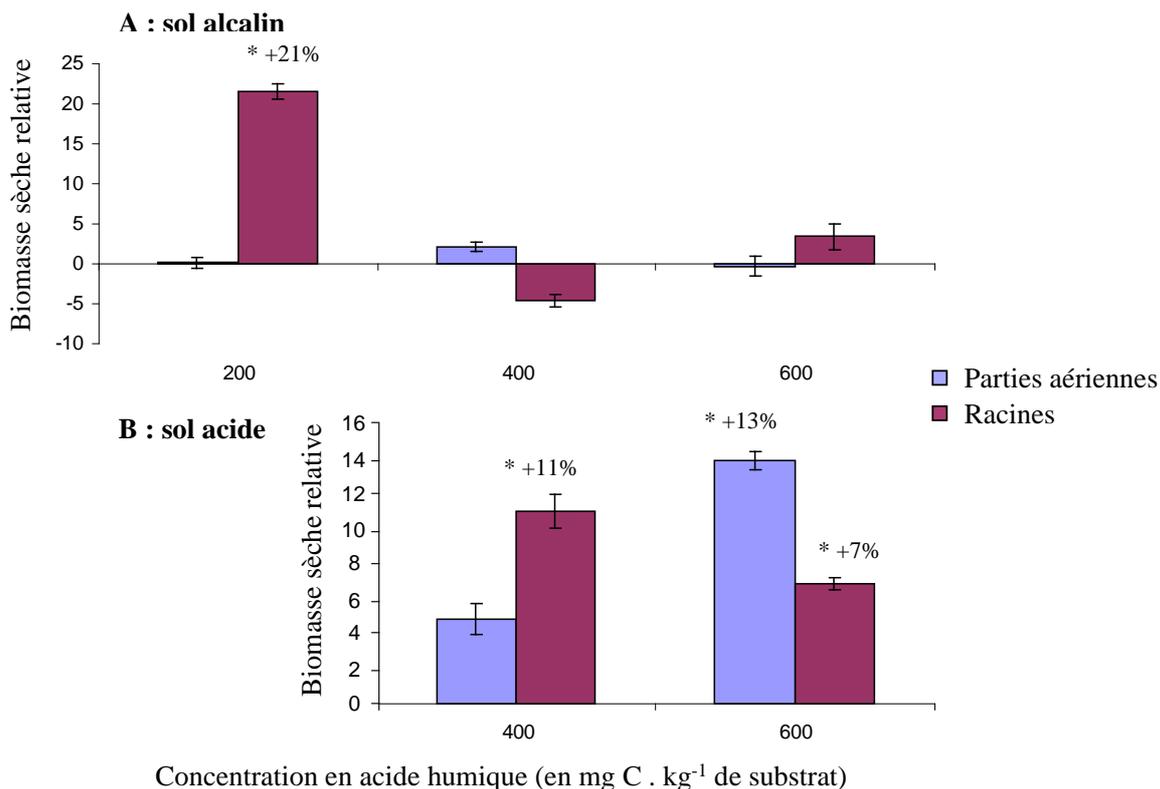


Figure III-8 : Evolution des biomasses sèches aériennes (histogrammes bleus) et racinaires (histogrammes roses) de colzas cultivés pendant 30 jours en présence d'acide humique AH7 sur un sol alcalin (A) ou sur un sol acide (B). Les biomasses sont exprimées relativement et en pourcentage de celle du témoin dont la valeur relative est égale à 0 dans ce cas. La valeur absolue de la biomasse des colzas témoin pour les cultures considérées est de 2.63 ± 0.12 g pour la biomasse foliaire et de 0.78 ± 0.04 g pour la biomasse racinaire lors des cultures sur sol alcalin. Pour les cultures sur sol acide, les valeurs absolues sont de 2.75 ± 0.06 g pour la biomasse foliaire et de 0.73 ± 0.02 g pour la biomasse racinaire. Les barres verticales représentent l'erreur standard de la moyenne pour $n=4$. Les étoiles indiquent un effet significatif par rapport au témoin pour une probabilité $p < 0.05$ (*).

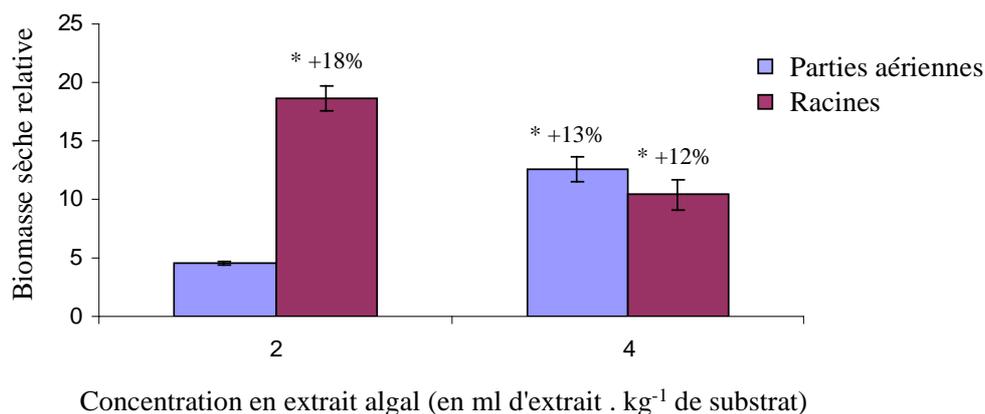


Figure III-9 : Evolution des biomasses sèches aériennes (histogrammes bleues) et racinaires (histogrammes roses) de colzas cultivés pendant 30 jours en présence d'extrait algal AZAL5 sur un sol alcalin. Les biomasses sont exprimées relativement et en pourcentage de celle du témoin dont la valeur relative est égale à 0 dans ce cas. La valeur absolue de la biomasse des colzas témoin pour les cultures considérées est de 2.63 ± 0.12 g pour la biomasse foliaire et de 0.78 ± 0.04 g pour la biomasse racinaire. Les barres verticales représentent l'erreur standard de la moyenne pour $n=4$. Les étoiles indiquent un effet significatif par rapport au témoin pour une probabilité $p < 0.05$ (*).

l'extraits AH7 a été apporté à des plants de colza cultivés sur sol alcalin et acide alors que l'extraits AZAL5 a été apportés à des cultures de colza cultivées seulement sur sol alcalin.

III.1 Effets sur les paramètres physiologiques du colza (croissance, teneur en chlorophylles et EUA)

III.1.1 Sur sols (alcalin ou acide) en présence d'AH7

La figure III-8 présente la biomasse des plantes après 30 jours de cultures sur les deux types de sols reconstitués (alcalin et acide) en présence de l'extrait humique AH7 apportés selon 3 doses différentes à savoir 200, 400 et 600 mg de C.kg⁻¹ de sol. Sur sol alcalin (fig. III.8.A), l'acide humique accroît la biomasse racinaire relative de 21% pour la dose à 200 mgC.kg⁻¹ de substrat. Pour les doses supérieures (c'est-à-dire 400 et 600 mg de C.kg⁻¹ de substrats), l'apport d'extrait n'induit aucune modification significative de biomasses (foliaire ou racinaire) par rapport aux plantes témoin (fig. III-8A). Lorsque les plantes sont cultivées sur sol acide (fig. III-8B), des apports d'acide humique AH7 à des doses de 400 et 600 mgC.kg⁻¹ substrat entraînent une augmentation significative de la biomasse racinaire de 11 et 7% respectivement. Concernant les biomasses foliaires (fig. III-8) et la biomasse totale de la plante (résultats non montrés), seule la dose la plus forte d'AH7 (soit 600 mg de C.kg⁻¹ de substrat) entraîne une augmentation de ces deux paramètres (+13% et +12% respectivement, fig. III-8B). Par ailleurs, concernant les autres paramètres, à savoir, la teneur en chlorophylles et l'EUA, quels que soient les sols utilisés pour la culture des plantes (alcalin ou acide) ou les doses utilisées, comparativement aux plantes témoin non traitées, aucun effet significatif en réponse à l'extrait AH7 n'a pu être mis en évidence (résultats non montrés)

III.1.2 Sur sol alcalin en présence de l'extrait AZAL5

Au cours de ces expérimentations, l'extrait AZAL5 a été apporté à des colzas cultivés sur sol alcalin selon 2 doses : 2 et 4 ml d'extrait.kg⁻¹ de substrat (sol). La figure III-9 présente les biomasses relatives (foliaires et racinaires) des plantes traitées. Quelle que soit la dose utilisée, l'apport d'extrait se traduit par une augmentation des biomasses foliaires et racinaires des plantes traitées par rapport aux plantes témoins non traitées (+5 et + 18% respectivement pour les biomasses racinaire et foliaire des plantes traitées à la dose de 2 ml d'extrait.kg⁻¹ de substrat et +13 et 12% respectivement pour les biomasses racinaire et foliaire des plantes

traitées à la dose de 4 ml d'extrait.kg⁻¹ de substrat). Concernant les autres paramètres (teneurs en chlorophylles et EUA), aucune différence significative par rapport aux plantes témoins non traitées n'a pu être mise en évidence.

III.2 Conclusions

Les conditions de cultures sur sol testées jusqu'à présent permettent de confirmer l'effet des extraits sur la biomasse mais ne sont probablement pas les conditions optimales pour permettre l'expression avec une même ampleur des autres effets physiologiques induits par les deux extraits (teneurs en chlorophylles et EUA). Ceci pourrait être dû à une moindre disponibilité des extraits qui, comme nous l'avons vu précédemment, pourraient notamment être adsorbés par les particules du sol. Toutefois, il est à noter que l'extrait AH7 présente des effets contrastés en fonction du pH du sol (alcalin ou acide). Ainsi, seuls les résultats obtenus sur sol acide sont comparables avec ceux obtenus en hydroponie avec notamment une stimulation de la croissance racinaire (quelle que soit la dose) et une croissance foliaire augmentée (pour la dose la plus forte (fig. III-8)).

Cependant, ces expérimentations méritent d'être approfondies en raison de la complexité des relations existantes entre le sol, les racines, l'extrait apporté, le pH du sol et la microflore tellurique (qui n'a pas été prise en compte lors de ces expérimentations). Un certain nombre de compléments aux protocoles déjà testés pourraient donc être envisagés comme le développement d'un nouveau support de culture (et notamment en augmentant la taille des pots qui était peut-être limitante en fin de culture) et d'un substrat qui maximiserait le contact de l'extrait avec les racines. Par ailleurs, il serait également judicieux de tester ces deux extraits AZAL5 et AH7 en pulvérisation foliaire, ce qui, outre la facilité d'application, permettrait de s'affranchir en partie des problèmes liés aux interactions avec le substrat.

IV. Discussion

La partie criblage de cette thèse reposait sur l'hypothèse que la modification chimique d'un acide humique ou le changement d'espèce d'un extrait algal pouvait augmenter leurs effets physiologiques sur les végétaux. Concernant les acides humiques (AH1 à 7) la modification consiste à faire varier le nombre de groupements carboxyliques et phénoliques sur les deux acides humiques natifs que sont la tourbe et la léonardite en réalisant des

Tableau III-1 : Bilan comparatif des effets des extraits algaux sur la production de biomasse, la teneur en chlorophylles et l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA) au terme de 30 jours de contact. Les valeurs sont exprimées relativement et en pourcentage de celle du témoin. Pour l'extrait algal AZAL1, quatre concentrations ont été testées : 0,2 ; 0,3 ; 0,4 et 0,5 % (v/v). Pour les extraits AZAL2 à 5, une seule concentration est utilisée : 0,1 % (v/v). Les barres obliques représentent les conditions pour lesquelles les paramètres mesurés pour les colzas traités ne sont pas significativement différents du témoin non traité. Les étoiles indiquent un effet significatif par rapport au témoin pour une probabilité $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.001$ (***)).

Extrait	Concentration (mg C . L ⁻¹)	Biomasses			Teneur en chlorophylles	EUA
		foliaire	racinaire	totale		
AZAL1	0.2	/	-35 *	/	/	/
	0.3	/	-33 *	/	/	/
	0.4	/	-24 *	/	/	/
	0.5	/	-33 *	/	/	/
AZAL2	0.1	/	-41 *	-20 *	+57 ***	-40 **
AZAL3	0.1	-87 ***	-88 ***	-87 ***	+30 ***	-45 **
AZAL4	0.1	+29 *	-32 *	/	+46 ***	/
AZAL5	0.1	+43 **	+51 **	+45 **	+14 **	+84 **

Tableau III-2 : Bilan comparatif des effets des acides humiques sur la production de biomasse, la teneur en chlorophylles et l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA) au terme de 30 jours de contact. Les valeurs sont exprimées relativement et en pourcentage de celle du témoin. Pour chaque acide humique, deux concentrations sont représentées : 10 et 100 mg de carbone organique par litre de solution nutritive. La Tourbe et la Léonardite représentent les acides humiques natifs. AH1 à AH7 sont les 7 acides humiques modifiés. AH1 à AH3 sont issus de l'oxydation de la Tourbe par l'extrait phénolique de Quebracho, AH4 à AH7 sont issus de l'oxydation de la Léonardite par l'extrait phénolique de Quebracho. Les barres obliques représentent les conditions pour lesquelles les paramètres mesurés pour les colzas traités ne sont pas significativement différents du témoin non traité. Les étoiles indiquent un effet significatif par rapport au témoin pour une probabilité $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.001$ (***)).

Extrait	Concentration (mg C . L ⁻¹)	Biomasses			Teneur en chlorophylles	EUA
		foliaire	racinaire	totale		
Tourbe	10	/	/	/	+22 **	+77 **
	100	+46 **	/	+44 *	+18 *	+55 **
AH1	10	/	+101 ***	/	/	/
	100	/	+99 ***	/	/	/
AH2	10	/	+100 ***	/	/	+29 *
	100	-24 *	+98 ***	/	/	/
AH3	10	/	+87 ***	/	/	/
	100	-41 **	+69 ***	-29 *	/	/
Extrait	Concentration (mg C . L ⁻¹)	Biomasses			Teneur en chlorophylles	EUA
		foliaire	racinaire	totale		
léonardite	10	/	/	/	/	/
	100	/	/	/	-14 *	/
AH4	10	/	+39 *	/	/	/
	100	-18 *	+79 **	/	-8 *	/
AH5	10	-22 **	+82 **	/	/	/
	100	-21 **	+72 **	/	/	/
AH6	10	+27 *	+50 **	+31 *	+30 **	+51 **
	100	+21 *	+75 **	+31 *	+27 **	+84 **
AH7	10	+51 *	+88 **	+58 **	+18 **	+69 **
	100	+23 *	+61 **	+31 *	+10 *	+87 **

réactions d'oxydation et de polymérisation avec un autre acide humique natif, à savoir le quebracho. En effet, dans la littérature, il est généralement supposé que ces groupements puissent être à l'origine des effets physiologiques induits par les acides humiques (Conte & Piccolo, 1999 ; Smejkalova & Piccolo, 2008). Concernant les extraits algaux, les extraits sont issus de différentes espèces d'algues (*Ascophyllum nodosum* et *Fucus serratus*). L'objectif de l'étape de criblage consistait donc à déterminer le(s) extraits(s) le(s) plus efficace(s) pour maximiser les effets physiologiques des extraits algaux obtenus (AZAL1 à 5). Dans ce sens, 5 extraits algaux (AZAL1 à 5) et 7 extraits humiques modifiés (AH1 à 7) nous ont été fournis ainsi que les 3 acides humiques natifs (Tourbe, Léonardite et Québracho) dont ils dérivent. Les tableaux III.1 et III.2 présentent un bilan comparatif des résultats obtenus pour les différents extraits.

Parmi tous les extraits algaux, seul AZAL5, extrait d'*Ascophyllum nodosum*, permet d'accroître significativement la biomasse (fig. III-2), la teneur en chlorophylles des feuilles (fig. III-3B) et l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA, fig. III-4B) des colzas traités. Tous les autres ne présentent aucun effet par rapport au témoin non traité ou même parfois un effet délétère sur la biomasse (tableau III-1). Les extraits AZAL1 et 4, quant à eux, tous extraits à partir d'un mélange d'algues des genres *Fucus* et *Ascophyllum* ne présentent aucun effet significatif sur les différents paramètres étudiés chez le colza. Il semble alors que l'extrait d'*Ascophyllum nodosum* serait le plus efficace (AZAL5). De manière intéressante, il se trouve que cette algue est une des plus étudiées dans la littérature (Roussos *et al.*, 2009 ; Khan *et al.*, 2009 ; Khan *et al.* 2011 ; Subramanian *et al.*, 2011) principalement pour la protection qu'elle confère aux plantes contre les stress biotiques et abiotiques. **Compte tenu des résultats obtenus lors cette étape de criblage, l'extrait algal AZAL 5 a été retenu pour les expérimentations suivantes.**

Concernant les acides humiques, au regard des figures (fig. III-1, III-3 et III-4), nous avons montré que, par rapport aux acides humiques natifs, la modification chimique modifie les réponses des plantes vis-à-vis de ces extraits. Cette modification est surtout visible au niveau de la biomasse racinaire (fig. III-1B) pour laquelle on passe d'aucun effet significatif pour les acides humiques natifs à un quasi doublement de la biomasse racinaire en réponse aux acides humiques modifiés. Pour les biomasses foliaires et totales, les réponses au traitement par les acides humiques natifs et modifiés sont plus nuancées. Pour mémoire, les extraits AH1 à 3 sont principalement issus de l'acide humique natif extrait de la tourbe et les

extraits AH4 à 7 principalement de l'acide humique natif venant de la léonardite. On voit alors que pour les extraits issus de tourbe (AH1 à 3), la modification chimique a totalement changé le profil de réponse du colza par rapport l'extrait natif (tableau III-2). En effet, la tourbe stimule uniquement la production de biomasse foliaire alors que les extraits AH1 à 3 n'induisent qu'une stimulation de la biomasse racinaire. Cette modification chimique des extraits fait même perdre aux extraits AH1 à 3 l'effet bénéfique de la tourbe observé sur les teneurs en chlorophylles et l'EUA. Il est alors difficile de déterminer réellement si, dans ce cas, la modification chimique de l'acide humique apporte un plus par rapport à l'acide natif. Concernant les extraits modifiés AH4 à 7 issus de la léonardite, on distingue deux groupes d'acides humiques induisant des réponses contrastées par rapport à l'acide humique natif (tableau III-2). Un premier groupe constitué par les extraits AH4 et 5 possédant un profil de réponse similaire à celui obtenu lors des traitements par les extraits AH1 à 3, à savoir une augmentation, voire un doublement, de la biomasse racinaire mais pas d'effet significatif ou un effet délétère sur les biomasses foliaires, la teneur en chlorophylle et l'EUA. Pour ces extraits (AH4 et 5), la modification chimique n'entraîne pas de modifications notoires des effets physiologiques de l'acide humique natif si ce n'est pour l'augmentation de biomasse racinaire qui est plus importante. **Au contraire, concernant le deuxième groupe composé des extraits AH6 et AH7, la modification chimique apporte un réel progrès par rapport à la léonardite (tableau III-2), aboutissant à des augmentations significatives des biomasses racinaires et foliaires, des teneurs en chlorophylles et de l'EUA des plantes traitées.** On peut alors en conclure que la modification chimique de la tourbe n'est pas une bonne stratégie puisque les 3 essais de modification n'ont eu pour résultat principal que de supprimer les effets physiologiques observés en réponse à cet extrait natif. Par contre, la modification chimique de la léonardite est quant à elle plus efficace puisque les extraits qui en sont issus provoquent, par rapport à l'acide humique natif, au moins une stimulation de la biomasse (AH4 et 5) ou une stimulation de tous les paramètres étudiés (biomasse, teneur en Chlorophylles et EUA) au cours de cette étape de criblage (AH6 et 7).

Si l'on reprend l'hypothèse de travail sur laquelle se basait cette première partie de thèse, on constate alors que les modifications chimiques d'un extrait ne donnent pas toujours les résultats espérés sur la croissance du colza. Certaines peuvent être très efficaces (comme dans le cas de AH6, AH7 et AZAL5) et d'autres peuvent faire perdre les propriétés des extraits natifs (AH1 à 3). **Ce criblage nous permet néanmoins de dégager deux extraits, l'extrait algal AZAL5 et l'acide humique AH7, semblant présenter les meilleures**

potentialités d'action autant sur le colza que sur le blé (études réalisées par le CIPAV, communication personnelle de Maria Garnica). Il est déjà intéressant de remarquer que, concernant les paramètres étudiés (biomasses, teneur en chlorophylles et EUA) lors du criblage, ces deux extraits, bien que d'origines très différentes, engendrent des réponses similaires chez les colzas traités. Ces réponses très proches se retrouvent également lors des cultures en condition de stress. Cependant, tous ces effets ne sont pour l'instant que des constatations physiologiques déjà rapportées dans la littérature pour d'autres extraits algaux ou humiques, puisqu'il s'agissait alors seulement de cribler tous les extraits pour sélectionner ceux possédant le plus fort potentiel. Le reste du travail de recherche a donc consisté à étudier plus précisément l'impact des extraits AZAL5 et AH7 sur le fonctionnement du colza, en combinant une approche très large reposant sur l'utilisation de puce ADN haute densité (récemment développée pour le colza) à une approche plus ciblée consistant à valider les données moléculaires tout en les reliant aux processus physiologiques correspondants.

Chapitre IV

*La croissance du colza est activée par les
extraits algaux et les acides humiques :
Analyses transcriptomiques et
caractérisations physiologiques des
métabolismes N, C et S*

CHAPITRE IV

LA CROISSANCE DU COLZA EST ACTIVEE PAR LES EXTRAITS ALGAUX ET LES ACIDES HUMIQUES : ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES ET CARACTERISATIONS PHYSIOLOGIQUES DES METABOLISMES N, C ET S

Afin de cibler plus en détail les modes d'action et les cibles métaboliques des extraits algaux et des acides humiques sur le fonctionnement du colza, nous avons focalisé notre démarche sur les deux extraits les plus prometteurs (chapitre III) : AZAL5 et AH7. Dans notre cas, nous avons choisi de déterminer les cibles moléculaires de ces extraits en utilisant une méthode de transcriptomique différentielle permettant la comparaison des transcriptomes de colzas traités par chacun de ces deux extraits à celui des colzas témoin non traités *via* l'utilisation de microarray spécifique du colza. A l'issue de cette analyse à large spectre, certains résultats ont été confirmés par des analyses physiologiques, biochimiques et microscopiques ainsi que par des analyses transcriptomiques plus ciblées. L'ensemble des résultats obtenus est présenté et discuté dans les articles 1 et 2 présentés ensuite :

L'article 1 intitulé « *Brassica napus* growth is promoted by *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. seaweed extract: Microarray analysis and physiological characterization of N, C and S metabolisms » présente les résultats obtenus par microarray avec des colzas traités ou non par l'extrait algal AZAL5. Il a été soumis à Journal of Plant Growth Regulation (JPGR-11-0234).

L'article 2 intitulé « Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: Involvement of N, C and S metabolisms », présente les résultats moléculaires obtenus par microarray avec des colzas traités ou non par l'acide humique AH7. Il a été soumis à Plant and Soil (PLSO9031).

Article 1

I - *Brassica napus* growth is promoted by *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. seaweed extract: Microarray analysis and physiological characterization of N, C and S metabolisms (Article 1)

Laëtitia Jannin^{1,2}, Mustapha Arkoun^{1,2}, Philippe Etienne^{1,2}, Philippe Laine^{1,2}, Didier Goux³, Maria Garnica⁴, Marta Fuentes⁴, Sara San Francisco⁴, Roberto Baigorri⁴, Florence Cruz⁵, Fabrice Houdusse⁵, José-Maria Garcia-Mina⁴, Jean-Claude Yvin⁵, Alain Ourry^{1,2}

1. Université de Caen Basse-Normandie, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S. Esplanade de la paix, 14032 Caen Cedex, France
2. INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S. Esplanade de la paix, 14032 Caen Cedex, France
3. Université de Caen Basse-Normandie, Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie (CMABio), Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France
4. TIMAC Agro Spain, CIPAV, Groupe Roullier, Poligono de Arazuri-Orcoyen, Calle C, n°32, E-31160 Orcoyen, Spain
5. Centre de Recherche International en Agrosience, CRIAS-TAI, Groupe Roullier, 55 boulevard Jules Verger, 35800 Dinard, France

Avant-propos

Les bienfaits d'une application d'algues ou d'extraits algaux sur les cultures sont connus depuis l'antiquité. Ainsi, des augmentations de biomasses et de rendements ont souvent été rapportés en réponse à ces extraits. Cependant, il ne s'agit majoritairement que de mesures physiologiques et les mécanismes et modes d'action sous tendant ces augmentations de biomasses sont pour l'instant mal connus, en particulier chez le colza.

L'objectif principal de ce travail consistait donc à étudier en détail l'action d'un extrait algal, sélectionné après criblage de 5 extraits algaux pour leurs effets sur la biomasse, sur le colza afin de préciser son mode d'actions. Dans cette étude nous avons choisi de nous focaliser sur trois métabolismes importants pour la plante : la photosynthèse ainsi que les nutriments azotés et soufrés. Pour cela, une analyse en puces ADN a été réalisée afin de comparer les transcriptomes de colzas traités par l'extrait algal à ceux de colzas témoin non traités. Cette analyse est ensuite complétée par des mesures de contenu en composés N et S, des mesures de l'activité nitrate réductase *in vivo* ainsi que des observations des chloroplastes en microscopie confocale et électronique.

Les résultats obtenus montrent que, chez les colzas traités, on observe une augmentation de biomasse caractéristique de l'application d'extrait algaux mais également une activation des nutriments azotés et soufrés. C'est-à-dire non seulement une activation des transporteurs racinaires responsables de l'absorption de ces éléments mais également une activation de leurs voies d'assimilation. Le point le plus novateur de cette étude concerne l'augmentation du nombre de chloroplastes dans les cellules dès les premières heures de contact entre la plante et l'extrait.

I.I Introduction

Any improvement in agricultural practices that increases plant nutrient capture efficiency should reduce the negative environmental impacts of agriculture and increase crop production and sustainability in reduced input systems. Thus, many approaches have been studied to increase nutrients capture and yield such as genetic selection: allele selection, selection of domestication genes, gene and genome duplication, new genotype creation, QTLs... (for review, see Vaughan *et al.*, 2007). Moreover, a better knowledge of plant uptake and assimilation could also allow a better efficiency of crop fertilization. In this way, recent studies have focused principally on potentially polluting nutrients such as phosphorus (P) and nitrogen (N) (Agostini *et al.*, 2010; Borda *et al.*, 2011). More recently, new strategies such as the use of biological molecules that act as biostimulants have been evaluated. As defined by Zhang and Schmidt (1997), biostimulants correspond to “materials, other than fertilizers, that promote plant growth when they are applied in small quantities”. In addition, Zhang and Schmidt (1997) considered biostimulant as “metabolic enhancers” that can be used to increase the effectiveness of conventional mineral fertilizers (Craigie, 2011). Among these biostimulants, bioactive substances extracted from seaweeds are the most studied.

Since antiquity and more traditionally, seaweeds have been applied directly to soil as manure and as soil conditioning agents (Blunden and Gordon, 1986; Metting *et al.*, 1988; Temple and Bomke, 1988; Hong *et al.*, 2007). The observed benefits to the growth, health and yield of crop plants have been attributed to (i) the supply of essential nutrients provided by degradation of organic matter and (ii) the improvement of soil texture with an increase of water holding capacity. However the use of marine seaweed to fertilize crops has required development of preparation methods to facilitate transport over long distances (Gardissal, 1857). For example, a method for compressing seaweed or marine plants into compact transportable form was published more than 150 years ago. More recently, new techniques to obtain seaweed extract (seaweed liquefaction) instead of gross seaweed, such as alkaline extraction (Milton, 1952) or low temperature milling (Hervé and Roullier, 1977) have been used. These liquid seaweed extracts are therefore more frequently used as they facilitate transport and application to soil or as a foliar spray. In parallel, further studies of these liquid extracts have been performed in order to understand their potentialities and modes of action. Studies on the effects of seaweed extracts have shown accelerated developments cycles i.e. earlier germination, flowering and fructification in treated grapevine and strawberry

(Sivasankari *et al.*, 2006; Roussos *et al.*, 2009). Other authors have related an increase in total dry weight, and more specifically the proliferation of secondary root systems in response to foliar spraying with seaweed extract on *Arabidopsis thaliana* (Merigout, 2006; Rayorath *et al.*, 2008), grapevine (Mugnai *et al.*, 2008) and strawberry (Roussos *et al.*, 2009; Spinelli *et al.*, 2010). In parallel, enhancement of leaf chlorophyll content has also been reported in grapevine (Sivasankari *et al.*, 2006; Mancuso *et al.*, 2006) and strawberry (Spinelli *et al.*, 2010). This improved development and increase in crop growth led to an increase in yield, quality and size of harvested products for grapevine, strawberry, soybean, tomato and maize treated by foliar spraying with seaweed extract (Sivasankari *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2009; Rathore *et al.*, 2009; Roussos *et al.*, 2009). All these authors suggest that phytohormones contained in the seaweed extract such as auxins or cytokinins are probably responsible for the accelerated and improved development of plants. In this way, Khan *et al.* (2011) demonstrate that liquid culture or foliar spraying with an *Ascophyllum nodosum* extract induced cytokinin-like activity in *Arabidopsis thaliana* leaves and roots. Moreover, Okazaki *et al.* (2009) showed that cytokinin-like activity induced in plants enhances the chloroplast division rate, resulting in a higher number of chloroplasts per cell.

In addition, other studies have revealed that plant treatment with seaweed extract improves the resistance to biotic and abiotic stresses. For example, seaweed extract application has been shown to protect *Arabidopsis thaliana* and grapevine against cold and salt stress. Indeed, in response to seaweed application, the growth of treated plants is maintained under reduced temperature or increased salt concentrations. Moreover, treated plants present reduced tissue damages and show accelerated recovery after temperature and salinity return to normal conditions (Mancuso *et al.*, 2006; Rayirath *et al.*, 2009). According to these authors, the presence of protecting molecules in seaweed extract, such as betaines or cytokinin-like compounds, is probably involved in the improvement of plant protection against abiotic stresses. Regarding biotic stresses, studies have reported the improvement of protection of *Nicotiana tabacum* (Mercier *et al.*, 2001), *Medicago truncatula* (Cluzet *et al.*, 2004) and *Daucus carota* (Jayaraj *et al.*, 2008) against fungal pathogens. These authors suggest that protection of plants against pathogens is due to the presence of oligo-polysaccharides in the seaweed extract (glucans, carrageenans, laminarins and alginates among others) that can act as elicitors to induce the expression of defense genes (such as genes encoding Pathogenesis-Related (PR) proteins) prior to the pathogen infection and thus trigger more efficient plant defenses reactions. Moreover, Khan *et al.* (2009) suggested that

chelated metals present in the extracts could have a repelling effect on nematodes and bacteria.

Focusing more on plants metabolism, Mancuso *et al.* (2006) showed that application of seaweed extract on grapevine increased the leaf accumulation of N, P, K, Mg and Zn with a particular increase in K^+ and Ca^{2+} influx into stomatal cells. Rathore *et al.* (2009) also showed an accumulation of N, P, K and S in the seeds of treated soybean. Durand *et al.* (2003) and Merigout (2006), focusing on N metabolism, reported that application of algae extract on *Arabidopsis thaliana* (by foliar spraying or addition in the growth medium) enhanced nitrate content and nitrate reductase activity in leaves. In the case of increased yield and dry weight, authors suggest that the effect of seaweed on nutrients metabolism may be due to the phytohormones content in the extracts. Therefore, the beneficial effect of seaweed extract application to plants seems to be the result of many components (phytohormones, betains, polymers, nutrients...) that may work synergistically. However, only a few studies have focused on metabolic targets in the interaction of seaweed extracts and plants.

Winter oilseed rape (WOSR, *Brassica napus* L.) is an important agricultural crop cultivated for its oil, which can be used as an edible product or for industrial application (animal nutrition, cosmetics, diester production...). WOSR can be used as a catch crop to reduce N leaching during the autumn-winter period because of its high capacity to take up nitrate from soil (Lainé *et al.*, 1993). However oilseed rape shows a low Nitrogen Use Efficiency (NUE, defined by the ratio of seed N content to total plant N content) especially due to the default in leaf N mobilization (Etienne *et al.*, 2007; Desclos *et al.*, 2008) during the vegetative stage. As a consequence, N remaining in fallen leaves is a loss for dry matter production but also increases the risk of nitrate leaching following the mineralization of leaf organic N. Indeed, the fall of WOSR leaves with high N content (up to 2% of the dry matter, Malagoli *et al.*, 2005a) leads to a return of N to the soil that can reach 100 kg N ha^{-1} (Dejoux *et al.*, 2000). Due to this low NUE, oilseed rape requires excessive N fertilization to maintain high N content of harvested tissues. Whatever the rate of N fertilization, the oilseed rape N Harvest Index (NHI) is low (approximately 70%, Dreccer *et al.*, 2000) compared with cereals. This has led to a defective agro-environmental balance that might be improved by triggering an increased nutrient use efficiency (especially N) in oilseed rape by the addition of biostimulants. Thus, the aim of the present study was to identify new seaweed extracts that

Table IV.I-1 : Elemental nutrient composition of seaweed extract AZAL5 (†: determination by difference)

element	concentration (ppm)	element	concentration (%)
Ca	572	C	1.79
Cu	6	H	9.89
Fe	20	N	0
K	4442	O	87.3 †
Mg	616		
Na	2078		
P	78		
S	1782		
Si	18		
Zn	1.2		

Table IV.I-2 : Hormonal composition of seaweed extract AZAL5. Contents are expressed in pmol.g⁻¹. Phytohormones measured were auxin (IAA), abscisic acid (ABA) and cytokinins (Z: Zeatin, DHZ: dihydrozeatin, tZR: trans-zeatin, cZR: cis-zeatin, DHZR: dihydrozeatin riboside, iP: isopentenyladenine, iPR: isopentenyladenosine, BAR: benzyladenine riboside, mT: meta-topolin, mTR: meta-topolin riboside, oT: ortho topolin, oTR: ortho-topolin riboside). NC : Not detected.

phytohormone	IAA	ABA	Z	DHZ	tZR	cZR	DHZR
content	7,53	17,63	NC	NC	NC	NC	NC

phytohormone	iP	iPR	BAR	mT	mTR	oT	oTR
content	16,11	0,46	NC	NC	NC	NC	NC

could increase the mineral nutrition and growth of WOSR so as to reduce the dose of fertilizer currently used.

In a first step, we have screened five seaweed extracts from brown algae *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis and *Fucus serratus* Linnaeus obtained from different extraction processes, for their effects on rapeseed. For this initial screening, easily and rapidly measurable parameters chosen from the literature have been used, such as improvement of dry weight production (roots and/or shoots), chlorophyll content or improvement of Nitrogen Use Efficiency. Thus, one extract presenting a positive effect on dry weight, chlorophyll content and/or NUE was found as potentially interesting for the following study. At the end of this basic screening, only one extract from *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis -named AZAL5- led to significantly higher dry weight and chlorophyll content of rapeseed after 30 days of supply to the roots. In order to better understand the AZAL5 effects on WOSR growth, a fine characterization (elementary and hormonal composition) of this seaweed extract has been performed and coupled with transcriptomic (microarray), physiological, biochemical and light and electron microscopic analyses. This approach allowed the identification of specific genes or groups of genes that were up- or down-regulated when WOSR was treated with AZAL5. Furthermore, and to the best of our knowledge, this study is one of the pioneer works that has used a specific *Brassica napus* microarray associated with a physiological approach to identify the main metabolic pathways induced by seaweed extract.

I.2 Results

I.2.1 Seaweed extract (AZAL5) characterization

Except for C, H and O, which are the main components (1.7, 9.8 and 87.3% respectively), AZAL5 extract principally contains Ca, K, Mg, Na and S. Surprisingly, this seaweed extract did not contain significant N (Table IV.I-1).

Moreover, hormone analysis (Table IV.I-2) shows only very small amount of auxin, abscissic acid and cytokinins (especially iP and iPR). However, these concentrations (between 17.63 pmol.g⁻¹ for ABA and 0.46 pmol.g⁻¹ for iPR) are too low to have any physiological signification.

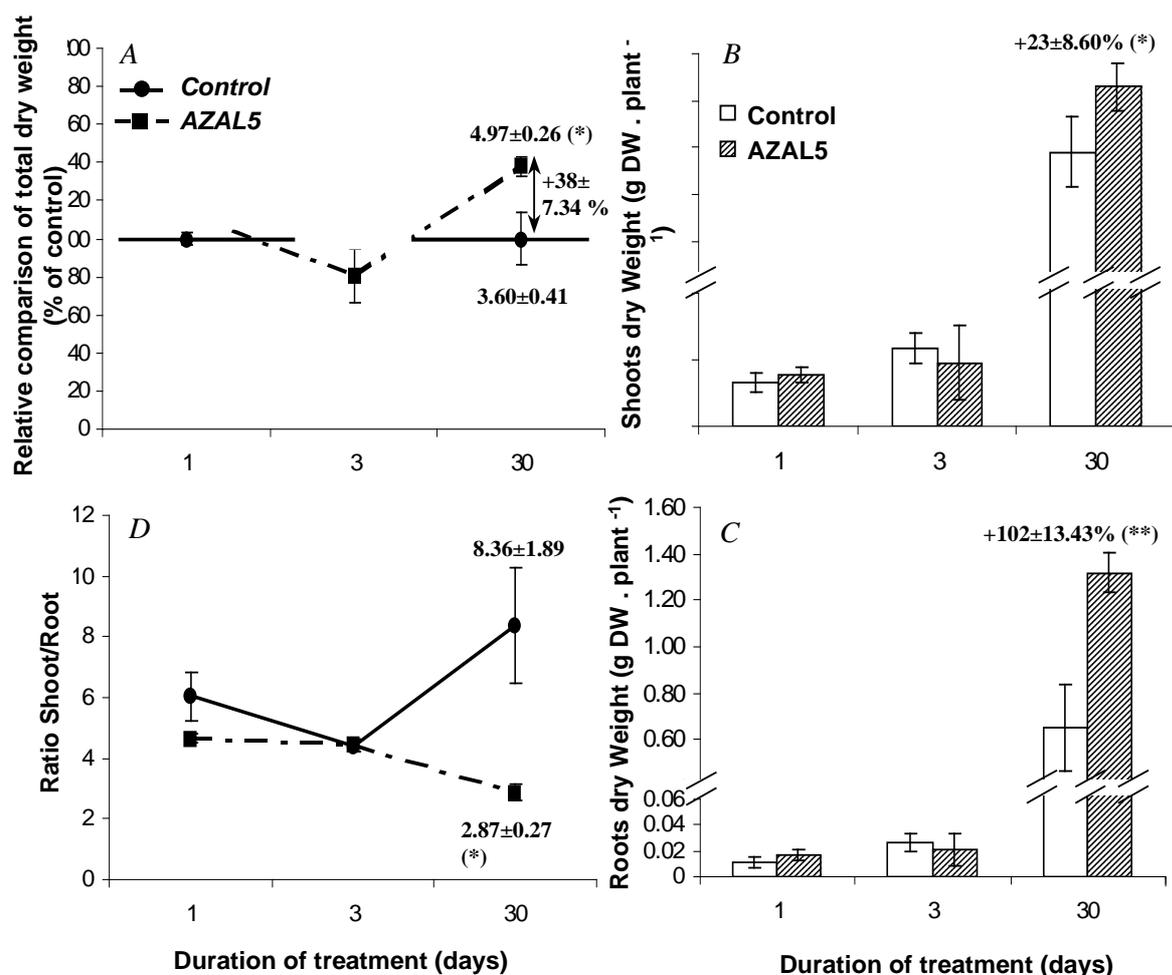


Figure IV.I-1 : Effect of seaweed extract on rapeseed dry weight (DW) after 1, 3 or 30 days of treatment. **A.** Relative comparison of total dry weight of treated plants (squares and dotted line) with control (circles and continuous line), in the percentage of control plants. Values near the points are the total DW expressed in g. **B.** Shoot DW of control (white histogram) and treated plants (hatched histogram), expressed in g.plant⁻¹. **C.** Root DW of control (white histogram) and treated plants (hatched histogram), expressed in g.plant⁻¹. **D.** Shoot/root ratio of control (circles and continuous line) and treated plants (squares and dotted line). Values are means and vertical bars indicate \pm standard deviation for n=10 when exceeding the symbol. Significant differences at P<0.05 and P<0.01 are indicated by one and two asterisks, respectively.

Table IV.I-3 : Nutrient composition of Hoagland solution and AZAL5 contribution to the nutrient supply. Total uptake for each nutrient over 30 days are shown resulting from the nutrient solution (control) or from the nutrient solution and AZAL5 supply (treated).

element	Content in Hoagland solution (mg)	AZAL5 contribution (mg)	Control plant uptake (%)	AZAL5 treated plant uptake (%)
Ca	10000	114.40	7.65	12.56
Cu	10	1.20	3.60	8.04
Fe	1600	4.00	1.16	1.68
K	12200	888.40	9.28	14.52
Mg	2500	123.20	5.47	9.06
N	3498	0	39.62	65.35
Na	1606	415.60	0.43	0.56
P	2860	15.60	6.80	10.14
S	4440	356.40	7.82	12.87
Si	154	3.60	2.57	5.48
Zn	48	0.24	3.38	4.48

I.2.2 Growth analysis

In order to determine the impact of AZAL5 on plant growth, the relative total dry weight (DW, in percentage of control plant dry weight) has been monitored after 1, 3 and 30 days of treatment (Fig IV.I-1A). The addition of 0.1% (v/v) of AZAL5 seaweed extract in the root growth medium did not affect significantly the total DW of rapeseed after 1d or 3d of treatment. Indeed, the total DW of control plants was 0.30 ± 0.03 g and 0.57 ± 0.02 g.plant⁻¹ after 1 and 3 days, respectively, *versus* 0.37 ± 0.01 g and 0.57 ± 0.02 g.plant⁻¹ for treated plants at the same time of harvest. However, after 30 days, plants treated with AZAL5 showed a significant increase in total DW ($+38 \pm 7.34\%$) compared to control plants (3.60 ± 0.41 g.plant⁻¹ for control *versus* 4.97 ± 0.26 g.plant⁻¹ for treated plant). As shown in figs. IV.I-1B and C, this increase in total DW could be explained by a significantly increased shoot DW ($+23 \pm 8.60\%$ compared to control, Fig. IV.I-1B) and more particularly by a high increase in root DW ($+102 \pm 13.43\%$ compared to control, Fig. IV.I-1C) after 30 days of treatment by AZAL5. At day 30, this higher DW in roots than shoots ($+23 \pm 8.60\%$ DW) resulted in a lower shoot/root ratio for treated plants compared to control plants (8.36 ± 1.89 and 2.87 ± 0.27 in control and treated plants, respectively (Fig. IV.I-1D)).

From these results, it can be hypothesized that supplemental mineral nutrients provided by the addition of AZAL5 are responsible for the enhanced dry weight of treated rapeseed. However, when the nutrient composition of the solutions was analyzed (Table IV.I-3), it appears that AZAL5's contribution to the mineral supply of Hoagland solution was negligible (from $+0.25\%$ for Fe to $+12\%$ for Cu, with a notable contribution of Na: $+25\%$). Furthermore, regarding plant nutrient uptake by both control and treated plants (Table IV.I-3) whichever nutrient was considered, the fraction taken up by the plants was always lower than 15% of the total nutrient supply. Thus, even in the controls, plants were not exposed to any limiting conditions and the increase in dry weight for treated rapeseeds did not result from the amelioration of any kind of starvation. However, it is evident that although the percentage value of nutrients taken up by plants was low, it was always higher for treated plants than for control plants. This suggests that AZAL5 stimulated uptake and/or assimilation of these nutrients.

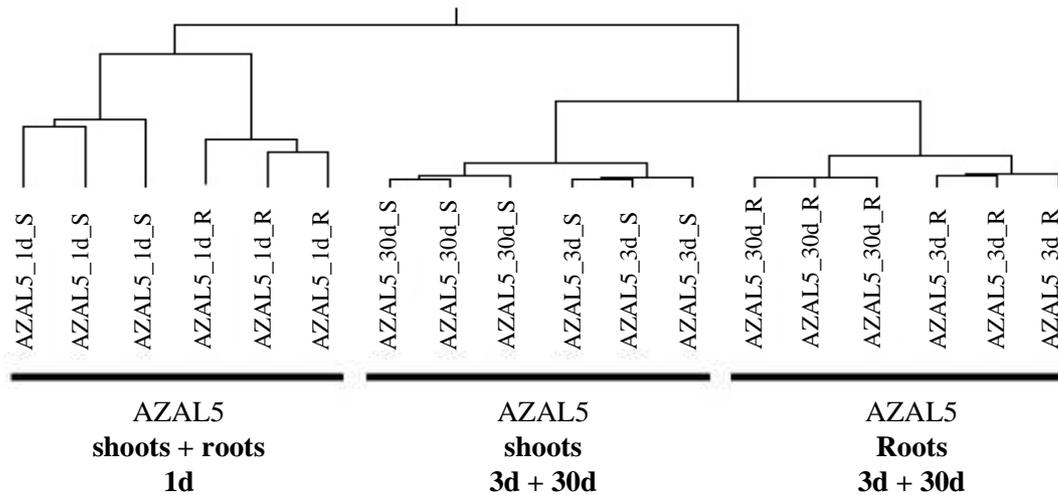


Figure IV.I-2 : Hierarchical clustering of microarray profiles. Profiles with the same name indicate the three experimental replicates for each time (1 day (d), 3 days and 30 days) of treatment with AZAL5 extract. Bold bars represent expression groups logically defined by the clustering.

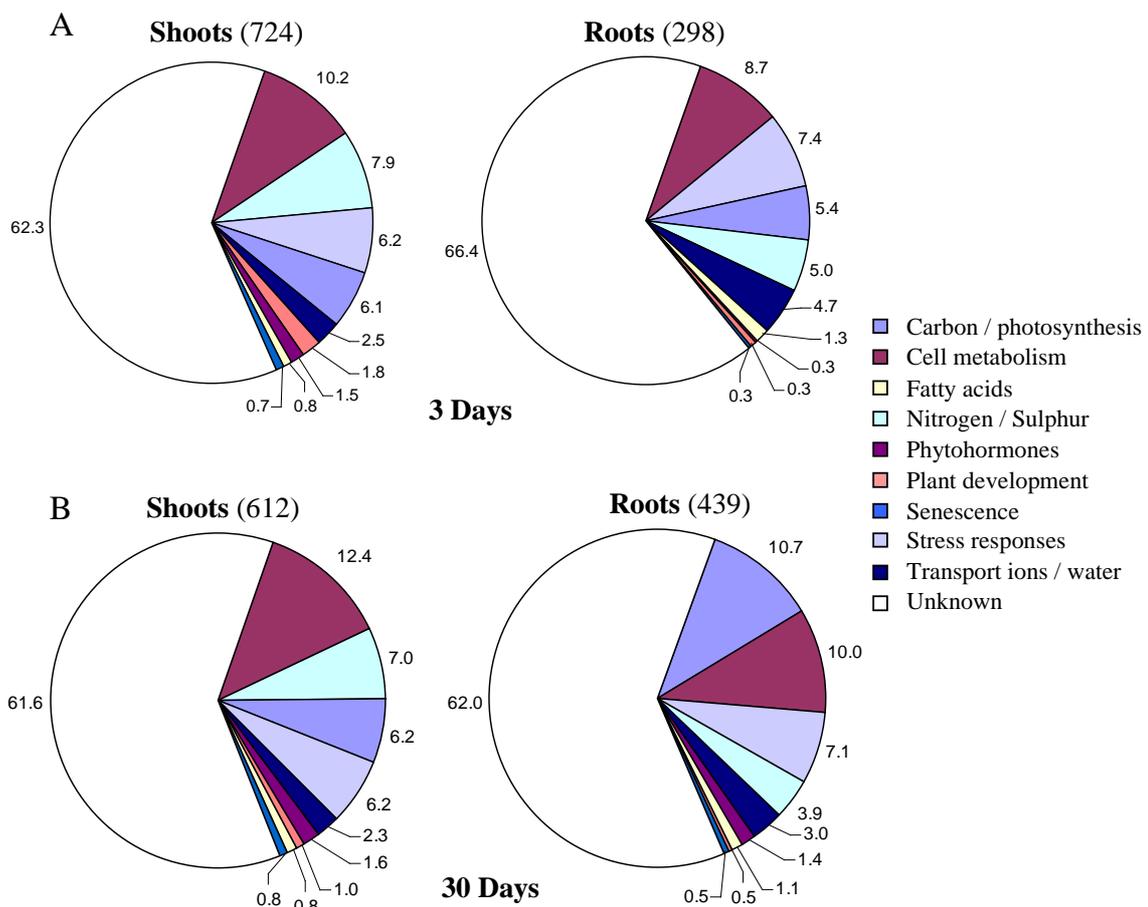


Figure IV.I-3 : Distribution among metabolic pathways (according to DFCI annotation) of genes differentially expressed in Brassica napus roots and shoots after 3 days (A) or 30 days (B) of treatment with AZAL5. Numbers in parenthesis indicate the total number of genes differentially expressed in each conditions (each time of treatment and each part of the plant, $P < 0.05$). Numbers near pie charts indicate the percentage of differentially expressed genes implicated in each metabolic pathway.

I.2.3 Microarray data

Microarray analysis was performed with 3 replicates for each of the plant tissues (roots or shoots) and for each of the harvest times (1, 3 and 30 days). A total of 31 561 genes were analyzed on the microarray, creating an expression profile for each plant tissue and each time of treatment. Hierarchical clustering of these expressions profiles (Fig. IV.I-2) shows that the 3 replicate profiles of each date x treatment were very close. The analysis of significantly and differentially expressed genes between control and treated plants was undertaken using a minimal fold change of expression of 5 (p-value <0.05). Using this filter, no differentially expressed genes were found in shoots and roots after 1d of treatment with AZAL5. After 3 days of treatment with AZAL5, microarray analysis revealed that 724 and 298 genes were differentially expressed in shoots and roots, respectively (Fig. IV.I-3A). Moreover, after 30 days of AZAL5 treatment (Fig. IV.I-3B) it was shown that 612 and 439 genes were differentially expressed in shoots and roots of plants respectively.

All differentially expressed genes have been classified in metabolic pathways according to DFCI annotations (<http://compbio.dfci.harvard.edu>, Fig. IV.I-3). From this global classification, at first sight, it appears that about 60% of differentially expressed genes did not have a known function (supplemental data, Tables S1 and S2). However, the DFCI classification revealed that several metabolic pathways were affected by AZAL5 treatment (Fig. IV.I-3A and B). Among these, some metabolic pathways (such as fatty acids, phytohormones, senescence, plant development and ion transports) were represented in low numbers among the genes that were differentially expressed. In contrast, four metabolic pathways were more specifically affected in shoots and roots by the treatment (Fig. IV.I-3A and B): general cell metabolism (10.3% of the total differentially expressed genes on average), carbon metabolism and photosynthesis (7.1% on average), stress responses (6.7% on average) and nitrogen and sulfur metabolism (5.9% on average). Thus, according to our initial aim which was to target an improvement in nutrient use efficiencies (such as N and S) of WOSR following seaweed treatment, this study focused on N, S and C metabolisms (especially photosynthesis). Accordingly, non-exhaustive lists of genes involved in these metabolisms and differentially expressed after 3 and 30 days of contact with AZAL5 are detailed in Tables IV.I-4 and IV.I-5 for shoots and roots respectively.

Table IV.I-4 : Partial list of differentially expressed shoot genes involved in photosynthesis and nitrogen and sulfur metabolism after 3 or 30 days of treatment with AZAL5 extract. The first two letters of the gene description indicate the species. (Al: Arabidopsis lyrata, At: Arabidopsis thaliana, Bc: Brassica campestris, Bj: Brassica juncea, Bn: Brassica napus, Bo: Brassica oleracea, Br: Brassica rapa, Bu: Bauhinia ugulata, Ca: Capsicum annuum, Cp: Citrus paradisi, Gt: Guillardia theta, Mc: Mesembryanthemum crystallinum, Nt: Nicotiana tabacum, St: Solanum tuberosum, Th: Thellungiella halophila). Positive fold change indicates that the gene is specifically over-expressed in response to seaweed extract (orange boxes); negative fold change indicates that the gene is specifically repressed in response to seaweed extract (green boxes). Boxes marked with "-" (gray boxes) indicate genes with expression levels that are not significantly different from control. P-values are Bonferroni-corrected. Genes were considered as differentially expressed at a p-value <0.05.

pathway	Accession Number	Description	Shoots 3d		Shoots 30d	
			Corrected p-value	Fold change	Corrected p-value	Fold change
photosynthesis	NP174327	At - Carbonic anhydrase 1, chloroplast precursor	0.007	5.666	0.012	5.507
	AY433944	Br - Early Light-Inducible Protein (ELIP)	0.007	8.790	0.009	6.905
	CP002684	At - Ferredoxin-2, chloroplast precursor	0.009	6.184	0.011	7.917
	DQ244819	At - Ferredoxin-2, chloroplast precursor	0.008	6.958	0.008	7.863
	AJ312190	At - Ferritin-3, chloroplast precursor	0.007	6.814	0.010	7.299
	NM123450	At - S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methyltransferase	0.007	6.706	0.009	5.207
	NM104609	At - Glutaryl-tRNA reductase 1, chloroplast precursor	0.013	6.074	-	-
	AC189413	Gt - Photosystem II reaction center protein Z	0.010	5.809	-	-
	CP002688	At - Pyridoxal biosynthesis protein PDX1.3	-	-	0.012	5.032
	NM100952	At - Alpha-glucan water dikinase 1, chloroplast precursor	0.007	-29.094	0.011	-19.076
	AF458411	At - Chaperone protein dnaJ 8, chloroplast precursor	0.012	-5.118	0.009	-6.155
	GR444715	At - Chlorophyllase	0.007	-5.914	0.015	-7.253
	AJ635427	At - Phosphoglucan, water dikinase, chloroplast precursor	0.012	-11.756	0.025	-10.951
	DQ118104	Bn - Plastid division regulator MinE	0.010	-51.566	0.022	-26.060
	NM118879	At - Protochlorophyllide reductase B, chloroplast precursor	0.007	-6.188	0.009	-9.892
	AY699948	Ca - Stay green protein (sgr)	0.016	-13.480	0.027	-6.204
	NM129396	At - Alanine-glyoxylate aminotransferase 2 homolog 2	0.010	-11.735	-	-
	NM120081	At - Glucose-1-phosphate adenyltransferase large subunit 3	0.008	-6.202	-	-
	NM100952	At - Alpha-glucan water dikinase 1, chloroplast precursor	-	-	0.017	-6.916
	AF458411	At - Chaperone protein dnaJ 8, chloroplast precursor	-	-	0.010	-5.452
AF337544	Bo - Chlorophyllase 1	-	-	0.017	-5.872	
NM100115	At - Long hypocotyl in far-red 1 (HFR1)	-	-	0.013	-122.894	
AB456972	Al - Phytochrome B	-	-	0.015	-18.605	
nitrogen metabolism	NM100380	At - 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1	0.008	6.195	0.008	5.635
	NM121798	Mc - 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	0.008	25.834	0.040	20.595
	AY128334	At - Anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase-like protein	0.017	8.634	0.016	11.211
	NP195197	Bn - Arginine decarboxylase 2	0.005	15.447	0.020	6.446
	ES912832	Bn - Asparaginase	0.010	5.832	0.047	7.636
	FJ830448	Bn - Epithiospecific modifier (ESM)	0.012	9.538	0.016	11.750
	NM127123	At - Ferredoxin-nitrite reductase NiR1	0.025	12.794	0.011	12.576
	NP181221	Bn - gamma tonoplast intrinsic protein	0.007	5.970	0.011	6.465
	NM111956	At - GDSL-motif lipase/hydrolase-like protein	0.007	5.805	0.014	5.756
	XM002872757	Al - N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase-like protein	0.014	14.758	0.019	7.090
	D38220	Bn - Nitrate reductase	0.013	32.908	0.010	8.385
	NM179668	At - Tyrosine decarboxylase 1	0.024	18.593	0.014	19.571
	NM127071	At - 3-ketoacyl-CoA synthase 8	0.014	7.361	-	-
	NM118831	At - Aconitate hydratase 2 (ACO2)	0.013	7.801	-	-
	AY337608	Bj - Arginine decarboxylase	0.032	8.508	-	-
	NM180941	At - Asparagine synthetase (ASN2)	0.007	9.573	-	-
	DY022560	Bn - Aspartate kinase	0.007	6.059	-	-
	DQ485132	Bn - Cinnamate 4-hydroxylase isoform 2 (C4H)	0.008	5.354	-	-
	NM113299	At - Dihydroxy-acid dehydratase	0.008	5.851	-	-
	NM114620	At - Malate dehydrogenase chloroplast precursor	0.007	5.009	-	-
	NM111869	At - Phenylalanine ammonia-lyase 4	0.008	5.339	-	-
	DQ341308	Bn - Phenylalanine ammonia-lyase (PAL1-1)	0.007	5.192	-	-
	CN729283	At - cysteine proteinase	-	-	0.019	5.027
	NM121480	At - L-aspartate oxidase-like protein	-	-	0.011	9.487
	NM202733	At - Strictosidine synthase	-	-	0.010	6.511
	NP194437	At - Tryptophan synthase beta subunit (TSB2)	-	-	0.010	5.202
	NP566700	At - 4-Aminobutyrate transaminase	0.007	-6.688	0.010	-5.147
	NP001078093	At - Adenosylmethionine decarboxylase	0.047	-7.921	0.012	-6.539
	NM120900	At - Agmatine deiminase	0.007	-8.094	0.010	-6.261
	X77260	Bn - Aspartic protease	0.008	-6.701	0.007	-7.894
	AM501059	St - Aspartic protease-like	0.009	-6.558	0.008	-5.851
	BT000269	At - Branched-chain alpha keto-acid dehydrogenase E1 alpha subunit	0.012	-10.398	0.022	-10.971
	AF454959	At - Cysteine proteinase RD19A	0.007	-13.209	0.008	-10.448
XP002883348	Al - gamma-aminobutyrate transaminase subunit precursor	0.007	-6.378	0.009	-5.160	
AK317177	At - Glyoxalase I protein family	0.009	-24.760	0.028	-12.288	
AF089848	Bn - Senescence-specific cysteine protease	0.008	-94.345	0.009	-73.099	

Table IV.I-4 (continued)

pathway	Accession Number	Description	Shoots 3d		Shoots 30d	
			Corrected p-value	Fold change	Corrected p-value	Fold change
nitrogen metabolism	NM100380	At - 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1	0.021	-5.641	-	-
	NM119749	At - Aconitate hydratase 1 (ACO1)	0.007	-5.670	-	-
	EE567694	Bn - Calmodulin	0.008	-5.092	-	-
	NM119466	At - Coclaurine N-methyltransferase	0.010	-6.678	-	-
	U51119	Bc - Cysteine proteinase inhibitor	0.012	-5.257	-	-
	NP188895	At - GCN5-Related N-acetyltransferase protein family	0.025	-6.925	-	-
	NM129089	At - Glycine cleavage system H protein 1	0.008	-6.671	-	-
	NM127548	At - Malic enzyme	0.026	-5.671	-	-
	NM117360	At - Serine carboxypeptidase-like 20 precursor	0.007	-5.194	-	-
	EV093737	At - 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1	-	-	0.037	-6.259
	AF314811	Bn - Delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase A	-	-	0.015	-6.784
sulfur metabolism	NM120157	At - Adenylylsulfate kinase	0.009	8.627	0.008	8.572
	U68218	Bn- ATP sulfurylase (LSC680)	0.008	12.058	0.009	8.099
	EU346738	Bo - ATP sulphurylase 1 precursor (ATPS1)	0.007	10.864	0.012	7.215
	AJ223499	Bj - ATP sulfurylase precursor	0.008	11.366	0.013	7.327
	AY097392	Bj - Glutathion S-transferase 1	0.019	5.376	0.017	7.819
	DQ091257	Bn - Putative low affinity sulfate transporter	0.007	10.448	0.013	9.670
	NM111114	At - S-adenosylmethionine decarboxylase	0.007	8.569	0.012	6.419
	HM013966	Bn - S-adenosylmethionine decarboxylase	0.009	11.527	0.016	6.223
	U63734	At - S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III	0.007	8.389	0.010	6.318
	AJ416461	Bn - Sulfate transporter (stp1 gene)	0.008	8.363	0.015	5.767
	NM104662	At - Glutathione S-transferase TAU16 (GSTU16)	0.009	5.202	-	-
	NP187918	At - Serine acetyltransferase (SERAT2.2)	0.007	6.843	-	-
	NM118383	At - Adenine phosphoribosyltransferase -like protein	-	-	0.012	8.499
	EV118979	At - Glutathione S-transferase	-	-	0.017	7.819
	AF304430	Bn - Thiohydroximate S-glucosyltransferase	-	-	0.008	5.159
	DQ059298	Bo - Epithiospecifier protein	0.008	-54.721	0.008	-30.526
NM118319	At - Autophagy related protein 8A(APG8A)	0.017	-6.414	-	-	
FJ357244	Th - Glutathione peroxidase 6 (GPX6)	0.008	-5.287	-	-	

Table IV.I-5 : Partial list of differentially expressed root genes involved in photosynthesis and nitrogen and sulfur metabolism after 3 or 30 days of treatment with AZAL5 extract. The first two letters of the gene description indicates the species. (Al: Arabidopsis lyrata, At: Arabidopsis thaliana, Bc: Brassica campestris, Bj: Brassica juncea, Bn: Brassica napus, Bo: Brassica oleracea, Br: Brassica rapa, Bu: Bauhinia ugulata, Ca: Capsicum annuum, Cp: Citrus paradisi, Gt: Guillardia theta, Mc: Mesembryanthemum crystallinum, Nt: Nicotiana tabacum, St: Solanum tuberosum, Th: Thellungiella halophila). Positive fold change indicates that the gene is specifically over-expressed in response to seaweed extract (orange boxes); negative fold change indicates that the gene is specifically repressed in response to seaweed extract (green boxes). Boxes marked with "-" (gray boxes) indicate genes with expression levels that are not significantly different from control. P-values are Bonferroni-corrected. Genes were considered as differentially expressed at a p-value <0.05.

pathway	Genbank Accession	Description	Roots 3d		Roots 30d	
			Corrected p-value	Fold change	Corrected p-value	Fold change
Photosynthesis	AY433944	Br - Early Light Inducible Protein (ELIP)	0.011	20.081	0.012	18.678
	CP002684	At - Ferredoxin-2, chloroplast precursor	0.016	8.113	0.013	14.416
	DQ244819	At - Ferredoxin-2, chloroplast precursor	0.021	8.321	0.017	15.319
	AC189413	Gt - Photosystem II reaction center protein Z	0.011	5.518	0.013	5.380
	GQ200740	At - Phytoene synthase, chloroplast precursor	0.046	6.244	0.022	6.184
	EF011647	Th - Glucose 6-Pi/Pi transporter	0.014	10.221	-	-
	NP174327	At - carbonic anhydrase 1	-	-	0.010	5.151
	L31936	Bc - Chloroplast photosystem II 10 kDa polypeptide	-	-	0.018	6.423
	NM178694	At - Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit, chloroplast precursor	-	-	0.032	6.426
	AB333800	At - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplast precursor	-	-	0.037	6.397
	NM102871	At - Photosystem I reaction center subunit III (PSAF)	-	-	0.023	5.075
	AJ245630	At - Photosystem I reaction center subunit V	-	-	0.026	7.187
	U92504	Br - Photosystem I reaction center subunit VI	-	-	0.031	5.452
	NM104102	Br - Photosystem I reaction center subunit VI	-	-	0.036	5.014
	DQ296179	At - Photosystem I reaction center subunit psaK	-	-	0.014	6.474
	DQ296179	At - Photosystem I reaction center subunit psaK	-	-	0.021	6.226
	DQ296179	At - Photosystem I reaction center subunit psaK	-	-	0.025	5.403
	DQ245799	Bc - Photosystem II 10 kDa polypeptide, chloroplast precursor	-	-	0.043	5.496
	L31936	Bc - Photosystem II 10kDa polypeptide	-	-	0.018	6.368
	NM111021	Nt - Phosphate/phosphoenolpyruvate translocator	-	-	0.048	5.217
	NM102940	Ta - Phosphoribulokinase, chloroplast precursor	-	-	0.013	27.104
	AF326879	At - Plastocyanin major isoform, chloroplast precursor	-	-	0.036	20.861
	AY07103	At - PSI type III chlorophyll a/b-binding protein	-	-	0.026	7.651
	BT000613	At - Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase	-	-	0.035	7.398
	NM100952	At - Alpha-glucan water dikinase 1, chloroplast precursor	0.012	-6.987	0.019	-6.566
	DQ118104	Bn - Plastid division regulator MinE	0.039	-18.782	0.028	-35.693
NM124082	At - Chlorophyll A-B binding protein family (lii3)	-	-	0.013	-5.957	
NM119135	At - Choline monooxygenase, chloroplast precursor	-	-	0.021	-15.831	
NM113585	Bc - Light regulated protein-like protein	-	-	0.045	-7.913	
NM101688	At - Nudix hydrolase homolog (NUDT4)	-	-	0.018	-5.788	
nitrogen metabolism	NP181221	Bn - gamma Tonoplast intrinsic protein	0.014	8.038	0.015	6.710
	NM121822	At - Glutamate dehydrogenase 1	0.017	8.031	-	-
	AB014076	Bn - Serine decarboxylase	0.020	8.289	-	-
	CN729283	At - cysteine proteinase	-	-	0.027	7.700
	NM105992	Bu -Kunitz family trypsin and protease inhibitor	0.032	-12.815	0.035	-7.164
	ES266717	Cp - Type I proteinase inhibitor-like protein	0.019	-41.481	0.017	-78.478
	NP00107809	At - Adenosylmethionine decarboxylase	0.031	-5.528	-	-
	AK226564	At - Hydroxypyruvate reductase	0.014	-9.231	-	-
	BT000269	At - Branched-chain alpha keto-acid dehydrogenase E1 alpha subunit	-	-	0.021	-5.193
	NM119466	At - Coclaurine N-methyltransferase	-	-	0.016	-5.598
	AF454959	At - Cysteine proteinase RD19A	-	-	0.014	-5.980
AY559319	Bj - Glutamate decarboxylase 4a	-	-	0.015	-5.715	
AK317177	At - Glyoxalase I protein family	-	-	0.017	-9.353	
sulfur metabolism	AF411209	Bn - Glutathione peroxidase	0.044	8.897	0.012	9.529
	AJ311388	Bn - High affinity sulfate transporter (ST2)	0.015	5.722	0.011	4.276
	DQ091257	Bn - Low affinity sulfate transporter	0.010	11.372	0.011	17.035
	NM106018	At - Phosphoethanolamine N-methyltransferase 1	0.012	5.025	-	-
	NP187918	At - Serine acetyltransferase (SERAT2.2)	0.016	9.641	-	-
	AY299479	Bj - Glutathione S-transferase 4 (GSTF4)	0.014	-6.942	0.022	-9.916
	NM105660	At - Glutathion S transferase TAU12 (GSTU12)	0.013	-7.094	0.010	-8.710
	NM104662	At - Glutathion S transferase TAU16 (GSTU16)	0.036	-12.154	0.021	-9.891
NM121231	At - Glutaredoxin-C10	0.021	-9.091	-	-	

In shoots (Table IV.I-4), 62% of genes involved in photosynthetic pathways were down-regulated, most of them being labeled “chloroplast precursor”, such as the gene encoding protochlorophyllide reductase B, an enzyme involved in chlorophyll biosynthesis (Ougham *et al.*, 2001) or the gene encoding a plastid division regulator, AtMinE (Itoh *et al.*, 2001), whose expression was reduced more than 50 fold after 3 days. Others down-regulated genes encoded proteins involved in chlorophyll degradation, such as genes encoding chlorophyllase-1 or stay green protein (Sgr). Otherwise, this microarray analysis also revealed that 38 % of genes involved in photosynthesis were up-regulated, such as genes encoding ferredoxin and photosystem proteins, *i.e.* proteins implicated in the electron transport chain.

Concerning genes involved in N metabolism, Table IV.I-4 reveals that 60% of genes were up-regulated. Among these up-regulated genes were found genes encoding enzymes involved in nitrate assimilation, such as nitrate reductase (+32.908 and +8.385 folds at day 3 and 30, respectively) or genes involved in amino acid metabolism. Among the genes that were down-regulated, some proteases and more specifically a senescence associated cysteine protease were strongly down regulated (Table IV.I-4) by the seaweed extract (-94.345 and -73.099 folds at day 3 and 30, respectively).

For the S metabolic pathway (Table IV.I-4), around 80% of genes were up regulated. Some of these genes encoded proteins involved in sulfate uptake and assimilation, such as sulfate transporters, ATP sulfurylases and serine acetyltransferases. Moreover, seaweed extract induced some genes encoding the Tau and Phi classes of glutathione-S-transferases, plant-specific multifunctional proteins that perform pivotal catalytic and non catalytic functions in normal plant development and stress responses (for review, see Moons, 2005). Otherwise, it can be noted that a low proportion of S metabolism related genes were down regulated: only 20 % and 7% at 3 and 30 days, respectively. Finally, from this microarray analysis, it can be underline that the major part of the genes related to photosynthesis and N and S metabolisms were differentially expressed in shoots from day 3 to day 30.

Microarray analysis of roots (Table IV.I-5) revealed that unlike shoots, most of the genes were differentially expressed only after 30d of treatment. In the photosynthetic pathway, most up-regulated genes (79%) were labeled “Photosystem”, such as those encoding photosystem I reaction center subunits or plastocyanin isoform. In common with shoots, an up regulation of ferredoxin (ferredoxin-2) and a strong down-regulation of gene encoding the

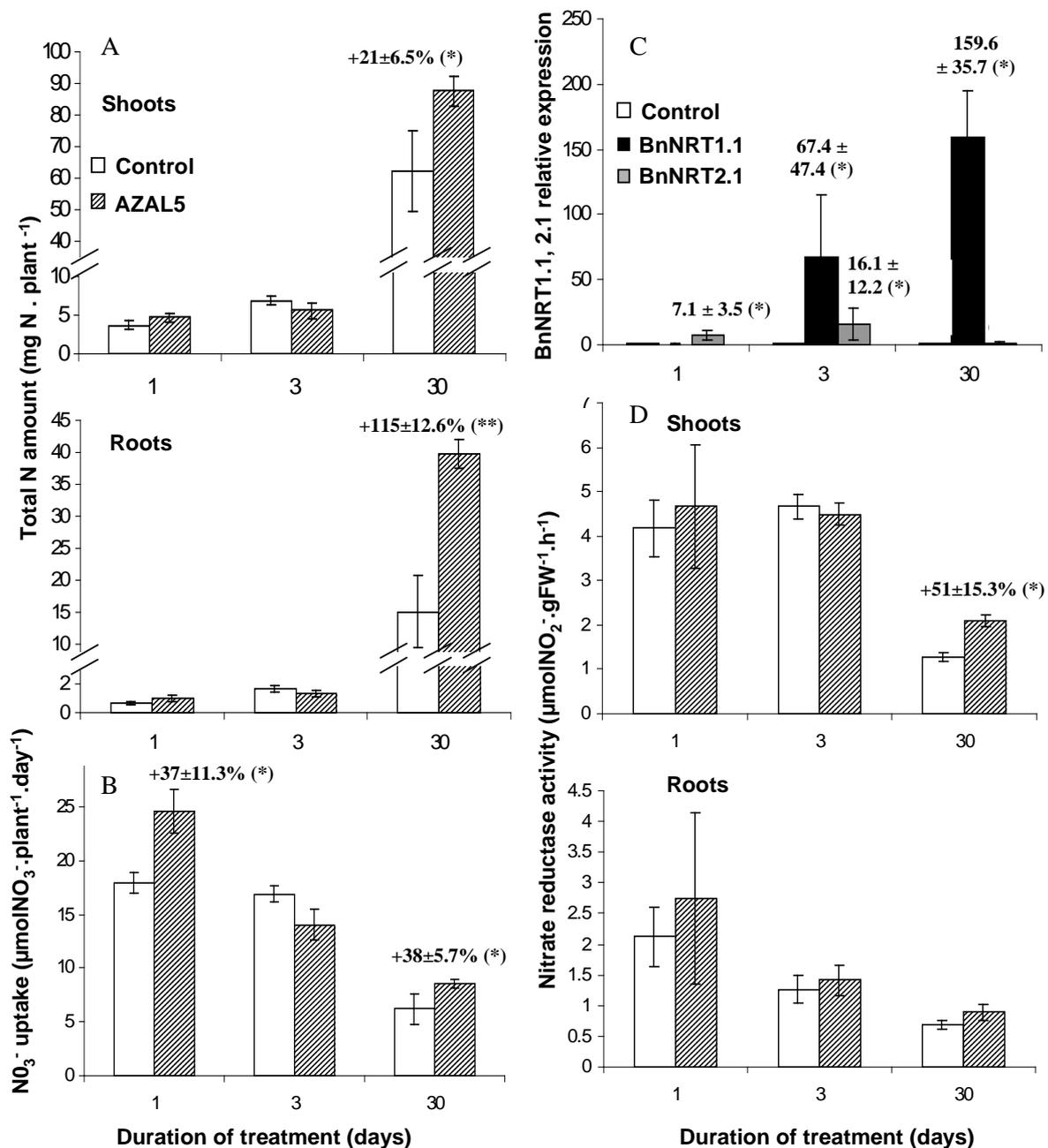


Figure IV.I-4 : Effects of AZAL5 extract on N metabolism. **A.** Total N amount in shoots and roots of control plants (white histogram) or treated plants with AZAL5 (hatched histogram). **B.** Net nitrate uptake. **C.** q-PCR analysis of the expression level of BnNRT1.1 (black histogram) and BnNRT2.1 (gray histogram), two genes encoding root transporters implicated in N uptake. For q-PCR analysis, control (white histogram, value 1) corresponds to the expression level of each gene in control plants at each time of harvest. **D.** In vivo nitrate reductase activity in shoots and roots of control (white histogram) and treated plants (hatched histogram). For all data, indicated values are means and vertical bars indicate ± standard deviation for n=10 when exceeding the symbol. Significant differences at P<0.05 and P<0.01 are indicated by one and two asterisks, respectively.

plastid division regulator AtMinE occurred at 3 and 30 days (-18.782 and -35.693 folds at days 3 and 30, respectively). Moreover, focusing on differentially expressed genes in roots related to N metabolism, there was a substantial down regulation of some genes encoding protease inhibitors at day 3 and 30 and a down-regulation of some cysteine protease RD19 genes only at day 30. Focusing on S metabolism, sulfate transporter genes (high and low affinity sulfate transporters) were up regulated as previously observed in shoots (Table IV.I-4). Moreover, glutathione-S-transferases and serine acetyltransferase genes were down regulated and up regulated, respectively, and mostly at 3 and 30 days.

I.2.4 N metabolism

Microarray analysis highlights the up regulation of genes encoding proteins involved in N metabolism (especially nitrate and amino acids). From these data, physiological and biochemical approaches have been developed to confirm the beneficial effect of seaweed extract on N metabolism of WOSR. Thus, in first instance, the total amount of N in plants treated by seaweed extract has been compared to control plants (Fig. IV.I-4A). Secondly, the effects of seaweed extract on nitrate-uptake (using $^{15}\text{NO}_3^-$, Fig. IV.I-4B), expression of two major nitrate transporters (*BnNRT1.1* and *BnNRT2.1*, Fig. IV.I-4C) and nitrate reductase activity in shoots and roots (Fig. IV.I-4D) were quantified. The total N amount in treated plants (Fig. IV.I-4A) revealed that after 30d, treatment with AZAL5 significantly affected N content in plants. Thus, at day 30, the N contents in shoots and roots of treated plants were significantly higher than control plants ($+21\pm 6.5\%$ and $+115\pm 12.6\%$ in shoots and roots, respectively), suggesting a higher nitrate uptake in response to seaweed treatment. Indeed, compared to control, plants treated by seaweed extract showed an increase in nitrate uptake (Fig. IV.I-4B) at day 1 and day 30 ($+37\pm 11.3\%$ and $+38\pm 5.7\%$, respectively). Because these last two data points were of the same order of magnitude as the increase in DW (Fig. IV.I-1), this suggested that N uptake followed the stimulation of growth. In the meantime (Fig. IV.I-4C), the *BnNRT2.1* expression level was increased by 7.1 ± 3.5 fold in 1-day treated plants and remained over-expressed at day 30 while *BnNRT1.1* expression was more strongly induced later on (67.4 ± 47.4 and 159.6 ± 35.7 fold at 3 and 30 days respectively, Fig. IV.I-4C). Additionally, compared to control plants, nitrate reductase activity (Fig. IV.I-4D) increased significantly in shoots after 30d ($+51\pm 15.3\%$) of treatment but was not affected in roots. However, no nitrate accumulation in shoot or root tissues was detected in plants (data not shown).

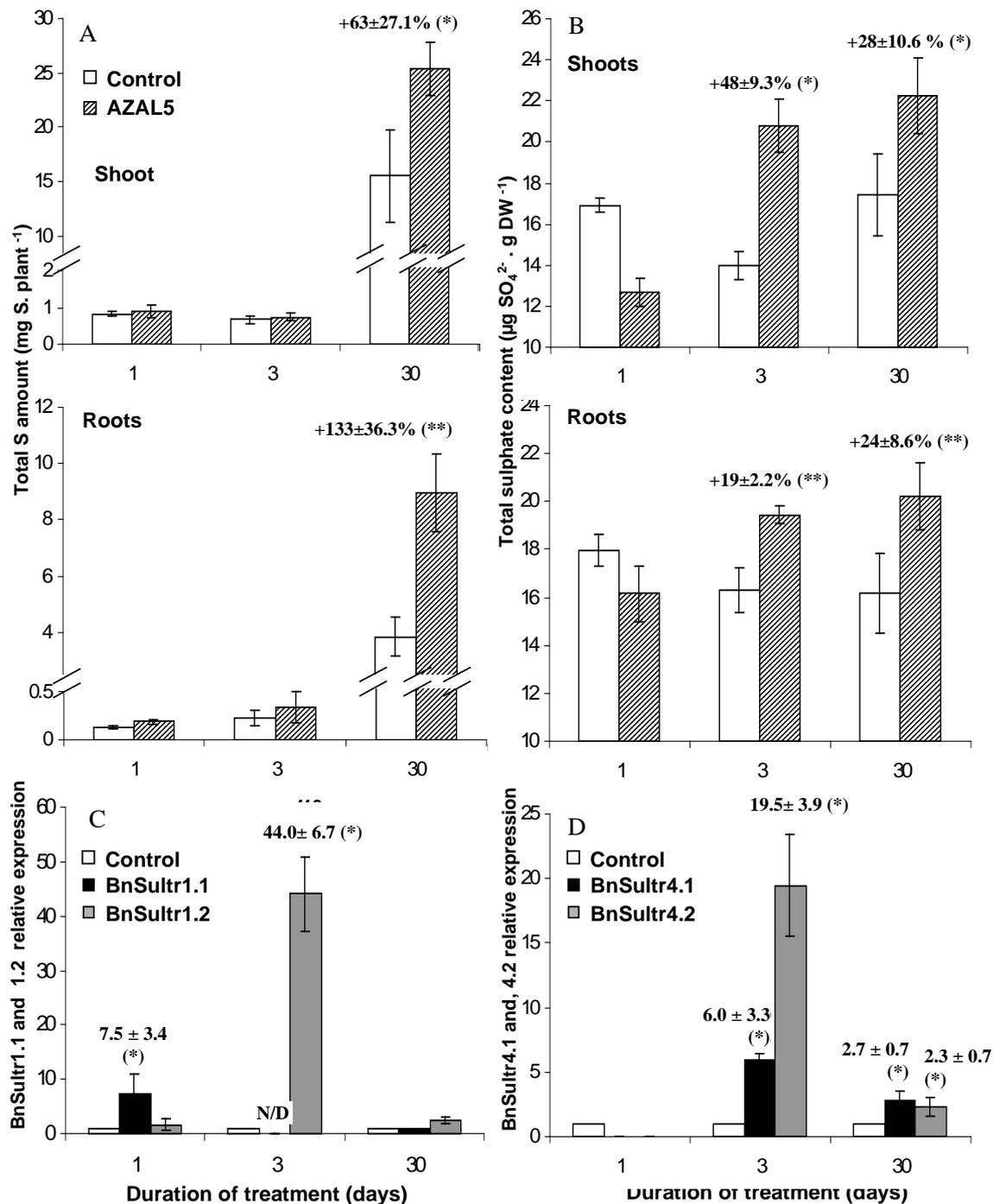


Figure IV.I-5 : Effects of AZAL5 on S metabolism. **A.** Total S amount in the shoots and roots of control plants (white histogram) or treated plants (hatched histogram) with AZAL5. **B.** Total sulfate content in the shoots and roots of plant control or treated with AZAL5. **C.** q-PCR analysis of the expression level of BnSultr1.1 (black histogram) and BnSultr1.2 (gray histogram), two genes encoding transporters involved in S uptake in roots. **D.** q-PCR analysis of the expression level of BnSultr 4.1 (black histogram) and BnSultr4.2 (gray histogram), two genes encoding sulfate transporters involved in sulfate sequestration in shoot vacuoles. For q-PCR analysis, control (white histogram, value 1) correspond to expression level of each gene in control plants at each time of harvest. For all data, indicated values are means and vertical bars indicate \pm standard deviation for n=10 when exceeding the symbol. Significant differences at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ are indicated by one and two asterisks, respectively. N/D : not detected.

I.2.5 S metabolism

Microarray analysis highlighted the up-regulation of genes involved in sulfur uptake and assimilation, then the total amount of S (Fig. IV.I-5A) and the sulfate content (Fig. IV.I-5B) have been quantified in roots and shoots. Moreover, expression levels of sulfate transporters genes such as *BnSultr1.1* and *BnSultr1.2* (plasmalemmic transporters, Fig. IV.I-5C) and *BnSultr4.1* and *BnSultr4.2* (tonoplasmic transporters, Fig. IV.I-5D) were quantified in roots and shoots, respectively. The total S amount in treated plants (Fig. IV.I-5A) showed that treatment with AZAL5 resulted in significantly higher shoot ($+63\pm 27.1\%$) and root ($+133\pm 36.3\%$) S contents after 30 days of treatment. Unlike N, these data had a greater increase in magnitude than DW (Fig. IV.I-1), suggesting a stimulation of sulfate uptake *per se*. (Fig. IV.I-5B). Indeed, the total sulfate content in the plants (Fig. IV.I-5B) showed that treatment with AZAL5 resulted in accumulation of sulfate in shoots ($+48\pm 9.3\%$ and $+28\pm 10.6\%$ at 3 and 30 days respectively) and in roots ($+19\pm 2.2\%$ and $+24\pm 8.6\%$ at 3 and 30 days respectively). In the meantime, compared to control plants, *BnSultr1.1* was up regulated (7.5 ± 3.4 fold) only after 1 day of treatment while *BnSultr1.2* was strongly induced (44 ± 6.7 folds) after 3 days of treatment (Fig IV.I-5C). Subsequently after 30 days, expression levels of both sulfate transporters were similar between treated and control plants. These data suggested an earlier stimulation of sulfate uptake by seaweed extract. Moreover, the expression levels of the *BnSultr4.1* and *BnSultr4.2* genes (Fig. IV.I-5D), which encode tonoplasmic transporters involved in vacuolar fluxes of sulfate, were induced only after 3 and 30 days of treatment (6 ± 3.3 and 2.7 ± 0.7 fold, 19.5 ± 3.9 and 2.3 ± 0.7 fold at 3 and 30 days, respectively).

I.2.6 Photosynthesis

Microarray analysis shows that, compared to control, some genes involved in carbon and photosynthesis pathways were differentially expressed in plants treated by seaweed extract. For example genes encoding the plastid division regulator *AtMinE* or *stay green protein (Srg)* were highly down-regulated in shoots after 3 days, by 51.566 and 13.480 folds respectively, and after 30 days by 26.060 and 9.892 fold, respectively (Table IV.I-4). In contrast, genes like ferredoxin NADP reductase or genes involved in photosystem structure showed an up-regulated profile (Tables IV.I-4 and IV.I-5). To complete this analysis, relative chlorophyll content (Fig. IV.I-6A) and net photosynthetic rate (Fig. IV.I-6B) were measured.

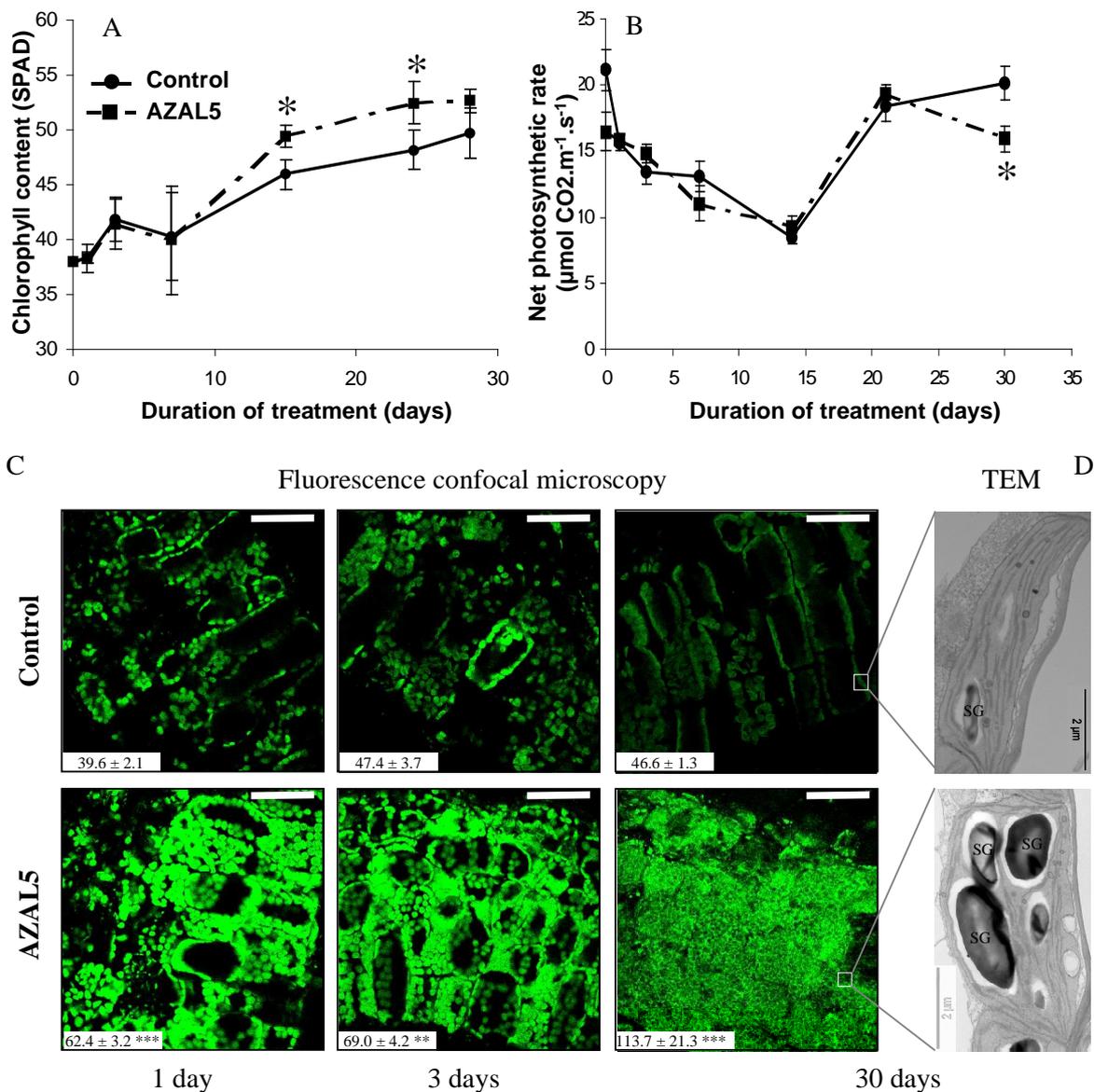


Figure IV.1-6 : Effects of AZAL5 on chloroplasts and photosynthesis. **A.** Chlorophyll content in leaves from control plants (continuous line) or treated plants (dotted line) measured by SPAD. **B.** Kinetics of the net photosynthetic rate from control (continuous line) or treated leaves (dotted line). **C.** Fluorescence confocal microscopy of chloroplasts of control or plants treated with AZAL5 after 1, 3 and 30 days of treatment. Bars represent a scale of 50 μm the images. Numbers of chloroplasts per cell are indicated in the white square and are the means \pm standard deviation for $n=10$ cells. **D.** Transmission Electron Microscope (TEM) observations of chloroplasts from control (top) or from leaves treated by seaweed extract (bottom) over 30 days. Black bars represent a scale of 2 μm . SG: starch granules. For A and B, results are means \pm standard deviation for $n=5$ leaves with 10 measurements per leaf. Asterisks represent the result of the Student's test at $p<0.05$ for *, $p<0.01$ for ** and $p<0.001$ for ***.

At days 15 and 21, plants treated with AZAL5 showed around an 8% increase in chlorophyll relative content compared with control ($+7.8\pm 2.1\%$ at 15 days and $+8.9\pm 4.0\%$ at 21 days). On the other hand, only one significant difference was found after 30 days of treatment for the net photosynthetic rate ($-22\pm 2.2\%$ for AZAL5-treated plants). Therefore microarray analysis, chlorophyll content and net photosynthetic rate seems to give contradictory results. Thus, confocal microscopy was used to observe chloroplast numbers in mature leaf cells from treated or control plants (Fig. IV.I-6C). At any time, AZAL5 application significantly increased the number of chloroplasts per cell. Indeed, in cells from control plants, the number of chloroplasts was relatively constant during the experiment (39.6 ± 2.1 , 47.4 ± 3.7 and 46.6 ± 1.3 at 1, 3 and 30 days, respectively). In leaf cells from treated plants, whatever the duration of treatment, the number of chloroplast was always higher than controls (62.4 ± 3.2 , 69.0 ± 4.2 and 113.7 ± 21.3 at 1, 3 and 30 days, respectively) suggesting a very early stimulation of the chloroplast division process in response to seaweeds extract. In order to estimate the potential seaweed effect on chloroplastic ultrastructure, transmission electronic microscopy (TEM) was performed after 30 days of treatment (Fig. IV.I-6D). Comparing ultrastructure of chloroplasts from control plants, TEM showed no effect of AZAL5 application on thylakoids and grana organization, but an enhancement of the number and the size of starch granules suggesting an accumulation of carbohydrate compounds in chloroplasts in response to treatment.

I.3 Discussion

Winter oilseed rape (WOSR, *Brassica napus*) is characterized by a very low N recovery in seeds as well as significant requirement for sulfur and therefore requires a high rate of fertilization to maintain high yield. This has led to a defective agro-environmental balance that might be improved by increasing nutrient use efficiency. Seaweeds extracts, mainly based on brown algae, have been marketed for several years as fertilizers and soil conditioning agents throughout the World. Among those commercially used products, *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis extracts are manufactured from seaweeds harvested from natural habitats in the form of liquid concentrate or soluble powder as described by Blunden (1991). Those marine extracts have long been known to enhance plant growth and increase yield (Blunden and Gordon, 1986; Metting *et al.*, 1988). More recent studies on seaweed extract action in plants revealed that these extracts induce an accelerated development cycle (Sivasankari *et al.*, 2006; Roussos *et al.*, 2009) and enhanced nutrient uptake, especially for N

(Durand *et al.*, 2003), P, K (Mancuso *et al.*, 2006) and S (Rathore *et al.*, 2009). Moreover, treatments with seaweed extract have been reported to stimulate protection against biotic (Mercier *et al.*, 2001; Cluzet *et al.*, 2004; Jayaraj *et al.*, 2008) and abiotic stresses (Rayirath *et al.*, 2009). Thus, the aim of this study was to identify a new *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis finely characterized extract, named AZAL5, that could increase mineral nutrition and growth of WOSR in order to reduce fertilizer use.

From a previous set of screening experiments (data not shown), AZAL5 extract was selected from five seaweed extracts. Only AZAL5 promoted a significantly higher growth rate and leaf chlorophyll content compared to non-treated rapeseed controls. Its effects were confirmed in the present experiment on total DW ($+38\pm 7.34\%$), and more especially roots DW ($+102\pm 13.43\%$) (Fig. IV.I-1). This seaweed extract promotion of growth has already been reported by several authors and for different species such as *Arabidopsis thaliana* (Rayorath *et al.*, 2008), grapevine (Sivasankari *et al.*, 2006; Mugnai *et al.*, 2008) and strawberry (Roussos *et al.*, 2009; Spinelli *et al.*, 2010). Most of the studies on seaweed extract have hypothesized that effects observed in treated plants were the results of phytohormonal actions (Khan *et al.*, 2009 for review). However, phytohormone analysis (Table IV.I-2) did not reveal any significant level of hormones (IAA, ABA and cytokinins) in the AZAL5 extract. Moreover, its mineral contribution to the nutrient solution was negligible compared to Hoagland solution alone (Table IV.I-3). Thus from our results, it cannot be postulated that known endogenous hormones and nutrients supplied from AZAL5 triggered growth promotion. However, these results cannot exclude *de novo* phytohormone synthesis in plants.

Therefore, to identify AZAL5 metabolic targets in plants, we used microarray analysis specific to *Brassica napus* that allowed the analysis of 31 561 genes. Nevertheless, most of these genes were not previously identified (Fig. IV.I-3) due to the lack of complete sequencing of the *Brassica* genome. However, from identified genes that accounted for about 40% of the gene expression analyzed, the expressions of about one thousand known genes were significantly affected. This high number of differentially expressed genes reflects a fairly massive effect of AZAL5 at the molecular level that touched almost all areas of plant metabolisms. Indeed, affected genes could be classified in nine clusters covering the major metabolic functions of plants: carbon and photosynthesis, general cell metabolism, fatty acids, nitrogen/sulfur metabolisms, phytohormones, plant development, senescence, responses to stress and transport of ions and water. Among these pathways, the most affected by AZAL5

application involved carbon and photosynthesis, cell metabolism, nitrogen and sulfur and responses to stress (Fig. IV.I-3). Many studies in the literature have already focused on these nitrogen, sulfur and response to stress, but mostly only from a physiological point of view (Durand *et al.*, 2003; Mercier *et al.*, 2001; Cluzet *et al.*, 2004; among others). We therefore focused our study on photosynthesis and nitrogen and sulfur metabolism. Furthermore, to corroborate microarray analysis, we chose to compare these results not only with physiological analyses, but also with more precise q-PCR analyses of selected genes.

Overall, microarray analysis highlighted the enhancement of gene expression related to N and S metabolism and more particularly identified genes that encode proteins involved in uptake and assimilation (Tables IV.I-4 and IV.I-5). However, physiological analyses also gave access to more precise interpretation of data. For N metabolism (Fig. IV.I-4), increases in NO_3^- uptake ($+38\pm 5.7\%$), N content ($+21\pm 6.5\%$ and $115\pm 12.6\%$ in shoots and roots, respectively), and enhancement of nitrate reductase enzymatic activity were in the same range of magnitude as the DW increase ($+23\pm 8.6\%$ and $102\pm 13.4\%$ in shoots and roots, respectively). Moreover, q-PCR analysis of gene expression of *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* that encode nitrate transporters showed an induction of these genes in roots of treated plants. Surprisingly, these changes were not revealed by microarray analysis. However, nitrate transporters is a very large family of genes (Daniel-Vedele *et al.*, 1998) and a BLAST analysis showed that nitrate transporter probe use on microarray are weakly specific for the *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* isoform. All these data suggest that supplemental N taken up by roots of treated plants was directly assimilated in relation to the growth rate without being stored (no N or nitrate content enhancement, data not shown). It must be pointed out that expression of NRT1.1 was strongly induced by AZAL5, while recent results suggest (Castaings *et al.*, 2011; Krouk *et al.*, 2010) that this gene may have a role in N sensing as well as in auxin transport, thus having an effect on lateral roots growth, a process that was also largely stimulated by AZAL5 (Fig. IV.I-2C). An increased expression of the main roots and tonoplasmic sulfate transporter genes (Fig. IV.I-5) and an enhancement of assimilatory gene expression were also found (Table IV.I-4). However, these results are not in full agreement with previous work that showed an accumulation of N or nitrate in response to seaweed extract treatment (Nelson and Van Staden, 1984; Türan and Köse, 2004; Mancuso *et al.*, 2006; Merigout, 2006) of grapevine, cucumber and *Arabidopsis thaliana*. The enhancement of nitrate reductase activity found in this study has already been reported in *Arabidopsis thaliana* (Durand *et al.* 2003, Merigout 2006). As N is not increased by AZAL5 addition to

the nutrient solution (Table IV.I-1), enhancement of N uptake in response to treatment is possibly a consequence of growth promotion and more specifically of lateral root development. For S metabolism (Fig. IV.I-5), S content after 30 days ($+63\pm 27.1\%$ and $133\pm 36.3\%$ in shoots and roots respectively) increased more than dry matter accumulation and this resulted in sulfate accumulation ($+28\pm 10.6$ and $24\pm 8.6\%$ in shoots and roots respectively). Rathore *et al.* (2009) demonstrated that soybean accumulate S and N in its seeds in response to seaweed extract treatment. These results are in accordance with our study where AZAL5 seems to have a direct and early effect on sulfate uptake, assimilation and storage. The latter suggests that S metabolism was increased more than the growth rate and that the S supply exceeded demand for growth.

The second axis of our study focused on carbon assimilation by photosynthesis. In our work, significant effects for chlorophyll content and net photosynthesis were only found late in the response to AZAL5 treatment (Fig. IV.I-6), while enhancement of chlorophyll content has been reported in grapevine and strawberry in response to seaweed extract (Mancuso *et al.*, 2006; Sivasankari *et al.*, 2006; Spinelli *et al.*, 2010). However, microscopic observations (Fig. IV.I-6) show that, in response to AZAL5, chloroplasts produce higher quantities of starch compared with non-treated control plants. This result suggests that AZAL5 has no effect on the clear phase of photosynthesis (net photosynthesis measurement at PAR 1000) but seems to enhance the dark phase of photosynthesis (carbon fixation and starch synthesis). To support this hypothesis, microarray results showed that genes involved in carbon fixation such as Rubisco or carbonic anhydrase were mostly up-regulated by AZAL5 treatment ($+5.666$ fold for carbonic anhydrase in shoots after 3d, $+5.507$ fold and $+5.151$ fold for carbonic anhydrase after 30d in shoots and roots, respectively, $+7.398$ fold for Rubisco in roots after 30d) (Table IV.I-4 and Table IV.I-5). Rubisco is known for its involvement in the Calvin cycle for carbon fixation (Cardon and Berry, 1992). Moreover, carbonic anhydrase, a zinc-requiring enzyme, catalyzes the reversible hydration of carbon dioxide, thus facilitating its transfer and fixation (Ramanan *et al.*, 2009). Carbonic anhydrase is important in photosynthesis and respiration as it participates in the transport of inorganic carbon to actively photosynthesizing cells and away from actively respiring cells (Moroney *et al.*, 2001). This suggests that carbonic anhydrase and Rubisco have complementary activities, with carbonic anhydrase hydrating and transferring CO_2 to Rubisco, which fixes it into glucose and then starch. Therefore, enhanced gene expressions of these two proteins showed by microarray analysis could explain the

increased carbon fixation that was suggested by microscopy observation due to the large number of starch granules in AZAL5-treated plants (Fig. IV.I-6D).

Furthermore, confocal microscopy observations showed a clear effect of the number on chloroplasts per cell from 1d of contact with AZAL5 extract (Fig. IV.I-6). Okazaki *et al.* (2009) obtained similar results with *Arabidopsis thaliana* in response to exogenous application of cytokinins. According to these authors, plastid division components of chloroplasts were under control of cytokinin-responsive transcription factor. Consequently, application of cytokinins enhances chloroplast division and increases the number of chloroplasts per cell. In our study, only one “plastid division component” was found on the microarray, the “plastid division regulator MinE”, but it was clearly down-regulated in response to AZAL5 treatment after both 3 and 30 days of contact. However, the literature on this gene gives contradictory results. Itoh *et al.* (2001) showed that over-expression of MinE in *Arabidopsis thaliana* resulted in cells containing only one giant chloroplast. Kojo *et al.* (2009) obtained the same phenotype with an *AtMinE* deficient mutant (2,000-fold reduced MinE expression compared with wild type). The second aspect of the Okazaki study (2009) was the role of exogenous cytokinin in chloroplast division. However, no significant levels of phytohormones have been detected in AZAL5. Thus, this suggests that either AZAL5 acts on chloroplasts in a different way than phytohormones or that AZAL5 can induce early *de novo* phytohormone synthesis in plants. To support this second hypothesis, microarray results showed that genes involved in cytokinin and gibberellin metabolisms were up-regulated in shoots after 3 and 30 days of contact with AZAL5 (supplemental data, Tables S1 and S2).

These results suggest that the first event to occur after AZAL5 application on plants was the increase in chloroplast number per cell (Fig. IV.I-6), in parallel with the enhancement of expression of genes encoding root nitrate and sulfur transporters and especially *NRT2.1* ($\times 7.1 \pm 3.5$ after 1d, Fig. IV.I-4) and *BnSultr1.1* ($\times 7.5 \pm 3.4$ after 1d, Fig. IV.I-5). These first responses were followed by sulfate accumulation in shoots and an even greater number of chloroplasts over duration of the treatment, suggesting that these early events were the preliminary effects that contribute to the global change in plant metabolism observed from 3 days to 30 days of treatment with AZAL5. Surprisingly, this increase in chloroplast number is not associated with an increase in net photosynthetic activity (Fig. IV.I-6A). However, because chloroplasts were the first organelle affected during the senescence process, it could be assumed that the increase in the number of chloroplasts in AZAL5 treated plants would

promote a delay in senescence and extend the life span of leaves. Indeed, previous work has shown, for WOSR, that an increase in the life span of leaves would allow a better synchronization between N-remobilization associated with leaf senescence and seed filling (Rossato *et al.*, 2001; Malagoli *et al.*, 2005) and improved NUE of the WOSR crop. This hypothesis is also supported by microarray analysis that reveals up-regulation of some genes encoding protease inhibitors and down regulation of stay green protein (Srg), which are able to limit leaf protein degradation (Etienne *et al.*, 2007; Desclos *et al.*, 2008) and protect chlorophyll degradation (Park *et al.*, 2007) during leaf senescence, respectively. According to this work, it could be assumed that chloroplast modifications could act on the duration of leaf senescence and the leaf life span and allow an improvement in the NUE of WOSR. Thus, the seaweed extract reported here could be especially relevant to augment or substitute for fertilizers actually used and improve the agro-environmental balance of WOSR.

I.4 Conclusion

This pioneer study combining microarray and physiological analyses to explain effects on WOSR growth gives clues about the metabolic targets of *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis seaweed extract, AZAL5. Physiological analyses confirmed microarray results of the activation of nitrogen and sulfur absorption and assimilation. Enhancement of N, C and S assimilation could explain increased growth of plants treated with AZAL5. Furthermore, microscopy observations showed a clear and early effect of seaweed extract on the chloroplast number per cells and starch granules. However, should be carried out for further determination of seaweed extract metabolic targets. For example, *in planta* phytohormonal measurement could help determine AZAL5 effects on chloroplasts, and also better understand the regulation of metabolic pathway. Moreover, enhanced nutrient assimilation alone could not account for the totally improvement in WOSR agro-environmental balance, so exploration of nutrients remobilization should be undertaken. Furthermore, some genes involved in different metabolic pathways (such as responses to stress and senescence) were up or down-regulated in response to AZAL5 treatment (supplemental data, Tables S1 and S2) and remain to be studied to improve our knowledge of the effects of seaweed extract on plant physiological processes.

I.5 Materials and methods

I.5.1 Growth conditions and experimental design

Seeds of *Brassica napus* var. Capitol were surface-sterilized by exposure to 80% ethanol for 30s followed by 20% sodium hypochlorite for 10 min. After 10 washes with demineralized water, seeds were germinated on perlite over deionized water for 2d in the dark and 1 week in the light in a greenhouse. Just after first leaf emergence, seedlings were transferred to a 20L plastic tank containing nutrient solution with the following composition: KNO₃ 1mM, CaCl₂ 1.25 mM, KCl 250, KH₂PO₄ 0.25 mM, MgSO₄ 0.5 mM, EDTA-2NaFe 0.2 mM, H₃BO₃ 14 μM, MnSO₄ 5 μM, ZnSO₄ 3 μM, CuSO₄ 0.7 μM, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 0.7 μM and CoCl₂ 0.1 μM. This nutrient solution was renewed every two days. Plants were grown under greenhouse conditions, with a thermoperiod of 20°C/17°C day/night and a photoperiod of 16h. Natural light was supplemented with high pressure sodium lamps (Philips, MASTER Green Power T400W) supplying an average photosynthetically active radiation of 280 μmol photons.m⁻².s⁻¹ at canopy height. Plants were grown for one week before treatment with AZAL5 seaweed extract.

I.5.2 Seaweed extract characterization (AZAL5)

Extraction and composition of *Ascophyllum nodosum* extract AZAL5. The fresh algae harvested on Brehat island shores in October 2008 was washed, shredded and added to water. The solution was acidulated with concentrated 95% Sulfuric acid to pH 3. The mixture was homogenized to micro-rupture the algal cells then centrifuged and filtered. The amount of biologically active extracted compounds varies by season and also by environmental conditions. The final solution was then concentrated as described by Briand (1998).

Analysis of the concentration of IAA, ABA, and Cytokinins in AZAL5. The general method is extensively described in Aguirre *et al.* (2009) and Mora *et al.* (2010). As an example we describe the method used for IAA determination.

Extraction, purification and determination procedures for indole acetic acid (IAA) by HPLC MS/MS: An amount of 0.1 g of frozen AZAL5 was homogenized with 5 mL of precooled (-20°C) methanol-water (80:20, v/v). Deuterium-labeled internal standard

(2H5IAA, Olchemim, Olomouc, Czech Republic) was added (40 µL of a stock solution of 200 ng/mL of standard in methanol) to the extraction medium. After overnight extraction at –20°C, solids were separated by centrifugation (12000 rpm, 10 minutes, 4°C) and re-extracted for 1 hour with an additional 4 mL of extraction mixture. Supernatants were passed through a Sep-Pak Plus tC18 cartridge (ref. WAT054925, Waters Co., Milford, MA) preconditioned with 2 mL of methanol followed by 2 mL of extraction medium. After evaporation to near dryness using a vortex evaporator, IAA was extracted with two portions of 5 and 4 mL of diethyl ether, and afterwards the organic phase was evaporated. The residue was re-dissolved in 200 µL of methanol-0.5% acetic acid (30:70, v/v) before its injection in the LC/MS/MS system.

Liquid Chromatography-Mass Spectrometry quantification of IAA: Indole-acetic acid was quantified by HPLC linked to a 3200 Q TRAP LC/MS/MS system (Applied Biosystems/MDS Sciex, Ontario, Canada), equipped with an electrospray interface, using a reverse-phase column (Synergi 4µ Hydro-RP 80A, 150x2 mm, Phenomenex, Torrance, CA). A linear gradient of methanol (A) and 0.5% acetic acid in water (B) was used: 35% A for 1 min, 35% to 95% A in 9 min, 95% A for 4 min and 95% to 35% A in 1 min, followed by a stabilization time of 5 min. The flow rate was 0.20 mL/min, the injection volume was 50 µL and the column and sample temperatures were 30°C and 20°C, respectively.

The detection and quantification were performed by Multiple-Reaction Monitoring (MRM) in the negative-ion mode, employing a multilevel calibration graph with deuterated hormone as internal standard. The monitored fragmentation processes are described in Aguirre *et al.* (2009). The source parameters are curtain gas: 25.0 psi, GS1: 50.0 psi, GS2: 60.0 psi, ion spray voltage: -4000 V, CAD gas: medium, and temperature: 600 °C.

I.5.3 Plant treatment

After one week of growth, plants were separated in two sets: (i) control plants (Control) were grown in the nutrient solution described above with ¹⁵N labeling (3% atom excess), (ii) Treated plants (AZAL5) were grown in the same labeled solution supplied with 0.1% (v/v) of AZAL5 seaweed extract. Nutrient solutions were renewed every two days. Each set of plants (control and AZAL5) were grown for 30 days and time courses in the experiment were

expressed in days after the beginning of treatment (Day 0, addition of AZAL5 to the nutrient solution).

For each conditions (Control and treatment with AZAL5) and each duration of treatment (1, 3 and 30 days), ten plants (*i.e.* ten plants pooled in 3 replicates) were harvested and separated from shoot and root samples. Thereafter, roots and shoots were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis. An aliquot of each tissue was weighted and dried (60°C) in a drying oven for dry weight (DW) determination and ground to fine powder for mineral and ion analysis. Likewise, at each time of harvest, a fresh aliquot of shoots and roots was used for real-time *in vivo* nitrate reductase activity.

I.5.4 Determinations of chlorophyll concentration and net photosynthetic rates

During the experiment, determinations of chlorophyll concentration and net photosynthetic rates were monitored at 1d and 3d after AZAL5 application and then weekly until the end of the treatment (*i.e.* 30 days). Determination of relative chlorophyll concentration was performed using a non-destructive method: SPAD (Soil Plant Analysis Development) chlorophyll meter (Minolta, SPAD-502 model, Tokyo, Japan). The determination was carried out on 10 measures per leaf and on 5 leaves per replicate. Moreover, the net photosynthetic rate was measured using a LI-6400 (LICOR, Lincoln, Nebraska, USA) at 23°C on leaves under ambient CO_2 atmospheric concentration (~ 400 ppm) and at $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ photosynthetic photon flux (PPF) provided by a LED light. Temperature and PPF parameters were previously validated as the optimal values for photosynthesis analysis in leaves of oilseed rape.

I.5.5 Mineral and ion quantification

I.5.5.1 Total N and ^{15}N analysis.

An aliquot of each plant organ (shoots or roots) was placed in thin capsules for isotopic analysis in order to analyze between 60 and 80 μg N. The total N amount and ^{15}N excess in plant samples were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy):

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

$$N_{tot_i} = (\%N_i \times DW_i) / 100$$

The natural ¹⁵N abundance (0.36636±0.0004%) of atmospheric N₂ was used as a reference for ¹⁵N analysis. Nitrogen derived from current N uptake (N_{upt_i}) in a given organ, at a given time, was calculated as:

$$N_{upt_i} = (N_{tot_i} \times E_i) / E_s$$

Where E_i (%) is the atom ¹⁵N excess in a given tissue (shoots or roots), E_s is the nutrient solution atom ¹⁵N excess (3%).

Total S analysis. The total S amount in shoots and roots was measured by ICP-OES (Termo Elemental Co. Iris Intrepid II XDL) with prior microwave acid sample digestion (8mL of concentrated HNO₃ and 2 mL of H₂O₂ for 0.5g DW) as previously described in Mora *et al.* (2010).

1.5.5.2 Nitrate and sulfate analysis.

Nitrate and sulfate were extracted and analyzed as previously described (Abdallah *et al.*, 2011) from 30 mg of DW (shoots or roots) in 1.5 ml of 50% ethanol solution at 40°C for 1h. After centrifugation (20 min, 10 000 g) the supernatant (called S1) was recovered and 1.5 ml of 50% ethanol was added to the pellet. After a second incubation (1 h, 40°C) and centrifugation (20 min, 10 000 g), the remaining supernatant was taken up and added to the previous supernatant (S1). All these operations (*i.e.* incubation and centrifugation) were repeated twice but now with 1.5 ml of ultra-pure water and incubation at 95°C. All supernatants were finally pooled then dried under vacuum for 16 h without heating (Concentrator Evaporator RC 10.22 Jouan, Saint Herblain, France). The dry residues containing both nitrate and sulfate were solubilized in 1 ml of ultra-pure water. Thereafter, nitrate and sulfate concentrations in each tissue were determined by using ion chromatography (HPLC, ACS3000, Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA), with a conductivity detector. The eluent solution consisted of 1.8 mM Na₂CO₃ and 1.7 mM Na₂HCO₃, and was pumped isocratically over an AS17 guard column.

1.5.6 *In vivo* nitrate reductase activity in plants

The nitrate-reductase (NR) activity was determined in each replicate using an *in vivo* assay adapted from Bungard *et al.* (1999). Shoot or root tissue (0.1g FW) was vacuum infiltrated for 3x 30 s with 10mL of phosphate buffer (pH 7.5) containing 1% (v/v) propanol

and 1 M KNO₃. After vacuum infiltration, buffer solutions containing plant material were separated in two sets. One part was incubated in a shaking water bath at 30°C for 15 min in darkness and then boiled to stop any enzymatic activity. The other part was boiled immediately after vacuum infiltration for initial nitrite concentration determination. The colorimetric reaction was performed with 1mL of plant extract, 1 mL of 0.3% (w/v) sulfanilic acid in 30% acetic acid and 1mL of 0.05% (w/v) α -naphtalamin in 30% acetic acid. The amount of nitrite (NO₂⁻) formed in each buffer solution was measured spectrophotometrically (UV-1601, UV-visible spectrophotometer, Shimadzu, Champs-sur-Marne, France) at 540 nm. Thereafter, nitrate reductase activity (NR_{act}) was calculated as μ mol NO₃⁻ reduced per g FW and per hour.

I.5.7 RNA extraction

Total RNA was extracted from 200 mg of root and shoot FW. Frozen samples were ground to a powder with a pestle in a mortar containing liquid nitrogen. The resulting powder was suspended in 750 μ l of extraction buffer [0.1 M TRIS, 0.1 M LiCl, 0.01 M EDTA, 1% SDS (w/v), pH 8] and 750 μ l of hot phenol (80°C, pH 4). This mixture was vortexed for 30 s and, after addition of 750 μ l of chloroform/isoamylalcohol (24:1), the homogenate was centrifuged at 15 000 g (5 min, 4°C). The supernatant was transferred into 4 M LiCl solution (w/v) and incubated overnight at 4°C. After centrifugation (15 000 g, 30 min, 4°C), the pellet was suspended in 100 μ l of sterile water. RNA was then purified by RNeasy mini kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Courtaboeuf, France). Quantification of total RNA was performed by spectrophotometry at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before Reverse Transcription (RT) and real-time PCR (q-PCR) analysis.

I.5.8 Reverse transcription and q-PCR analysis

For reverse transcription, 1 μ g of total RNA was converted to cDNA with an 'iScript cDNA synthesis kit' according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France).

Q-PCR amplifications were performed using specific primers for each housekeeping gene (EF1- α [forward 5'-gcctggtatggttgacac-3' and reverse 5'-gaagttagcagcacccttg-3'] and RNA 18S [forward 5'-cggataaccgtagtaattctag-3' and reverse 5'-gtactcattccaattaccagac-3'])

and target gene: BnNRT1.1 forward 5'-tggtggaataggcggctcgagttg-3' and reverse 5'-gtatacgttttgggtcattgccat-3', BnNRT2.1 forward 5'-atggaacggaagtgccttg-3' and reverse 5'-tgattcgagctgtgtgaagc-3', BnSultr1.1 forward 5'-agatattgcgatcggaccag-3' and reverse 5'-gaaaacgccagcaagaaag-3', BnSultr1.2 forward 5'-ggtgtagttcgtggaatggt-3' and reverse 5'-aacggagtgaggaagagcaa-3', BnSultr4.1 forward 5'-gaccagaccgtaaggtca-3' and reverse 5'-ttggaatccatgtgaagcaa-3', BnSultr4.2 forward 5'-agcaagatcagggattgtgg-3' and reverse 5'-tgcaacatttgggtgtct-3'. Q-PCRs were performed with 4 µl of 100x diluted cDNA, 500 nM of primers, and 1x SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad) in a ChromoFour System (Bio-Rad). For each pair of primers, a threshold value and PCR efficiency have been determined using a cDNA preparation diluted >10-fold. For all pairs of primers, PCR efficiency was ~100%. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the presence of the single peak in the melting curves after Q-PCRs and by sequencing the Q-PCR product to confirm that the correct amplicons were produced from each pair of primers (Biofidal). For each sample, the subsequent Q-PCRs were performed in triplicate. The relative expression of the genes in each sample was compared with the control sample [corresponding to untreated plants at the same time of harvest] and was determined with the delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) method using the following equation (Livak and Schmittgen, 2001):

$$\text{Relative expression} = 2^{-[\Delta Ct_{\text{treated}} - \Delta Ct_{\text{control}}]},$$
$$\text{with } \Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - [\sqrt{(Ct_{EF1-\alpha} \times Ct_{18S})}]$$

Where Ct refers to the threshold cycle determined for each gene in the exponential phase of PCR amplification and $[\sqrt{(Ct_{EF1-\alpha} \times Ct_{18S})}]$ corresponds to the geometric average of Ct of the reference genes. Using this analysis method, relative expression of the different genes in the control sample of the experiment was equal to 1 (Livak and Schmittgen, 2001), and the relative expression of other treatments was then compared with the control, on this basis.

I.5.9 Microarray analysis

Briefly, each test sample was hybridized on a *Brassica napus* Gene Expression Microarray 4 X 44K (Agilent Technologies®) using a two-color microarray-based gene expression protocol. In this procedure, controls and treated samples (AZAL5) were compared and respectively labeled with cyanine 3 and cyanine 5. For each plant tissue (shoots and roots) and each time of harvest (1, 3 and 30 days), the same control was used for the different hybridizations. After the labeling step, cRNA sample sizes ranged from 50 to 3000 nucleotides. Thus, fragmentation was required to take away secondary structures (specific

buffer at 60°C for 30 min) enabling cRNA length of between 50 to 200 nucleotides to be obtained and optimal hybridization with Agilent 60-mer oligonucleotide microarrays to be carried out. Thereafter, hybridizations were performed at 65°C for 17 hours.

Scanning of microarrays was performed with the Agilent scanner using default parameters for 4 x 44 K formats. Data were extracted with Feature Extraction 10.1 software (Agilent Technologies®).

I.5.10 Fluorescence confocal microscopy and transmission electron microscopy

For microscopy experiments, the choice of the leaf observed is important. After 1 and 3 days of contact with AZAL5, observations were made on young plants with four leaves. We then choose to make observation on the last fully expanded leaf: leaf #3. After 30 days of treatment, we choose to make the observations on a leaf in the center of plant. The first leaves that had emerged were nearly senescent and young leaves just emerged were not representative of the whole plant. Thus, among the eight leaves emerged by the end of culture, we then choose to focus our observations on leaf #5.

A square of rapeseed leaf of each replicate of each treatment (Control and AZAL5-treated plant) and each time of harvest (1, 3 and 30 days) was embedded in LMPT agar (low melting point) 5% in phosphate buffer at 40°C. After cooling, slices of 50µm thickness were cut with a vibratome (Microm HM650V). Half of these slices were directly observed with confocal microscopy (Olympus FV1000) with laser excitation of autofluorescence at 458nm and emission at 650-700nm. The remaining slices were fixed with 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer 0.1M pH 7.4 from 1 hour to several days at 4°C. The sections were rinsed in phosphate buffer 0.1M pH 7.4 three times, post-fixed for 1.5 hours with 1% osmium tetroxide in 0.1M phosphate buffer pH 7.4, and then rinsed in phosphate buffer three times. The cells were then dehydrated in progressive baths of ethanol (70-100%) and propylene oxide 100%, embedded in Aradite 502 resin and polymerised for 48h at 60°C. Ultrathin sections of 80nm were cut and contrasted with uranyle acetate and lead citrate. The sections were observed with a JEOL 1011 transmission electron microscope and images were taken with a megaview 3 camera and analysis five software.

I.5.11 Data and statistical analysis

Regarding growth, nitrate uptake, SPAD and IRMS analysis, experiments were conducted with 10 replicates. In the case of ICP and DIONEX analysis, experiments were conducted with 6 replicates. For the microscopy, q-PCR and microarray experiments, 3 replicates were used for each sample.

All data were analyzed for significant differences by Student's test and marked by asterisks (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$).

Microarray. For each experiment (each time and each tissue), probes with [Marginal] flag and at least one channel above the background for the three biological replicates were retained. A t-test was applied on each filtered gene list with the following parameters: (i) t-test against zero, (ii) Benjamini-Hochberg correction and (iii) p-value < 0.05 . A fold change was also made on the filtered list, but no statistical test evaluates the significance of these lists.

Supplemental Data

Supplemental Table S1. List of the differentially expressed genes in shoots and roots of rapeseed after 3 days of AZAL5 supply to the roots.

Supplemental Table S2. List of the differentially expressed genes in shoots and roots of rapeseed after 30 days of AZAL5 supply to the roots.

Acknowledgment

We thank Marie-Paule Bataillé and Raphaël Ségura for IRMS analyses and Angel-Mari Zamarreño for analyses of phytohormones. We acknowledge Patrick Beauclair for LICOR measurement, Julie Levallois for technical assistance in RNA extractions and q-PCR analyses, Xavier Sarda and Anne-Françoise Ameline for helping with plant culture and harvest and finally Nicolas Elie from GRECAN (Groupe Régional d'Etude sur le CANcer, Histo-imagerie quantitative, Caen, France) for microscopy image analyses. We thank Laurence Cantrill for improving the english of the manuscript.

Article 2

II - Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: Involvement of N, C and S metabolisms (Article 2)

Laëtitia Jannin^{1,2}, Mustapha Arkoun^{1,2}, Alain Ourry^{1,2}, Philippe Laine^{1,2}, Didier Goux³, Maria Garnica⁴, Marta Fuentes⁴, Sara San Francisco⁴, Roberto Baigorri⁴, Florence Cruz⁵, Fabrice Houdusse⁵, José-Maria Garcia-Mina⁴, Jean-Claude Yvin⁵, Philippe Etienne^{1,2}

6. Université de Caen Basse-Normandie, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S. Esplanade de la paix, 14032 Caen Cedex, France
7. INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S. Esplanade de la paix, 14032 Caen Cedex, France
8. Université de Caen Basse-Normandie, Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie (CMABio), Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France
9. TIMAC Agro Spain, Poligono de Arazuri-Orcoyen, Calle C, n°32, E-31160 Orcoyen, Spain
10. Centre de Recherche International en Agrosience, CRIAS-TAI, Groupe Roullier, 55 boulevard Jules Verger, 35800 Dinard, France

Running title: Oilseed rape growth promotion by humic acid.

Avant-propos

Les acides humiques, composants majoritaires de la matière organique, ont un pouvoir stabilisateur sur le sol et activateur de la croissance des plantes connu depuis longtemps. Ainsi, des augmentations de biomasses des plantes et de rendements ont souvent été rapportés en réponse à ces extraits. Cependant, il ne s'agit majoritairement que de mesures physiologiques et les mécanismes et modes d'action sous tendant ces augmentations de biomasses sont pour l'instant mal connus, en particulier chez le colza.

L'objectif principal de ce travail consistait donc à étudier en détail l'action d'un extrait humique, sélectionné après criblage de 10 acides humiques pour leurs effets sur la biomasse, chez le colza afin de préciser son mode d'actions. Dans cette étude, nous avons choisi de nous focaliser sur trois métabolismes importants pour la plante : la photosynthèse ainsi que les nutriments azoté et soufré. Pour cela, une analyse en puce ADN a été réalisée afin de comparer les transcriptomes de colzas traités par l'acide humique à ceux de colzas témoin non traités. Cette analyse est ensuite complétée par des mesures de contenu en composés N et S, des mesures de l'activité nitrate réductase *in vivo* ainsi que des observations des chloroplastes en microscopie confocale et électronique.

Les résultats révèlent que l'acide humique testé induit une augmentation de biomasse caractéristique de l'application d'extrait humique mais également une activation des nutriments azoté et soufré chez les plantes traitées. Cela se traduit non seulement par une activation des transporteurs racinaires responsables de l'absorption du N et du S mais également par une activation des voies d'assimilation de ces éléments. Un résultat plus inattendu montre une augmentation significative du nombre de chloroplastes par cellule dès les premiers instants de contact entre le colza et l'acide humique couplée plus tard à une activation de la photosynthèse nette.

II.1 Introduction

Any improvement in agricultural practices that increases plant nutrient capture efficiency should reduce the negative environmental impacts of agriculture and increase crop production and sustainability in reduced input systems. Thus, many approaches have been studied to increase nutrients capture and yield, such as genetic selection which has included allele selection, selection of domestication genes, gene and genome duplication, new genotype creation and QTLs. (for a review, see Vaughan *et al.*, 2007). Moreover, a better knowledge of plant uptake and assimilation could also allow a better efficiency of crop fertilization. In this way, recent studies have focused principally on potentially polluting nutrients such as phosphorus (P) and nitrogen (N) (Agostini *et al.*, 2010; Borda *et al.*, 2011). More recently, new strategies such as the use of biological molecules that act as biostimulants have been evaluated. As defined by Zhang and Schmidt (1997), biostimulants correspond to “materials, other than fertilizers, that promote plant growth when they are applied in small quantities”. In addition, Zhang and Schmidt (1997) considered biostimulants as “metabolic enhancers” that can be used to increase the effectiveness of conventional mineral fertilizers (Craigie, 2011). Among these biostimulants, bioactive substances extracted from seaweeds are the most studied.

Humic substances are ubiquitous organic materials in terrestrial and aquatic ecosystems. They are collections of diverse, relatively low molecular mass components forming dynamic associations that are stabilized by hydrophobic interactions and hydrogen bonds (Conte and Piccolo, 1999; Smejkalova and Piccolo, 2008). These associations are capable of organizing into micellar structures in suitable aqueous environments (Varga *et al.*, 2000; Sutton and Sposito, 2005). The predominant components of humic substances are humic acids, which are very active in interacting with organic and inorganic contaminants. These interactions depend on the chemical structure and composition of humic macromolecules, which should be duly considered in the evaluation of environmental functions of soil organic matter (Barancikova *et al.*, 1997). In this way, Kozuch and Pempkowiak (1996), Christl and Kretschmer (2001), Muscolo *et al.* (2007a) and Canellas *et al.* (2010) show that biological activity of the humic fraction depends on their chemical structure and molecular weight. These authors demonstrate that humic acids presenting a lower molecular weight had the greatest effects on plant growth or ion binding. In parallel,

physiological and agronomical studies of these humic acid extracts were performed in order to understand their potentialities and modes of action.

The first hypothesis on humic acid action is the improvement of physical and chemical properties of soil. Cyclic wetting and drying conditions in soil result in the breakdown of large aggregates into smaller aggregates susceptible to erosion and dispersion. Authors showed that humic acid application to soil could enhance aggregate stability (Piccolo *et al.*, 1997a; Imbue *et al.*, 2005; Abiven *et al.*, 2009), thus decreasing soil erosion (Piccolo *et al.*, 1997b) and avoiding C and N leaching (Andersson *et al.*, 2000; Bossuyt *et al.*, 2007). Humic acids are heterogeneous substances that include in the same molecule hydrophilic acidic and hydrophobic groups. When the acidic groups become fully dissociated in the HA solution, upon contact with the soil aggregates, they react quickly with the polyvalent cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}) found on the surfaces of the clay particles. Because these very reactive acidic groups are distributed over the heterogeneous humic macromolecule, chelation of the polyvalent cations may occur simultaneously on different clay particles resulting in improved stability (Piccolo *et al.*, 1997a). This capacity of humic substances to form complexes permits sequestration of nutrients (Zn, Cu, Fe for example) by formation of metal-humic complexes, thus protecting them from leaching and making them more available for plant uptake (Esparza *et al.*, 2005; Garcia-Mina, 2006). In addition, several authors have shown that a humic acid application on soil has a beneficial effect on the soil bacterial community (Cookson *et al.*, 2005; Arancon *et al.*, 2006; Puglisi *et al.*, 2009). Puglisi *et al.* (2009) suggested that this beneficial effect on the bacterial community could be due to the enhanced secretion of organic carbon by maize roots treated with humic acid. These effects on physical, biological and chemical properties of soil could create improved conditions for plant development and thus explain the enhanced growth observed when plants are treated with humic acids. In contrast, other authors have proposed a direct effect of humic acids on plants.

Studies on the effects of humic acids on plants have shown accelerated development cycles i.e. earlier germination, flowering and fructification in maize (Eyheraguibel *et al.*, 2008). Other authors have related an increase in the total dry weight, and more specifically the proliferation of secondary root systems in response to foliar spraying with humic extract on *Arabidopsis thaliana* (Schmidt *et al.*, 2007), barley (Ayuso *et al.*, 1996), cucumber (Atiyeh *et al.*, 2002, Mora *et al.*, 2010), and maize (Canellas *et al.*, 2002; Zandonadi *et al.*, 2007). In parallel, enhancement of leaf chlorophyll content has also been reported in rice (Tejada and

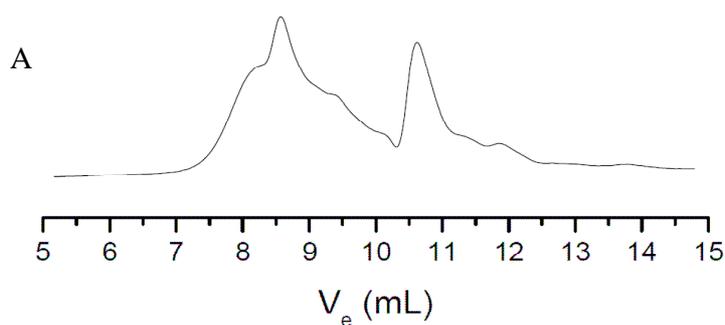
Gonzalez, 2004). This better development and increase in crop growth led to an increase in yield in pepper, rice, wheat and rapeseed when treated by foliar spraying with humic acids (Keeling *et al.*, 2003; Tejada and Gonzalez, 2004; Arancon *et al.*, 2005). In addition, other studies have revealed that plant treatment with humic acid enhances nutrient uptake, especially N (Dell’Agnola and Nardi, 1987; Pinton *et al.*, 1999; Nardi *et al.*, 2000b; Keeling *et al.*, 2003) with an increased expression of genes involved in nitrate transport (Quaggiotti *et al.*, 2004). Accumulation of iron (Cesco *et al.*, 2002) and other micronutrients (Ayuso *et al.*, 1996; Garcia-Mina *et al.*, 2004; Eyheraguibel *et al.*, 2008) in plants was also reported. All these authors suggest that humic acid could have a hormone-like action on plants, which would explain the effects on growth and yield. Indeed, Muscolo *et al.* (1998, 1999, 2007b) demonstrated the presence of auxins (AIA) in humic fractions presenting biological activity.

Focusing more on plant metabolism, Nardi *et al.* (2000b) and Carletti *et al.* (2008) have shown a change in maize protein synthesis and expression in response to humic acid treatment. Proteins that were impacted by humic acids were classified in: energy and metabolism, cellular transport, transport facilitation and transport routes, interaction with the environment, signaling, defense and cell rescue (Carletti *et al.*, 2008). In addition, Muscolo *et al.* (1996) demonstrated that a humic acid application on *Daucus carota* enhance enzymatic activity of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and phosphoenolpyruvate carboxylase. In the same way, Nardi *et al.* (2002a, 2007) have shown the activation of N uptake and assimilation, the glycolytic pathway and the Krebs cycle in maize seedlings treated with humic extracts. According to these studies, the humic extract application affects the nutrition metabolism of the entire plant due to its hormone-like action. Nardi *et al.* (2002b, 2000a) have also shown that humic substances extracted by plant root exudates possesses a higher biological activity than water-extracted humic substances, probably because root exudate-extracted humic substances contained a higher content of phytohormones (Nardi *et al.*, 2000c) and a lower molecular size (Nardi *et al.*, 2005). Therefore, these studies also highlight the effect of the structure of the humic acid on its biological activity and confirm that low molecular weight humic acids seem to have the highest activity on plant metabolism.

In addition, other studies have revealed that plant treatment with humic extract improve the resistance to biotic and abiotic stress. For example, humic acid application has been shown to protect barley (Liang *et al.*, 2005) and *Hordeum maritimum* (Lakhdar *et al.*, 2008) against salt stress. Indeed, in response to humic acid application, the growth and

nutrient uptake of treated plants is maintained under higher salt concentrations. Gorova *et al.* (2005) also show that treatment with humic acid could mitigate the negative effect of ionizing radiation and pesticides on protein synthesis and mitosis. According to these authors, protection against abiotic stress is probably due to the hormone-like effect of humic acid, which enhances chlorophyll content and H⁺ATPase pumps activity thus mitigating the accumulation of sodium in cells. Furthermore, regarding biotic stress, Edwards *et al.* (2010) reported the protection of tomato and cucumber against several pathogens. According to this author, soluble phenolic compounds present in humic extract could act as insect antifeedant and/or decrease insect fecundity. Therefore, the beneficial effect of humic acid application on plants seems to be the result of many components (metal-humic complexes, enhanced aggregate stability, phytohormones, phenol...) that may work synergistically. However, only a few studies have focused on metabolic targets in the interaction of humic acids and plants.

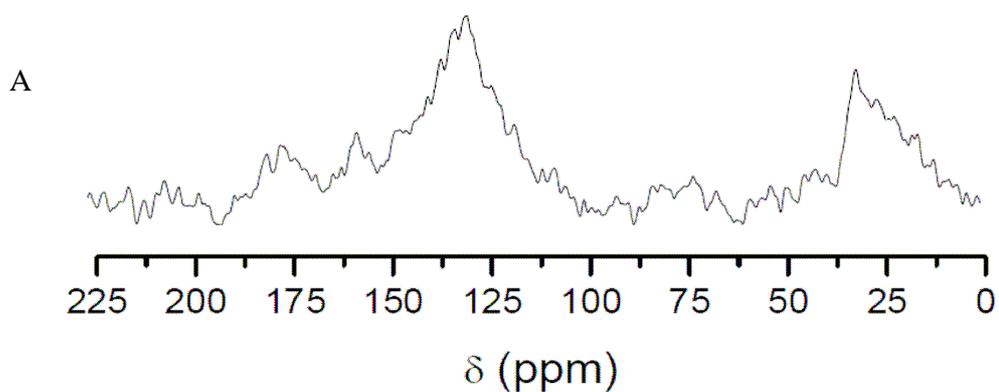
Winter oilseed rape (WOSR, *Brassica napus* L.) is an important agricultural crop cultivated for its oil, which can be used as an edible product or for industrial applications (animal nutrition, cosmetics, diester production...). WOSR can be used as a catch crop to reduce N leaching during the autumn-winter period because of its high capacity to take up nitrate from soil (Lainé *et al.*, 1993). However, oilseed rape shows a low Nitrogen Use Efficiency (NUE, defined by the ratio of seed N content to total plant N content) especially due to the default in leaf N mobilization (Etienne *et al.*, 2007; Desclos *et al.*, 2008) during the vegetative stage. As a consequence, N remaining in fallen leaves is a loss for dry matter production but also increases the risk of nitrate leaching following the mineralization of leaf organic N. Indeed, the fall of WOSR leaves with high N content (up to 2% of the dry matter, Malagoli *et al.*, 2005) leads to a return of N to the soil that can reach 100 kg N ha⁻¹ (Dejoux *et al.*, 2000). Due to this low NUE, oilseed rape requires excessive N fertilization to maintain high N content of harvested tissues. Whatever the rate of N fertilization, the oilseed rape N Harvest Index (NHI) is low (approximately 70%, Dreccer *et al.*, 2000) compared with cereals. This has led to a defective agro-environmental balance that might be improved by triggering an increased nutrient use efficiency (especially N) in oilseed rape by the addition of biostimulants. Thus, the aim of the present study was to identify new seaweed extracts that could increase the mineral nutrition and growth of WOSR so as to reduce the dose of fertilizer currently used.



B

Main peaks (Da)	Interval MW (Da)	Area (%)
$2,68 \cdot 10^4$	$1,21 \cdot 10^4 - 6,88 \cdot 10^4$	21
$1,39 \cdot 10^4$	$9,67 \cdot 10^3 - 2,02 \cdot 10^4$	11
$8,26 \cdot 10^3$	$1,41 \cdot 10^3 - 5,07 \cdot 10^4$	65
$1,89 \cdot 10^3$	$9,65 \cdot 10^2 - 3,43 \cdot 10^3$	3

Figure IV.II-1 : High Pressure Size Exclusion Chromatography analysis of humic acid HA7. **A.** Size-exclusion HPSEC chromatogram for HA7. **B.** Molecular weight distribution of HA7, obtain from A, expressed as the molecular weight (MW) corresponding to the maximum of the main peaks or as the MW corresponding to the interval of the whole peak.



B

Alkyl C 0-45	O-alkyl C 45-110	Aromatic C 110-160	Phenolic C 140-160	Carboxylic C 160-185	Carbonylic C 185-215
27.7	16.7	42	7.8	8.2	5.4

Figure IV.II-2 : ^{13}C RMN analysis of humic acid HA7. **A.** ^{13}C RMN spectra of HA7. **B.** relative abundance of different carbon types (in %) determined by ^{13}C RMN (A) for HA7.

In a first step, we have screened ten humic acids resulting from different extraction processes for their effects on rapeseed. For this initial screening, easily and rapidly measurable parameters chosen from the literature have been used such as improvement of dry weight production (roots and/or shoots), chlorophyll content or improvement of Nitrogen Use Efficiency. Thus, one extract presenting a positive effect on dry weight, chlorophyll content and/or NUE was found as potentially interesting for the following study. At the end of this basic screening, only one extract, named HA7, led to significantly higher dry weight and chlorophyll content of rapeseed after 30 days of supply to the roots. In order to better understand the HA7 effects on WOSR growth, a detailed characterization (elementary and hormonal composition) of this humic acid has been performed and coupled with transcriptomic (microarray), physiological, biochemical and light and electron microscopic analyses. This approach allowed the identification of specific genes or groups of genes that were up- or down-regulated when WOSR was treated with HA7. Furthermore, and to the best of our knowledge, this study is one of the pioneer works (Trevisan *et al.*, 2011, on *Arabidopsis thaliana*) that has used a specific *Brassica napus* microarray associated with a physiological approach to identify the main the metabolic pathways induced by humic acid.

II.2 Results

II.2.1 Humic acid (HA7) characterization

The first analysis made on HA7 was HPSEC to give clues about the molecular weight of the humic acid. As can be observed in the fig. IV.II-1A, the HPSEC chromatogram shows four peaks for HA7 that correspond to the four groups of different molecular weight presented in fig. 1B. The HA7 humic acid was composed of a mix of molecules ranging between $9.65 \cdot 10^2$ and $6.88 \cdot 10^4$ Da with a high representation (65%) of molecules between $1.41 \cdot 10^3$ and $5.07 \cdot 10^3$ Da. HA7 was therefor an extract with a relatively high molecular weight. To have a better view of HA7 composition, ^{13}C RMN analysis was used (fig. IV.II-2A). This characterization showed a high representation of aromatic C (42%) following by alkyl C (27.7%). This could explain the high molecular weight of the extract. To complete this analysis, biochemical characterization of HA7 was also undertaken.

Except for C, H and O, which are the main components (2.6%, 10.2% and 86.2% respectively), HA7 extract principally contains K, Na and S. Surprisingly, this humic acid did

Table IV.II-1 : Elemental nutrient composition of humic acid HA7 (†: determination by difference).

element	concentration (ppm)	element	concentration (%)
Ca	568	C	2.6
Cu	7.2	H	10.2
Fe	488	N	0
K	4912	O	86.2†
Mg	0		
Na	2172		
P	68		
S	1276		
Si	420		
Zn	1		

Table IV.II-2 : Hormonal composition of humic acid extract HA7. Value are expressed in pmol.g⁻¹. Phytohormones measured were auxin (IAA), abscisic acid (ABA) and cytokinins (Z: Zeatin, DHZ: dihydrozeatin, tZR: trans-zeatin, cZR: cis-zeatin, DHZR: dihydrozeatin riboside, iP: isopentenyladenine, iPR: isopentenyladenosine, BAR: benzyladenine riboside, mT: meta-topolin, mTR: meta-topolin riboside, oT: ortho topolin, oTR: ortho-topolin riboside). NC : Not detected.

phytohormone content	IAA NC	ABA NC	Z 4.68	DHZ NC	tZR 0.25	cZR 0.15	DHZR NC
phytohormone content	iP 1.51	iPR 1.39	BAR 0.23	mT NC	mTR NC	oT NC	oTR NC

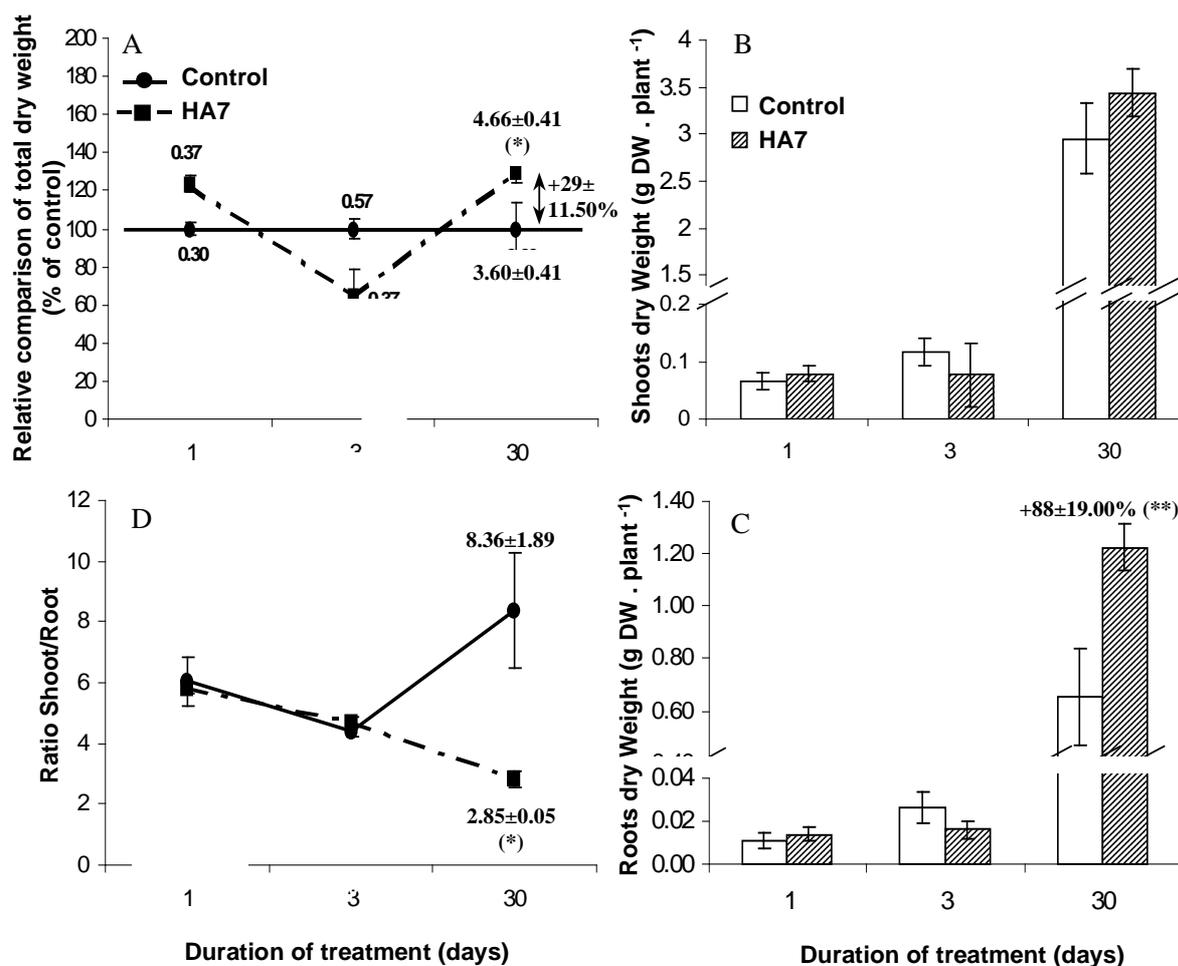


Figure IV.II-3 : Effect of humic acid on rapeseed dry weight (DW) after 1, 3 or 30 days of treatment. A. Relative comparison of total dry weight of treated plants (squares and dotted line) with control (circles and continuous line), in the percentage of control plants. Values near the points are the total DW expressed in g. B. Shoot DW of control (white histogram) and treated plants (hatched histogram), expressed in g.plant⁻¹. C. Root DW of control (white histogram) and treated plants (hatched histogram), expressed in g.plant⁻¹. D. Shoot/root ratio of control (circles and continuous line) and treated plants (square and dotted line). For all data, indicated values are means and vertical bars indicate \pm standard deviation for n=10 when exceeding the symbol. Significant differences at P<0.05 and P<0.01 are indicated by one and two asterisks, respectively.

Table IV.II-3 : Nutrient composition of Hoagland solution and HA7 contribution to the nutrient supply. Total uptake for each nutrient over 30 days shown as resulting from the nutrient solution (control) or from the nutrient solution and HA7 supply (treated).

element	Content in Hoagland solution (mg)	HA7 contribution (mg)	Control plant uptake (%)	HA7 treated plant uptake (%)
Ca	10000	113.60	7.65	12.26
Cu	10	1.44	3.60	6.29
Fe	1600	97.60	1.16	0.92
K	12200	982.40	9.28	13.64
Mg	2500	0	5.47	9.07
N	3498	0	39.62	62.26
Na	1606	434.40	0.43	1.06
P	2860	13.60	6.80	10.21
S	4440	255.20	7.82	14.03
Si	154	84.00	2.57	3.78
Zn	48	0.20	3.38	4.48

not contain significant N (Table IV.II-1). Concerning phytohormones, as can be observed in Table IV.II-2, no auxin (IAA) or abscissic acid (ABA) was detected in the HA7 extract. There were only very small amounts of certain cytokinins, such as Z (Zeatine), tZR (trans Zeatine), iP (isopentyladenine) and iPR (isopentyladenosine). However, these concentrations are too low to have physiological significance.

II.2.2 Growth analysis

In order to determine the impact of HA7 on plant growth, the relative total dry weight (DW, defined as a percentage of control plant dry weight) was monitored after 1, 3 and 30 days of treatment (Fig IV.II-3A). Fig. IV.II-3A shows that the addition of 100 ppm of organic carbon of HA7 humic acid in the root growth medium did not significantly affect the total DW of rapeseed after 1 or 3 days of treatment. Indeed, the total DW of control plants was 0.30 ± 0.03 g and 0.57 ± 0.02 g.plant⁻¹ after 1 and 3 days, respectively *versus* 0.37 ± 0.02 g and 0.37 ± 0.04 g.plant⁻¹ for treated plants at the same time of harvest. However after 30 days, plants treated with HA7 showed a significant increase of total DW (+29±11.50%) compared to control plants (3.60 ± 0.41 g.plant⁻¹ for control *versus* 4.66 ± 0.41 g.plant⁻¹). As shown in Figs. IV.II-3B and C, this increase in total DW could be explained by a significantly increased root DW (+88±19.00 % compared to control, Fig. IV.II-3C) after 30 days of treatment by HA7, the shoot DW (Fig. IV.II-3B) not being significantly affected by HA7 application.

At 30 days, this higher root DW than shoot DW resulted in a lower shoot/root ratio for treated plants compared to control plants (8.36 ± 1.89 and 2.84 ± 0.05 in control and treated plants respectively (Fig. IV.II-3D).

From these results, it can be hypothesized that supplemental mineral nutrients provided by the addition of HA7 are responsible for the enhanced dry weight of treated rapeseed. However, when the nutrient composition of the solutions was analyzed (Table IV.II-3), it appeared that HA7's contribution to the mineral supply of the Hoagland solution was negligible (from 0% for Mg to +14.4% for Cu, with notable contributions of Na: +27% and Si: +57%). Furthermore, regarding plant nutrient uptake by both control and treated plants (Table IV.II-3), the fraction taken up by the plants was always lower than 15% of the total nutrient supply, whichever the nutrient was considered. Thus, even in the controls, plants were not exposed to any limiting conditions and the increase in dry weight of treated

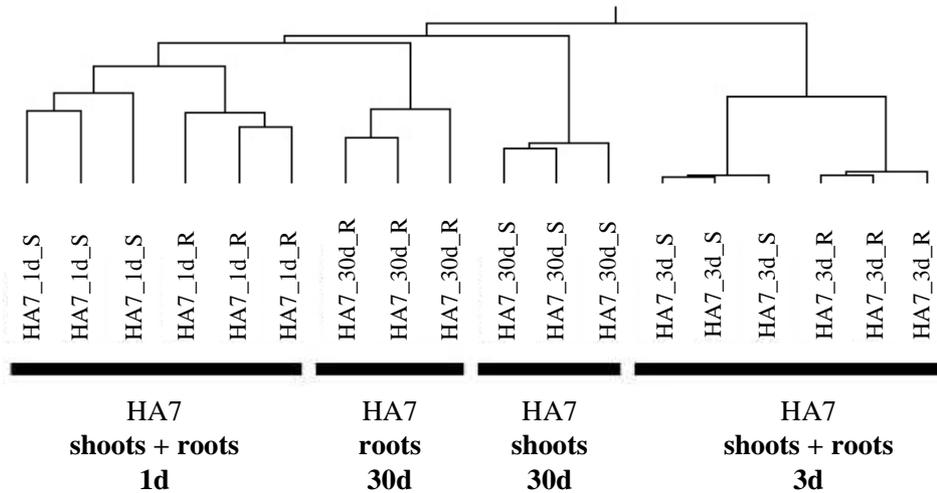


Figure IV.II-4 : Hierarchical clustering of microarray profiles. Profiles with the same name indicate the three experimental replicates for each time (1 day (d), 3 days and 30 days) of treatment with HA7 extract. Bold bars represent expression groups logically defined by the clustering.

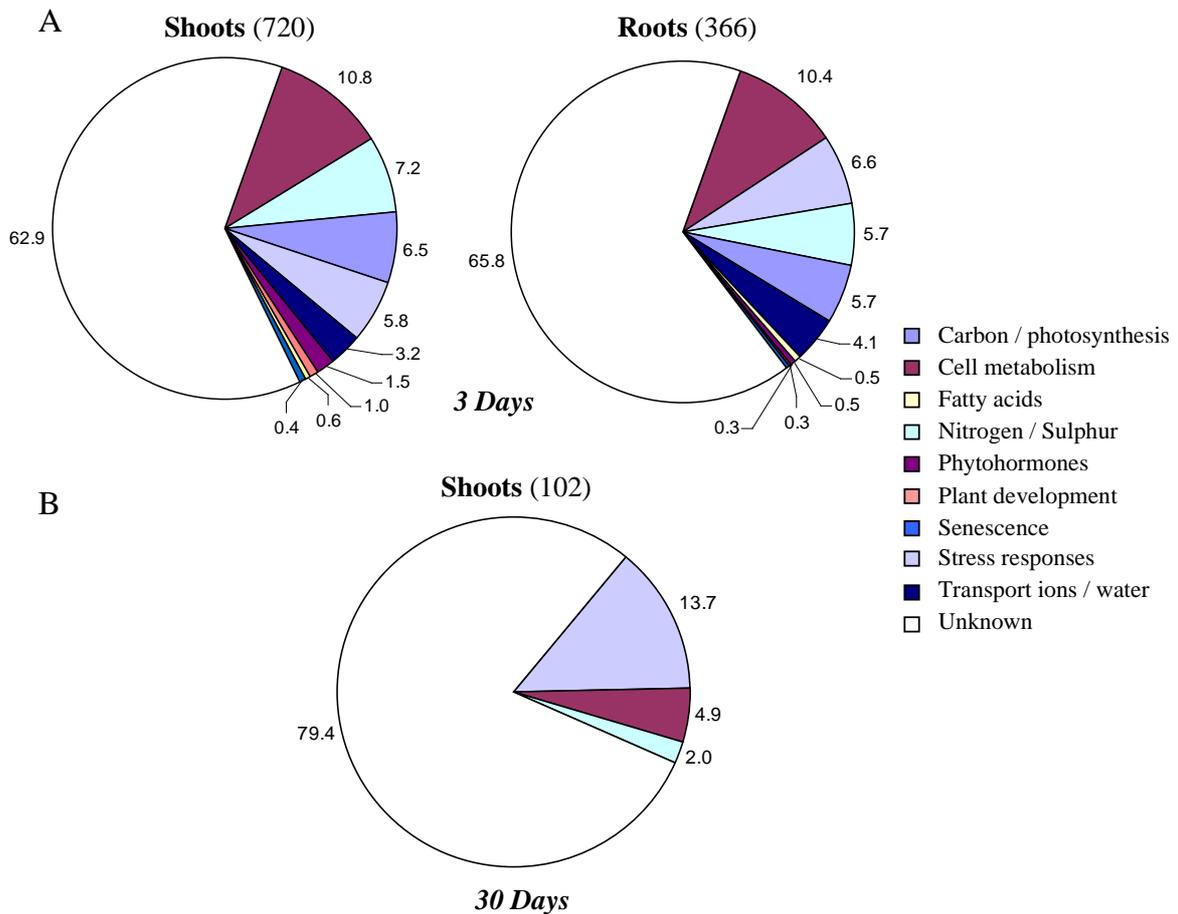


Figure IV.II-5 : Distribution among metabolic pathways (according to DFCI annotation) of genes differentially expressed in *Brassica napus* roots and shoots after 3 days (A) or in shoots after 30 days (B) of treatment with HA7. Numbers in parenthesis indicated the total number of genes differentially expressed in each conditions (each time of treatment and each part of the plant, $P < 0.05$). Numbers near pie charts indicated the percentage of differentially expressed genes implicated in each metabolic pathways.

rapeseeds did not result from the amelioration of any kind of starvation. However, it is evident that although the percentage value of nutrients taken up by plants was low, it was always higher for treated plants than for control plants. This suggests that HA7 stimulated uptake and/or assimilation of these nutrients.

II.2.3 Microarray data

Microarray analysis was performed with 3 replicates for each plant tissue (roots or shoots) and for each harvest time (1, 3 and 30 days). A total of 31 561 genes were analyzed on the microarray, creating an expression profile for each plant tissue and each time of treatment. Hierarchical clustering of these expression profiles (Fig. IV.II-4) shows that the 3 replicate profiles of each date x treatment were very close. The analysis of significantly and differentially expressed genes between control and treated plants was undertaken using a minimal fold change of expression of 5 (p-value <0.05). Using this filter, no differentially expressed genes were found in shoots and roots after 1 day of treatment. Moreover, 30 days of treatment with HA7 drastically lowered the number of differentially expressed genes (102 genes in shoots and no differentially expressed genes in roots, Fig. IV.II-5B). Accordingly, more than 300 genes were differentially expressed after 3 days of HA7 treatment (720 genes in shoots and 366 genes in roots, Fig. IV.II-5A).

All differentially expressed genes have been classified in metabolic pathways according to DFCI annotations (<http://compbio.dfci.harvard.edu>, Fig. IV.II-5). From this global classification, at first sight it appears that about 60% of the differentially expressed genes did not have a known function (supplemental data, Tables S1 and S2). However, the DFCI classification revealed that several metabolic pathways were affected by treatment (Fig. IV.II-5A and B). Among these, some metabolic pathways (such as fatty acids, phytohormones, senescence, plant development and ion transport) were represented in low numbers among the differentially expressed genes. In contrast, four metabolic pathways were more specifically affected in shoots and roots by the treatment (Figs. IV.II-5A and B): general cell metabolism (10.6% of the total differentially expressed genes on average), nitrogen and sulfur metabolism (6.6% on average), carbon metabolism and photosynthesis (6.1% on average) and stress responses (6.1% on average). Thus, according to our initial aim which was to target an improvement in nutrient use efficiencies (such as N and S) of WOSR following humic acid treatment, this study focused on N, S and C metabolisms (especially photosynthesis).

Table IV.II-4 : Partial list of differentially expressed shoots and roots genes involved in photosynthesis, and nitrogen and sulfur metabolisms after 3 days of treatment with HA7 extract. The first two letters of the gene description indicates the species. (At: *Arabidopsis thaliana*, Bc: *Brassica campestris*, Bj: *Brassica juncea*, Bn: *Brassica napus*, Bo: *Brassica oleracea*, Br: *Brassica rapa*, Ca: *Capsicum annuum*, Gm: *Glycine max*, Mc: *Mesembryanthemum crystallinum*, Me: *Manihot esculenta*, Th: *Thellungiella halophila*, Zm: *Zea mays*). Positive fold change indicates that the gene is specifically over-expressed in response to seaweed extract (orange boxes); negative fold change indicates that the gene is specifically repressed in response to seaweed extract (green boxes). Boxes marked with "-" (gray boxes) indicate genes with expression levels that are not significantly different from control. P-values are Bonferroni-corrected. Genes were considered as differentially expressed at a p-value <0.05.

pathways	GenBank Accession	Description	Shoots		Roots	
			Corrected p-value	Fold change	Corrected p-value	Fold change
nitrogen metabolism	NP181221	At - Gamma tonoplast intrinsic protein	0.008	6.329	0.014	8.861
	NM117202	At - Probable cysteine proteinase	0.010	6.839	0.023	13.704
	FJ376074	At - 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1	0.009	11.324	-	-
	NM127071	At - 3-ketoacyl-CoA synthase 8	0.010	8.626	-	-
	NM121798	Mc - 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	0.023	17.532	-	-
	AY128334	At - Anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase-like protein	0.019	7.734	-	-
	NP195197	At - Arginine decarboxylase	0.016	10.754	-	-
	NP195197	Bj - Arginine decarboxylase	0.008	16.085	-	-
	ES912832	At - Asparaginase	0.012	7.852	-	-
	NM180941	At - ASN2 (ASPARAGINE SYNTHETASE 2)	0.006	9.421	-	-
	DY022560	At - Aspartate kinase	0.008	5.415	-	-
	NM113299	At - dehydratase	0.017	6.293	-	-
	FJ830448	Bn - Epithiospecific modifier	0.013	11.084	-	-
	NM127123	At - Ferredoxin--nitrite reductase	0.014	9.552	-	-
	NP568304	At - L-aspartate oxidase-like protein	0.006	12.104	-	-
	Z21977	Bn - Myrosinase, thioglucoside glucosyltransferase precursor	0.032	6.500	-	-
	D38220	Bn - Nitrate reductase	0.007	24.507	-	-
	NM111869	At - Phenylalanine ammonia-lyase 4	0.010	7.018	-	-
	DQ341308	Bn - phenylalanine ammonia-lyase (PAL1-1)	0.009	5.937	-	-
	NM179668	At - Tyrosine decarboxylase 1	0.019	18.184	-	-
	NM121822	Gm - Glutamate dehydrogenase 1	-	-	0.015	8.023
	AK226564	At - Hydroxypyruvate reductase	-	-	0.015	8.024
	AB014076	Bn - Serine decarboxylase	-	-	0.025	9.059
	AF287143	Bn - UDP-glucose:sinapate glucosyltransferase	-	-	0.021	8.819
	AF454959	At - Cysteine proteinase RD19A	0.006	-11.424	0.020	-6.502
	CB686070	At - Glutamate-ammonia-ligase	0.008	-5.705	0.015	-7.883
	NM125345	At - 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1	0.009	-6.285	-	-
	NM120900	At - Agmatine deiminase	0.007	-7.641	-	-
	NP189073	At - Ammonium transporter 1 member 3	0.007	-6.369	-	-
	X77260	Bn - Aspartic protease	0.007	-7.916	-	-
	AM501059	St - Aspartic protease-like	0.007	-6.590	-	-
	BT000269	At - Branched-chain alpha keto-acid dehydrogenase E1 alpha subunit	0.014	-10.542	-	-
	NM119466	At - Coclaurine N-methyltransferase	0.009	-5.588	-	-
	U51119	Bc - Cysteine proteinase inhibitor	0.009	-5.785	-	-
	AF351125	At - Gamma-aminobutyrate transaminase subunit precursor	0.007	-5.759	-	-
	NP188895	At - GCN5-related N-acetyltransferase	0.014	-6.819	-	-
NM129089	At - Glycine cleavage system H protein	0.006	-6.533	-	-	
NP566700	At - Pyruvate transaminase	0.005	-5.967	-	-	
AF454959	Bo - Senescence-associated cysteine protease	0.007	-7.353	-	-	
AF089848	Bn - Senescence-specific cysteine protease	0.006	-86.773	-	-	
NM117360	At - Serine carboxypeptidase-like 20 precursor	0.009	-5.381	-	-	
FJ376074	Me - ACC oxidase ACCO2	-	-	0.018	-7.135	
Y10156	Bn - Myrosinase-associated protein	-	-	0.029	-6.084	
NM105992	At - Proteinase inhibitor	-	-	0.021	-9.366	
ES266717	Cp - Type I proteinase inhibitor-like protein	-	-	0.032	-76.806	
photosynthesis	EV125574	At - Carbonic anhydrase	0.011	5.469	0.024	6.674
	AY433944	Br - ELIP	0.007	8.541	0.016	11.503
	NM104775	At - Ferredoxin-2, chloroplast precursor	0.006	7.326	0.015	9.005
	AJ312190	At - Ferritin-3, chloroplast precursor	0.006	7.477	-	-
	NM104609	At - Glutamyl-tRNA reductase 1, chloroplast precursor	0.021	5.716	-	-
	EF011647	Th - Glucose 6-PiPi transporter	-	-	0.015	7.906
	NM100952	At - Alpha-glucan water dikinase 1, chloroplast precursor	0.006	-25.895	0.014	-6.388
	DQ118104	Bn - Plastid division regulator MinE	0.010	-26.014	0.039	-30.623
	NM102968	At - Alternative oxidase 4, chloroplast/chromoplast precursor	0.007	-5.083	-	-
	AF458411	At - Chaperone protein dnaJ 8, chloroplast precursor	0.008	-5.410	-	-
	GR444715	At - Chlorophyllase	0.006	-9.972	-	-
	AF337544	Bo - Chlorophyllase 1	0.007	-7.938	-	-
	AY433944	At - ELIP	0.006	-6.199	-	-
	NM120081	At - Glucose-1-phosphate adenyltransferase subunit, chloroplast precursor	0.008	-5.934	-	-
	NM113585	Bc - Light regulated protein-like protein	0.005	-152.275	-	-
	NM113585	Th - Light regulated protein-like protein	0.012	-225.357	-	-
	NM100115	At - Long hypocotyl in far-red 1	0.015	-42.290	-	-
	AY699948	Ca - Stay green protein	0.010	-10.253	-	-
EF011647	At - Glucose-6-phosphate/phosphate translocator 2, chloroplast precursor	-	-	0.042	-7.074	

Table IV.II-4 (continued)

pathways	GenBank Accession	Description	Shoots		Roots	
			Corrected p-value	Fold change	Corrected p-value	Fold change
sulfur metabolism	NM106018	At - Phosphoethanolamine N-methyltransferase 1	0.007	6.622	0.014	22.916
	DQ091257	Bn - Putative low affinity sulfate transporter	0.006	8.663	0.015	10.498
	U68218	At - ATP sulfurylase	0.012	8.469	-	-
	U68218	Bn - ATP sulphurylase	0.006	9.276	-	-
	AJ223499	Bj - ATP sulfurylase precursor	0.007	10.540	-	-
	NM104662	At - Glutathione S-transferase	0.009	5.441	-	-
	U59444	Bn - Myrosinase binding protein	0.010	5.349	-	-
	NM112510	At - Nitrile specifier protein 3 (NSP)	0.007	29.993	-	-
	NM111114	At - S-adenosylmethionine decarboxylase	0.006	8.422	-	-
	U63734	At - S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methyltransferase	0.008	7.940	-	-
	EV178474	At - Serine acetyltransferase	0.006	5.125	-	-
	AJ416461	Bn - Sulfate transporter (stp1 gene)	0.011	5.683	-	-
	AF411209	Bn - Glutathione peroxidase	-	-	0.015	6.019
	AJ311388	Bn - High affinity sulfate transporter 2 (st2 gene)	-	-	0.020	2.881
	EU004075	Bo - Myrosinase	-	-	0.018	5.307
	EV167226	At - S-adenosyl-methionine decarboxylase	0.020	-7.691	0.037	-7.307
	NM118319	At - APG8A	0.007	-5.814	-	-
	DQ059298	Bo - Epithiospecifier protein	0.009	-5.679	-	-
	AY299479	Bj - Glutathione S-transferase 4	-	-	0.031	-7.157
	NM104662	Zm - Glutathione S-transferase GST 40	-	-	0.014	-7.518
NM104662	At - Glutaredoxin-C10	-	-	0.015	-14.087	

Accordingly, non-exhaustive lists of genes involved in these metabolisms and differentially expressed after 3 days of contact with HA7 are detailed in Table IV.II-4.

Reflecting the results showed in Fig. IV.II-5, in Table IV.II-4 it appears that the number of genes differentially expressed in shoots was higher than in roots. Moreover, most of the differentially expressed genes were root-specific or shoot-specific, with only a few commons to the entire plant, whichever metabolic pathway was considered.

In shoots (Table IV.II-4), c.a. 50% of genes involved in nitrogen and photosynthetic pathways were up-regulated. Among the genes for nitrogen metabolism nitrate reductase (+24.507 fold), nitrite reductase (+9.552 fold) and genes involved in amino acid metabolism were found. Genes that were up-regulated in photosynthetic pathways were ferredoxin and ferritin, *i.e.* components of the electron transport chain. Among the genes that were down-regulated in nitrogen metabolism and photosynthetic pathways proteinases (-86.773 and -5.381 fold), chlorophyllases (-9.972 and -7.938 fold) and stay green protein (-10.253 fold) were found, *i.e.* genes implicated in chlorophyll catabolism during senescence. In contrast, 80% of genes involved in sulfate metabolism were up-regulated with a high representation of genes involved in sulfate uptake and assimilation (sulfate transporter, ATP sulfurylase and serine acetyltransferase).

Microarray analysis of roots (Table IV.II-4) revealed that, like shoots (Table IV.II-4), 50% of the differentially expressed genes were up-regulated for the three metabolisms considered. Similar to nitrogen metabolism in shoots, genes implicated in amino acid metabolism were up-regulated and senescence proteinases were down-regulated. In photosynthetic pathways, also in common with shoots, an up-regulation of ferredoxin and carbonic anhydrase was retained. However, a large down-regulation of the plastid division regulator, MinE, was observed (26.014 fold in shoots and 30.623 fold in roots after 3 days). Focusing on S metabolism in roots, expression of a sulfate transporter gene was up-regulated but it was a different one than in the shoots, while glutathione S transferase was down-regulated.

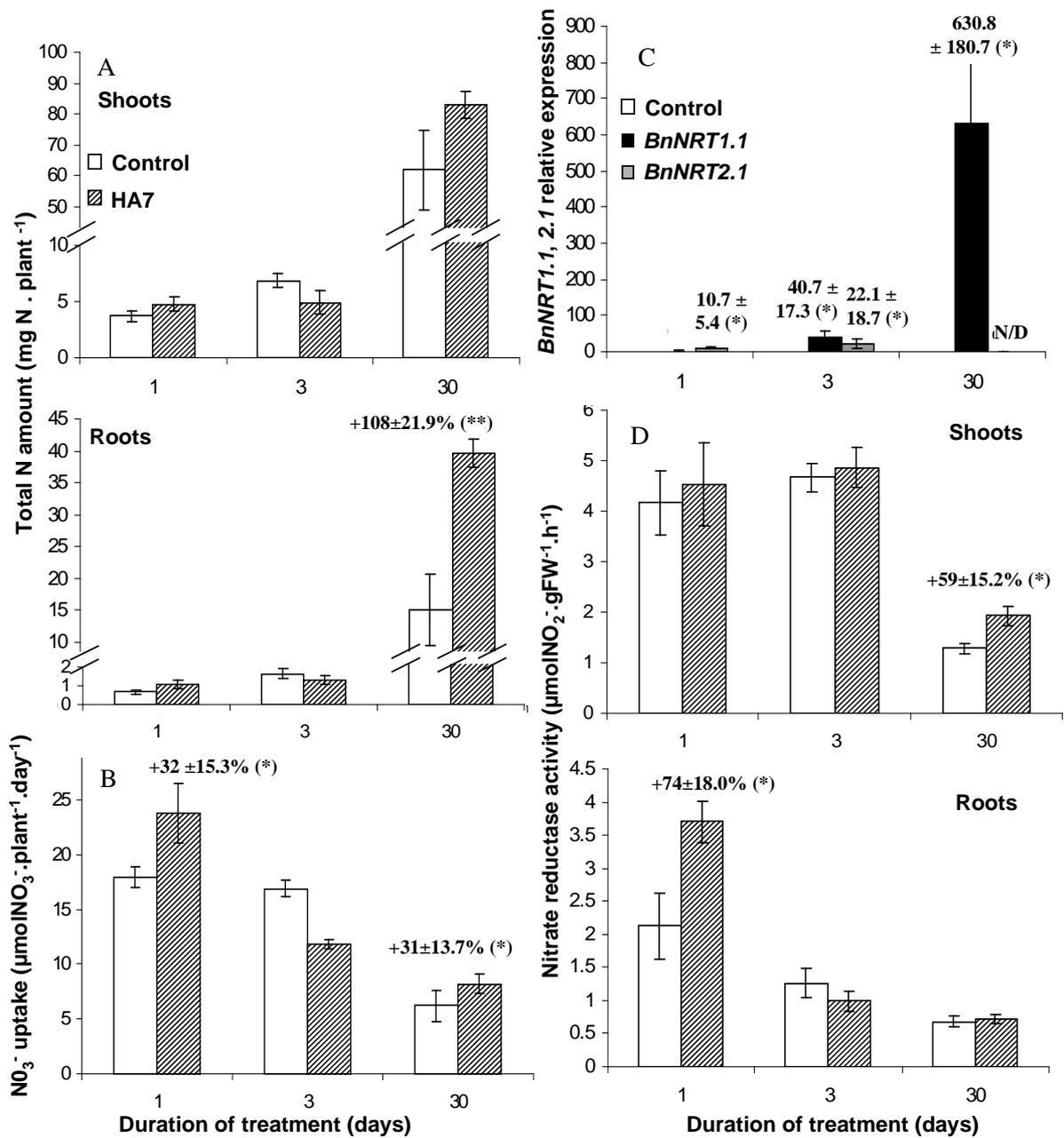


Figure IV.II-6 : Effects of HA7 extract on N metabolism. **A.** Total N amount in shoots and roots of control plants (white histogram) or treated plants with HA7 (hatched histogram). **B.** Net nitrate uptake. **C.** q-PCR analysis of the expression level of *BnNRT1.1* (black histogram) and *BnNRT2.1* (gray histogram), two genes encoding root transporters implicated in N uptake. For q-PCR analysis, control (white histogram, value 1) corresponds to the expression level of each gene in control plants at each time of harvest. **D.** *In vivo* nitrate reductase activity in shoots and roots of control (white histogram) and treated plants (hatched histogram). For all data, indicated values are means and vertical bars indicate ± standard deviation for n=10 when exceeding the symbol. Significant differences at P<0.05 and P<0.01 are indicated by one and two asterisks, respectively.

After 30 days of treatment with HA7, only one gene was differentially expressed in shoot in the chosen metabolic pathways (supplemental data, Table S2). It was an S-adenosylmethionine decarboxylase of the sulfur metabolic pathway, which was down-regulated 11.597 fold.

II.2.4 N metabolism

Microarray analysis highlights the up-regulation of genes encoding proteins involved in N metabolism (especially nitrate and amino acids). From these data, physiological and biochemical approaches have been developed to confirm the beneficial effect of humic acid extract on N metabolism of WOSR. Thus, in the first instance, the total amount of N in plants treated by humic acid extract has been compared to control plants (Fig. IV.II-6A). Secondly, the effects of humic acid extract on nitrate uptake (using $^{15}\text{NO}_3^-$, Fig. IV.II-6B), expression of two major nitrate transporters (*BnNRT1.1* and *BnNRT2.1*, Fig. IV.II-6C) and nitrate reductase activity in shoots and roots (Fig. IV.II-6D) were quantified. The total N amount in treated plants (Fig. IV.II-6A) showed that after 30 days, treatment with HA7 significantly affected the N content of plant roots. Thus, at days 30, the N content in roots of treated plants was significantly higher than in control plants ($+108\pm 21.9\%$), suggesting a higher nitrate uptake in response to humic acid treatment. Indeed, compared to control, plants treated by humic acid extract showed an increase of nitrate uptake (Fig. IV.II-6B) at day 1 and day 30 ($+32\pm 15.3$ and $+31\pm 13.7\%$, respectively). Because these last two data points were of the same order of magnitude as the increase in DW (Fig. IV.II-3), this suggested that N uptake followed the stimulation of growth. In the meantime (Fig. IV.II-6C), the *BnNRT2.1* expression level was increased by 10.7 ± 5.4 fold in 1-day treated plants and remained over-expressed at day 3 (22.1 ± 18.7 fold) but it was not detectable after 30 days of treatment while *BnNRT1.1* expression was more strongly induced later on (40.7 ± 17.3 and 630.0 ± 180.7 fold at 3 and 30 days respectively, Fig. IV.II-6C). Additionally, compared to control plants, nitrate reductase activity (Fig. IV.II-6D) increased significantly in roots after 1 day ($+74\pm 18.0\%$) and in shoots after 30d ($+59\pm 15.2\%$) of treatment. However, no nitrate accumulation in shoot or root tissues was detected in plants (data not shown).

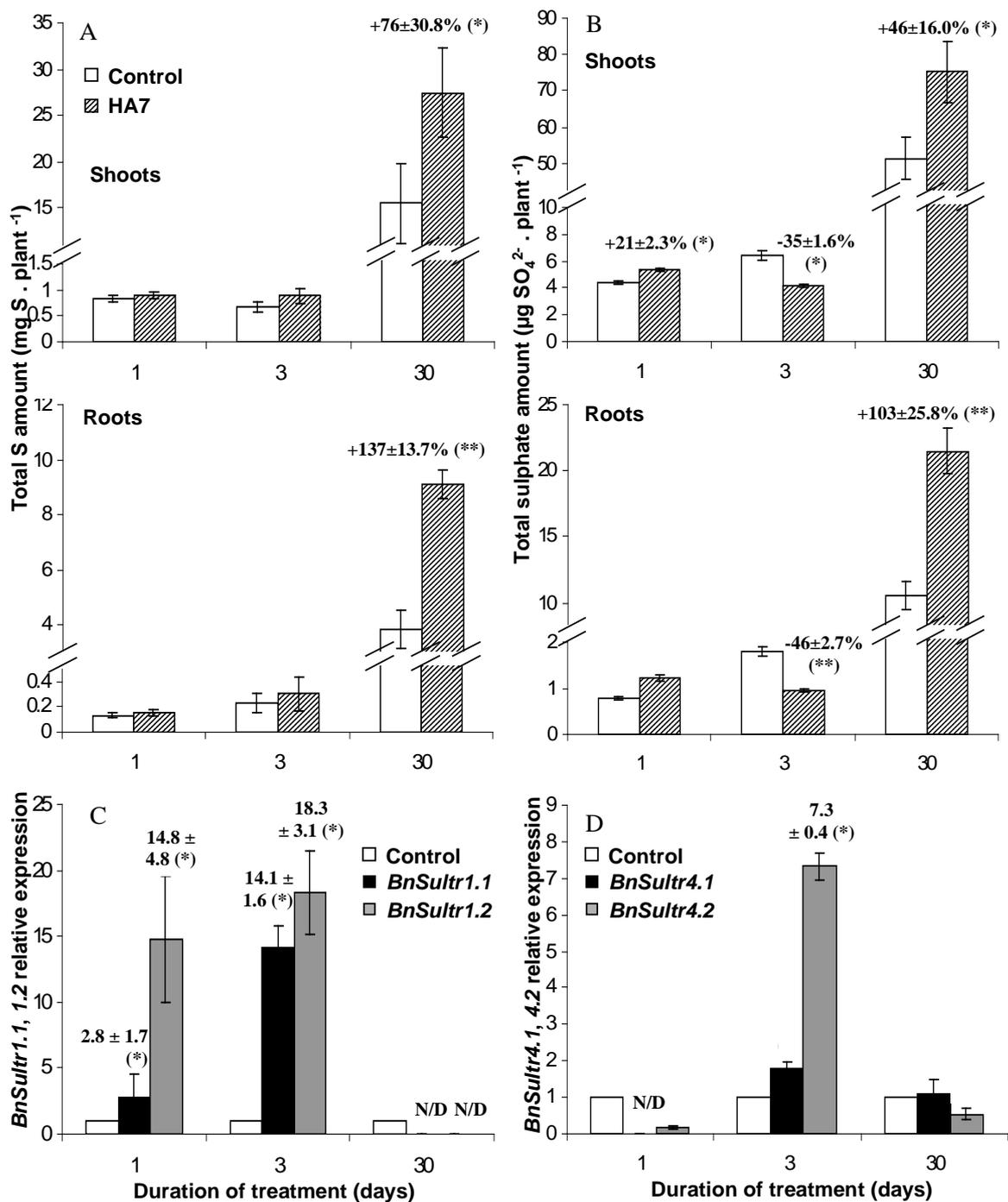


Figure IV.II-7 : Effects of HA7 on S metabolism. A. Total S amount in the shoots and roots of control plants (white histogram) or plants treated (hatched histogram) with HA7. B. Total sulfate content in the shoots and roots of plant control or treated with HA7. C. q-PCR analysis of the expression level of *BnSultr1.1* (black histogram) and *BnSultr1.2* (gray histogram), two genes encoding transporters involved in S uptake in roots. D. q-PCR analysis of the expression level of *BnSultr4.1* (black histogram) and *BnSultr4.2* (gray histogram), two genes encoding sulfate transporters involved in sulfate sequestration in shoot vacuoles. For q-PCR analysis, control (white histogram, value 1) corresponds to the expression level of each gene in control plants at each time of harvest. For all data, indicated values are means and vertical bars indicate ± standard deviation for n=10 when exceeding the symbol. Significant differences at P<0.05 and P<0.01 are indicated by one and two asterisks, respectively. N/D : not detected.

II.2.5 S metabolism

Microarray analysis highlighting the up-regulation of genes involved in sulfur uptake and assimilation, the total amount of S (Fig. IV.II-7A) and the sulfate content (Fig. IV.II-7B) have been quantified in roots and shoots. Moreover the expression levels of sulfate transporters, such as *BnSultr1.1* and *BnSultr1.2* genes (plasmalemmic transporters, Fig. IV.II-7C) and *BnSultr4.1* and *BnSultr4.2* genes (tonoplasmic transporters, Fig. IV.II-7D) were quantified in roots and shoots, respectively. The total S amount in treated plants (Fig. IV.II-7A) shows that treatment with HA7 resulted in significantly higher shoot ($+76\pm 30.8\%$) and root ($+137\pm 13.7\%$) S contents after 30 days of treatment. Unlike N, these data were higher than the magnitude of the DW increase (Fig. IV.II-3), suggesting a stimulation of sulfate uptake *per s.e.* (Fig. IV.II-7B). Indeed, the total sulfate amount in the plants (Fig. IV.II-7B) shows that treatment with HA7 resulted in accumulation of sulfate in shoots ($+21\pm 2.3\%$ and $+46\pm 16.0\%$ at 1 and 30 days respectively) and in roots ($+103\pm 25.8\%$ at 30 days) after 1 and 30 days of treatment but with a decrease at 3 days ($-35\pm 1.6\%$ and $-46\pm 2.7\%$ in shoots and roots respectively). In the meantime, compared to control plants, *BnSultr1.1* and *BnSultr1.2* (Fig. IV.II-7C) were induced after 1 and 3 days of treatment with HA7 (2.8 ± 1.7 fold and 14.1 ± 1.6 fold at 1 and 3 days respectively for *BnSultr1.1*; 14.8 ± 4.8 fold and 18.3 ± 3.1 fold at 1 and 3 days respectively for *BnSultr1.2*). Then after 30 days, the expression levels of both sulfate transporters were not detectable in plants. These data suggested an early stimulation of sulfate uptake by humic acid extract. Moreover, expression levels of *BnSultr4.1* and *BnSultr4.2* genes (Fig. IV.II-7D), encoding tonoplasmic transporters involved in vacuolar fluxes of sulfate, were induced only after 3 days of treatment (1.8 ± 0.2 and 7.3 ± 0.4 fold respectively).

II.2.6 Photosynthesis

Microarray analysis shows that, compared to control, some genes involved in carbon and photosynthesis pathways were differentially expressed in plants treated by humic acid extract. For example, in shoots, genes encoding the plastid division regulator, *AtMinE*, or *stay green protein (Srg)* were highly down-regulated by 26.014 and 10.253 fold respectively after 3 days (Table IV.II-4). In contrast, genes like ferredoxin NADP reductase or carbonic anhydrase presented an up-regulated profile (Table IV.II-4). To complete this analysis, relative chlorophyll content (Fig. IV.II-8A) and net photosynthetic rate (Fig. IV.II-8B) were

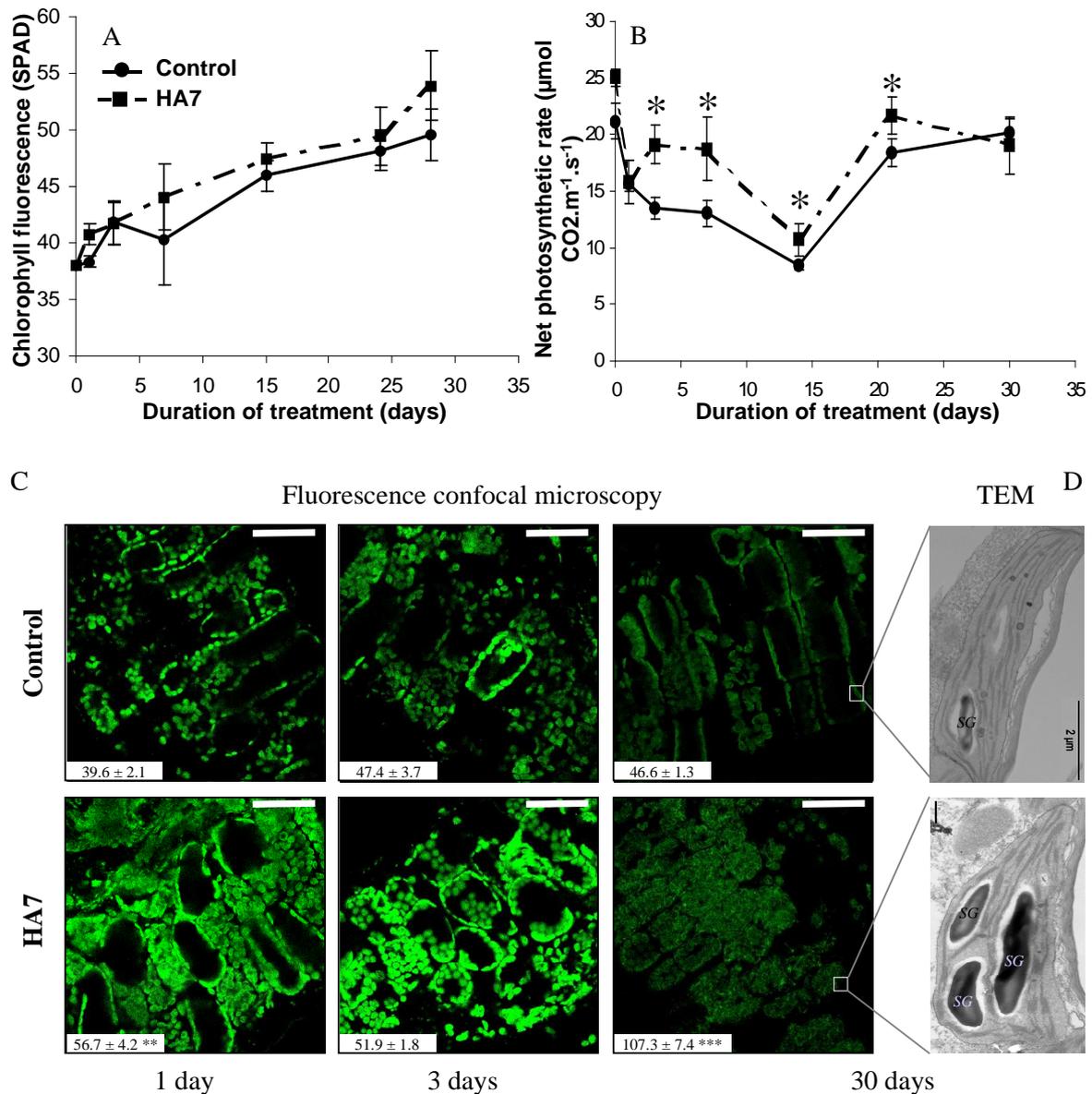


Figure IV.II-8 : Effects of HA7 on chloroplasts and photosynthesis. **A.** Chlorophyll content in leaves from control plants (continuous line) or treated plants (dotted line) measured by SPAD. **B.** Kinetics of the net photosynthetic rate from control (continuous line) or treated leaves (dotted line). Value **C.** Fluorescence confocal microscopy of chloroplasts of controls or plants treated with HA7 after 1, 3 and 30 days of treatment. Bars represent a scale of 50 µm on the images. Numbers of chloroplasts per cell are indicated in the white square and are the means ± standard deviation for n=10 cells. **D.** Transmission Electron Microscope (TEM) observations of chloroplasts from control (top) or from leaves treated by humic acid (bottom) over 30 days. Black bars represent a scale of 2 µm. SG: starch granules. For A and B, results are means ± standard deviation for n=5 leaves with 10 measurements per leaf. Asterisks represent the result of the Student's test at p<0.05 for *, p<0.01 for ** and p<0.001 for ***.

measured. No significant difference was observed between control and HA7-treated plants for chlorophyll relative content. However, HA7-treated plants presented significantly higher net photosynthetic rates between 3 and 21 days of treatment ($+41\pm 1.7\%$, $+42\pm 2.8\%$, $+23\pm 1.4\%$ and $+20\pm 1.6\%$ at 3, 7, 15 and 21 days of treatment respectively). Therefore microarray analysis, chlorophyll content and the net photosynthetic rate seems to give contradictory results. Thus, confocal microscopy was used to observe chloroplast numbers in mature leaf cells from treated or control plants (Fig. IV.II-8C). After 1 and 30 days of treatment, HA7 application significantly increased the number of chloroplasts per cell ($+43\pm 10.7\%$ and $+130\pm 15.8\%$ at 1d and 30d respectively). Indeed, in cells from control plants, the number of chloroplasts was relatively constant during the experiment (39.6 ± 2.1 , 47.4 ± 3.7 and 46.6 ± 1.3 at 1d, 3d and 30d, respectively). In leaf cells from treated plants, whatever the duration of treatment, the number of chloroplasts was always higher than controls (56.7 ± 4.2 , 51.9 ± 1.8 and 107.3 ± 7.4), suggesting a very early stimulation of the chloroplast division process in response to the humic acid extract. In order to estimate the potential humic acid effect on chloroplastic ultrastructure, transmission electronic microscopy (TEM) was performed after 30 days of treatment (Fig. IV.II-8D). Compared to the ultrastructure of chloroplasts from control plants, TEM showed no effect of HA7 application on thylakoids and grana organization, but an enhancement of the number and the size of starch granules suggesting an accumulation of carbohydrate compounds in chloroplasts in response to treatment.

II.3 Discussion

Winter oilseed rape (WOSR, *Brassica napus*) is characterized by a very low N recovery in seeds as well as a significant requirement for sulfur, and therefore requires a high rate of fertilization to maintain high yield. This has led to a defective agro-environmental balance that could be improved by increasing nutrient use efficiency. Biostimulants may be used as a tool to improve the balance of rapeseed culture. Humic acids have long been known to enhance plant growth and increase yield. More recent studies on the actions of humic extract in plants have revealed that they induce an accelerated development cycle (Tejada and Gonzalez, 2004; Arancon *et al.*, 2005; Eyheraguibel *et al.*, 2008) and enhanced nutrient uptake, especially for N (Dell’Agnola and Nardi, 1987; Pinton *et al.*, 1999; Nardi *et al.*, 2000b), iron (Cesco *et al.*, 2002) and micronutrients (Ayuso *et al.*, 1996; Garcia-Mina *et al.*, 2004; Eyheraguibel *et al.*, 2008). Moreover, treatments with humic extract have been reported to protect plants against biotic (Edwards *et al.*, 2010) and abiotic stresses (Liang *et al.*, 2005;

Lakhdar *et al.*, 2008). Thus, the aim of this study was to identify a new and finely characterized humic acid that could increase growth and mineral nutrition of WOSR in order to reduce fertilizer use.

From a previous set of screening experiments (data not shown), HA7 extract was selected from ten humic acids extracts. Only HA7 promoted a significantly higher growth rate and leaf chlorophyll content compared to control non-treated rapeseed. Its effects were confirmed in the present experiment on total DW ($+29\pm 11.5\%$), and more specifically root DW ($+88\pm 19.0\%$) (Fig. IV.II-3). This growth promotion by seaweed extract has been already reported by several authors and for different species, such as *Arabidopsis thaliana* (Schmidt *et al.*, 2007), barley (Ayuso *et al.*, 1996), cucumber (Mora *et al.*, 2010), maize (Canellas *et al.*, 2002; Zandonadi *et al.*, 2007) and tomato (Atiyeh *et al.*, 2002). Most studies have hypothesized that the observed effects in treated plants were the result of hormone-like activity by humic acids (Quaggiotti *et al.*, 2004; Muscolo *et al.*, 1998, 2007b). However, phytohormone analysis (Table IV.II-1) did not reveal any significant level of hormones (AIA, cytokinin, gibberellin...) in HA7 extract. Moreover, its mineral contribution to the nutrient solution was negligible compare with Hoagland solution alone (Table IV.II-3). Thus from our results, it cannot be postulated that known endogenous hormones and nutrients supplied from HA7 triggered the promotion of growth. However, these results cannot exclude *de novo* phytohormone synthesis in plants.

Therefore, to identify HA7 metabolic targets in plants, we used a microarray analysis specific for *Brassica napus* that allowed the analysis of 31 561 genes. Nevertheless, most of these genes were not previously identified (Fig. IV.II-5) due to the lack of complete sequencing of the *Brassica* genome. However, from the identified genes, which accounted for about 40% of gene expression analyzed after 3 days of contact with HA7, the expression of about one thousand known genes was significantly affected. Yet, after 30 days of contact with HA7, only one hundred of these genes remained differentially expressed (Fig. IV.II-5). Thus, this high number of differentially expressed genes reflects an early and substantial effect of HA7 at the molecular level that influenced almost all plant metabolic pathways. These results are in accordance with Tresivan's study (2011) on *Arabidopsis thaliana*, where, after 120 min of contact with an earthworm-originating humic acid, the expression of 133 genes was changed in comparison with untreated control plants. Indeed, using DCFI annotation, HA7 affected genes could be classified in nine clusters covering the major metabolic functions of

plants: carbon and photosynthesis, general cell metabolism, fatty acids, nitrogen/sulfur, phytohormones, plant development, senescence, responses to stress and transport of ions and water. Among these pathways, the most affected by HA7 application after 3 days of contact concerned carbon and photosynthesis, cell metabolism, nitrogen/sulfur and responses to stress (Fig. IV.II-5). Many studies in the literature have already focused on these two latter metabolic pathways, but mostly only from a physiological point of view (Pinton *et al.*, 1999; Nardi *et al.*, 2002a; Edwards *et al.*, 2010; among others). We have therefore focused our study on photosynthesis and nitrogen and sulfur metabolism. Furthermore, to corroborate microarray analysis, we choose to compare these results not only with physiological analyses but also with more precise q-PCR analyses of selected genes.

Overall, microarray analysis highlighted the enhancement of gene expression related to N and S metabolism and more particularly on identified genes that encode proteins involved in uptake and assimilation (Table IV.II-4). However, physiological analyses also gave access to more precise interpretation of data. For N metabolism (Fig. IV.II-6), increases in NO_3^- uptake ($+31 \pm 13.7\%$) and N content ($+108 \pm 21.9\%$ in roots) were of the same order of magnitude as the DW increase ($+88 \pm 19.0\%$ in roots). Moreover, q-PCR analysis of the expression of the *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* genes encoding nitrate transporters showed an induction of these genes in roots from treated plants. Surprisingly, these changes were not revealed by microarray analysis. However, nitrate transporters are a very large family of genes (Daniel-Vedele *et al.*, 1998) and a BLAST analysis showed that the nitrate transporter probes used on microarrays are weakly specific for the *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* isoforms. All these data suggest that supplemental N taken up by the roots of treated plants was directly assimilated in relation to the growth rate without being stored (enhancement of nitrate reductase enzymatic activity, Fig. IV.II-6D and no N or nitrate content enhancement, data not shown). It must be pointed out that expression of *NRT1.1* was strongly induced by HA7, while recent results suggest (Castaings *et al.* 2011, Krouk *et al.* 2010) that this gene may have a role in N sensing as well as in auxin transport, ultimately having an effect on lateral root growth, a process that was also largely stimulated by HA7 (Fig. IV.II-3C).

In contrast, for S metabolism (Fig. IV.II-7), the S content after 30 days ($+76 \pm 30.8$ and $137 \pm 13.7\%$ in shoots and roots respectively) increased more than dry matter and resulted in enhanced sulfate content ($+46 \pm 16.0$ and $+103 \pm 25.8\%$ in shoots and roots respectively). This has also been related to an increased expression of the main root and tonoplasmic sulfate

transporter genes (Fig. IV.II-7) alongside an enhancement of assimilatory gene expression (Table IV.II-4). These results are in agreement with previous works that showed an enhanced nitrate uptake in response to humic acid treatment (Dell'Agnola and Nardi, 1987; Pinton *et al.*, 1999; Nardi *et al.*, 2000b; Keeling *et al.*, 2003; Eyheraguibel *et al.*, 2008) in Bermuda grass (*Cynodon dactylon*), maize, wheat and oilseed rape. In addition, the enhanced activity of genes involved in nitrate transport that were found in this study has also been reported in maize (Quaggiotti *et al.*, 2004). As N is increased by the addition of HA7 to the nutrient solution (Table IV.II-1), enhancement of N uptake in response to treatment is possibly only a consequence of growth promotion and more specifically of lateral root development. Focusing on S metabolism, Eyheraguibel *et al.* (2008) demonstrated that maize presented an increase in S accumulation in roots in response to humic acid treatment. These results are in accordance with our study where HA7 seems to have a direct and early effect on sulfate uptake, assimilation and storage. The latter suggests that S metabolism was increased more than the growth rate and that the S supply exceeded demand for growth.

The second axis of our study focused on carbon assimilation by photosynthesis. In our work, no significant effect was found on chlorophyll content (Fig. IV.II-8A), although an increase has been reported in rice in response to humic acid (Tejada and Gonzalez, 2004). However, net photosynthetic rate measurements (Fig. IV.II-8B) showed an increased activity for HA7-treated plants between 3 and 21 days of contact with the extract. Likewise, the microscopic observations (Fig. IV.II-8C) showed that, in response to HA7, chloroplasts produce higher quantities of starch compared with control non treated plants after 30 days of contact. These results suggest that HA7 has an effect not only on the clear phase of photosynthesis (net photosynthesis measurement at 1000 $\mu\text{mol PAR}$) but it also enhanced the dark phase of photosynthesis (carbon fixation and starch synthesis). To support this hypothesis, the microarray results showed that genes involved in carbon fixation (Table IV.II-4 and Supplemental Table S1 and S2) were mostly up-regulated after 3 days of treatment with HA7. For example, carbonic anhydrase, a zinc-requiring enzyme, catalyzing the reversible hydration of carbon dioxide and thus facilitating its transfer and fixation (Ramanan *et al.*, 2009), is up-regulated 5.469 fold in shoots and 6.674 fold in roots after 3 days of treatment. Carbonic anhydrase is important in photosynthesis and respiration as it participates in the transport of inorganic carbon to actively photosynthesizing cells and away from actively respiring cells (Moroney *et al.*, 2001). Therefore, the enhanced gene expressions of this protein that was shown by microarray analysis could explain the increased carbon fixation

suggested by the large numbers of starch granules observed by microscopy in HA7-treated plants (Fig. IV.II-8D).

Furthermore, confocal microscopy observations showed a clear effect on the number of chloroplasts per cell from 1d of contact with HA7 extract (Fig. IV.II-8). Okazaki *et al.* (2009) obtained similar results with *Arabidopsis thaliana* in response to exogenous application of cytokinins. According to these authors, plastid division components of chloroplasts were under control of a cytokinin-responsive transcription factor. Consequently, application of cytokinins enhances chloroplast division and increases the number of chloroplasts per cell. In our study, only one “plastid division component” was found on the microarray, the “plastid division regulator MinE”, but it was clearly down regulated in response to HA7 treatment after 3 days of contact. However, the literature on this gene provides contradictory results. Itoh *et al.* (2001) showed that over-expression of MinE in *Arabidopsis thaliana* resulted in cells containing only one giant chloroplast. Kojo *et al.* (2009) obtained the same phenotype with an *AtMinE* deficient mutant (2,000-fold reduced MinE expression compared with wild type). The second aspect of the Okazaki study (2009) was the role of exogenous cytokinin in chloroplast division. However, no significant levels of phytohormone have been detected in HA7. Thus, this suggests that either HA7 acts on chloroplasts in a different way than phytohormones or that HA7 can induce early phytohormone biosynthesis in plants. To support this second hypothesis, the microarray results in the present study showed that genes involved in cytokinin and gibberellin metabolisms were up regulated in shoots after 3 days of contact with HA7 (supplemental data, Table S1).

These results suggest that the first events to occur after HA7 application to plants was an increase in chloroplast number per cell, in parallel with the enhancement of root nitrate uptake ($+32\pm 15.3\%$) and increases in expression of the root nitrate transporter *BnNRT2.1* (10.7 ± 5.4 fold after 1d, Fig. IV.II-6) as well as the sulfur transporters *BnSultr1.1* (2.8 ± 1.7 fold after 1d, Fig. IV.II-5) and *BnSultr1.2* (14.8 ± 4.8 fold after 1d, Fig. IV.II-7). These first responses were followed by sulfate accumulation in shoots and even a greater number of chloroplast over the time of treatment. Because chloroplasts were the first organelles affected during senescence, it could be assumed that the increase in the number of chloroplasts in HA7-treated plants would promote a delay of senescence and extend the life span of leaves. Indeed, previous works has shown for WOSR that an increase in leaf life span would allow a

better synchronism between N-remobilization associated with leaf senescence and seed filling (Rossato *et al.*, 2001; Malagoli *et al.*, 2005) and improved NUE of this crop. This hypothesis was also supported by the microarray analysis that revealed up-regulation of some genes encoding protease inhibitors and down regulation of stay green protein (Srg) that are able to limit leaf protein degradation (Etienne *et al.*, 2007; Desclos *et al.*, 2008) and protect chlorophyll degradation (Park *et al.*, 2007) during leaf senescence, respectively. According to this work, it could be assumed that chloroplast modifications could act on the duration of leaf senescence and the leaf life span and allow an improvement in the NUE of WOSR. Thus, the humic acid reported here could be especially relevant to augment or substitute the fertilizers actually used and improve the agro-environmental balance of WOSR.

II.4 Conclusion

This study combining microarray and physiological analyses to explain effects on WOSR growth gives clues about the metabolic targets of humic acid. Physiological analyses confirmed microarray results of the activation of nitrogen and sulfur absorption and assimilation. Enhancement of N, C and S assimilation could explain increased growth of plants treated with HA7 humic acid. Furthermore, in addition to measurements of an enhanced net photosynthetic rate, microscopy observations showed a clear and early effect of HA7 on the chloroplast numbers per cell and the number of starch granules. However, more analyses should be carried out for further determinations of the humic acid metabolic target. For example, *in planta* phytohormonal measurement could help determine HA7 effects on chloroplasts and also to better understand the regulation of metabolic pathways. Moreover, enhanced nutrient assimilation alone could not account for the total improvement in the WOSR agro-environmental balance, so further explorations of nutrient remobilization should be undertaken. Furthermore, some genes involved in different metabolic pathways (such as responses to stress and senescence) were up- or down-regulated in response to HA7 treatment (supplemental data, Tables S1 and S2) and remain to be studied to improve our knowledge of the effects of humic acids on plant physiological processes.

II.5 Materials and Methods

II.5.1 Growth conditions and experimental design

Seeds of *Brassica napus* var. Capitol were surface-sterilized by exposure to 80% ethanol for 30s followed by 20% sodium hypochlorite for 10 min. After 10 washes with demineralized water, seeds were germinated on perlite over deionized water for 2d in the dark and 1 week in the light in a greenhouse. Just after first leaf emergence, seedlings were transferred to a 20L plastic tank containing nutrient solution with the following composition: KNO₃ 1mM, CaCl₂ 1.25 mM, KCl 250, KH₂PO₄ 0.25 mM, MgSO₄ 0.5 mM, EDTA-2NaFe 0.2 mM, H₃BO₃ 14 μM, MnSO₄ 5 μM, ZnSO₄ 3 μM, CuSO₄ 0.7 μM, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 0.7 μM and CoCl₂ 0.1 μM. This nutrient solution was renewed every two days. Plants were grown under greenhouse conditions with a thermoperiod of 20°C/17°C day/night and a photoperiod of 16h. Natural light was supplemented with high pressure sodium lamps (Philips, MASTER Green Power T400W) supplying an average photosynthetically active radiation of 280 μmol photons.m⁻².s⁻¹ at canopy height. Plants were grown for one week before treatment with HA7 humic extract.

II.5.2 Humic acid (HA7) sample preparation and characterization.

Method of preparation of the humic acid (HA7) sample. The humic sample (HA7) was principally obtained from black peat (Galicia, Spain). The methodology for the extraction and purification used was as indicated by the International Humic Substances Society (IHSS) (Swift, 1996), and described in Aguirre *et al.* (2009).

In order to dissolve the HA7 sample and obtain the protoned form we used the following methodology. Briefly, 100 g of a previously purified HA7 presented as potassium humate were mixed with 1500 ml of 0.1 M NaOH in a 2 L flask. After 48 h of stirring at 25°C in darkness, the supernatant containing the unfractionated humic extract was separated from the solid fraction by centrifugation at 7650 g for 30 min. The HA7 sample was dissolved was carried out under an inert atmosphere (N₂). The HA7 was obtained by acidifying an aliquot of the alkaline extract containing the HA7 and fulvic substances with 6M hydrochloric acid (HCl) to a pH of 1.5. After 12 h, the acidified sample was centrifuged at 7650 g for 30 minutes in order to separate the precipitated HA7 from the supernatant containing fulvic acids and other acid-soluble organic compounds. After washing with water to eliminate Cl⁻ contamination, HA7 was freeze-dried.

Elemental analysis. The carbon, hydrogen and nitrogen concentrations of the lyophilized samples were analysed in duplicate with a LECO CHN 900 analyser. The oxygen concentration was calculated by difference.

Solid-State ^{13}C NMR Spectroscopy. Solid-state ^{13}C NMR spectra were obtained by employing a Bruker Avance AV-400WB (9.4 T) spectrometer at 100.47 MHz, using the cross-polarization magic angle spinning technique (CPMAS), with a spinning speed of 12 kHz, 90° pulse width, 30 ms acquisition time, and 4.0 s delay.

Size exclusion chromatography study. The HA7 molecular size distribution was assessed by means of size-exclusion chromatography (HPSEC) as described in Baigorri *et al.* (2007). The chromatographic system consisted of a Waters 600 Controller pump followed by two detectors in series: a Waters 996 Photodiode Array Detector set at 400 nm, and a Waters 2424 Refractive Index Detector (RI). Size exclusion separation occurred through a PL Aquagel-OH 30 column (Polymer Laboratories), followed by a guard column with the same stationary phase.

For each sample, solutions of 800 mg L^{-1} of organic carbon were prepared in 0.05 M NaNO_3 . The injection volume of all samples was 100 μL , the eluent used was 0.05 M NaNO_3 (pH 7), and the flow rate was 1 mL/min. Void volume ($V_0 = 6.65 \text{ mL}$) and permeation volume ($V_p = 11.82 \text{ mL}$) were determined with polyethylene oxide with a molecular weight (MW) of 43250 Da and methanol, respectively.

In order to evaluate an approximate MW distribution from HPSEC chromatograms for HA, a universal calibration was carried out using polyethylene glycol and polyethylene oxide standards of known MW as described in Baigorri *et al.* (2007).

^{13}C RMN characterization of HA7. Solid-state ^{13}C RMN spectra were obtained on a Bruker Avance AV-400WB (9.4 T) spectrometer at 100.47 MHz using the cross-polarization magic angle spinning technique (CPMAS), with a spinning speed of 12 kHz, 90° pulse width, 30 ms acquisition time and 4.0 s delay.

HPSEC characterization of HA7. The molecular size distribution was evaluated by high performance size exclusion chromatography. The chromatographic system consisted of a Waters 600 Controller pump followed by two detectors in series: a Waters 996 Photodiode Array Detector set at 400 nm, and a Waters 2424 Refractive Index Detector (RI). Size

exclusion separation occurred through a PL Aquagel-OH 30 column (Polymer Laboratories), followed by a guard column with the same stationary phase. The overall molecular weight range of separation for this column was 100–300,000 Da.

For each sample, solutions of 800 ppm of carbon were prepared in 0.05 M NaNO₃. The injection volume of all samples was 100 µl, the eluent used was 0.05 M NaNO₃ (pH 7), and the flow rate was 1 ml/min. Void volume ($V_0 = 6.65$ ml) and permeation volume ($V_p = 11.82$ ml) were determined with polyethylene oxide of MW of 43,250 Da and methanol, respectively.

In order to evaluate an approximate MW distribution from HPSEC chromatograms for HS samples, a universal calibration was carried out. Curves of $\log J$ vs. elution volume were obtained using polyethylene glycol and polyethylene oxide standards of known MW. The parameter J is defined as the product of the intrinsic viscosity $[\eta]$ and the molecular weight ($J_i = [\eta]_i M_i$), and it is proportional to the hydrodynamic volume. This means that two macromolecules with the same hydrodynamic volume will have equal J values.

The Mark-Houwink-Sakurada equation relates $[\eta]$ to MW as follows:

$$[\eta] = K M^a$$

where K and a are proper constants for each macromolecule, solvent and temperature. In this study we have used the values of K and a reported by Visser (1985) for a soil humic acid ($K = 2.724 \times 10^{-2}$ mL g⁻¹ and $a = 0.45$).

Analysis of the concentration of IAA, ABA and Cytokinins in HA7. The general method is extensively described in Aguirre et al (2009) and Mora *et al.* (2010). As an example we describe the method used for IAA determination.

Extraction, purification and determination procedures for indole acetic-acid (IAA) by HPLC MS/MS: The isolation and purification of IAA in humic samples were carried out using the following methodology:

A 0.1 g amount of frozen HA7 (previously triturated in a mortar to a powder with liquid nitrogen) was homogenized with 5 mL of precooled (-20°C) methanol-water (80:20, v/v). Deuterium-labelled internal standard (2H5IAA, Olchemim, Olomouc, Czech Republic) was added (40 µL of a stock solution of 200 ng/mL of standard in methanol) to the extraction medium. After overnight extraction at -20°C, solids were separated by centrifugation (12000

rpm, 10 minutes, 4 °C) and re-extracted for 1 hour with an additional 4 mL of extraction mixture. Supernatants were passed through a Sep-Pak Plus tC18 cartridge (ref. WAT054925, Waters Co., Milford, MA) preconditioned with 2 mL of methanol followed by 2 mL of extraction medium. After evaporation to near dryness using a vortex evaporator, IAA was extracted with two portions of diethyl ether, of 5 and 4 mL respectively, and afterwards the organic phase was evaporated. The residue was re-dissolved in 200 µL of methanol-0.5% acetic acid (30:70, v/v) before its injection in the LC/MS/MS system.

Liquid Chromatography-Mass Spectrometry quantification of IAA: Indole-acetic acid was quantified by HPLC linked to a 3200 Q TRAP LC/MS/MS system (Applied Biosystems/MDS Sciex, Ontario, Canada), equipped with an electrospray interface, using an reverse-phase column (Synergi 4µ Hydro-RP 80A, 150x2 mm, Phenomenex, Torrance, CA). A linear gradient of methanol (A) and 0.5% acetic acid in water (B) was used: 35% A for 1 min, 35% to 95% A in 9 min, 95% A for 4 min and 95% to 35% A for 1 min, followed by a stabilization time of 5 min. The flow rate was 0.20 mL/min, the injection volume was 50 µL and the column and sample temperatures were 30°C and 20°C, respectively.

The detection and quantification were performed by multiple-reaction monitoring (MRM) in the negative-ion mode, employing a multilevel calibration graph with deuterated hormone as internal standard. The monitored fragmentation processes are described in Aguirre *et al.* (2009).

The source parameters were curtain gas: 25.0 psi, GS1: 50.0 psi, GS2: 60.0 psi, ion spray voltage: -4000 V, CAD gas: medium, and temperature: 600°C.

II.5.3 Plant treatment

After one week of growth, plants were separated in two sets: (i) control plants (control) were grown in the nutrient solution described above with ¹⁵N labeling (3% atom excess) and (ii) treated plants (HA7) grown in the same labeled solution supplied with HA7 humic acid at 100 ppm of organic carbon.L⁻¹. Nutrient solutions were renewed every two days. Each set of plants (control and HA7) was grown for 30 days and time courses in the experiment were expressed in days after the beginning of treatment (Day 0, addition of HA7 to the nutrient solution).

For each treatment (Control and HA7) and each time of harvest (1, 3 and 30 days), ten plants (*i.e.* ten plants pooled in 3 replicates) were harvested and separated from shoot and root samples. Thereafter, roots and shoots were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis. An aliquot of each tissue was weighed and dried (60°C) in a drying oven for dry weight (DW) determination and ground to fine powder for mineral and ion analysis. Likewise, at each time of harvest, a fresh aliquot of shoots and roots was used for real-time *in vivo* nitrate reductase activity.

II.5.4 Determinations of chlorophyll concentration and net photosynthetic rates

During the experiment, determinations of chlorophyll concentration and net photosynthetic rates were monitored at 1d and 3d after HA7 application and then weekly until the end of the treatment (*i.e.* 30 days). Determination of relative chlorophyll concentration was performed using a non-destructive method: a SPAD (Soil Plant Analysis Development) chlorophyll meter (Minolta, SPAD-502 model, Tokyo, Japan). The determination was carried out on 10 measures per leaf and on 5 leaves per replicate. Moreover, the net photosynthetic rate was measured using a LI-6400 photosynthesis system (LICOR, Lincoln, Nebraska, USA) at 23°C on leaves under ambient CO_2 atmospheric concentration (~ 400 ppm) and at $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ photosynthetic photon flux (PPF) provided by a LED light. Temperature and PPF parameters were previously validated as the optimal values for photosynthesis analysis in leaves of oilseed rape.

II.5.5 Mineral and ion quantification

II.5.5.1 Total N and ^{15}N analysis.

An aliquot of each plant organ (shoots or roots) was placed in thin capsules for isotopic analysis in order to analyze between 60 and 80 μg N. The total N amount and ^{15}N excess in plant samples were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy):

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

$$\text{N}_{\text{tot}_i} = (\%N_i \times \text{DW}_i)/100$$

The natural ^{15}N abundance ($0.36636 \pm 0.0004\%$) of atmospheric N_2 was used as a reference for ^{15}N analysis. Nitrogen derived from current N uptake (Nupt_i) in a given organ, at a given time, was calculated as:

$$\text{Nupt}_i = (\text{Ntot}_i \times E_i) / E_s$$

where E_i (%) is the atom ^{15}N excess in a given tissue (shoots or roots), E_s is the nutrient solution atom ^{15}N excess (3%).

Total S analysis. The total S amount in shoots and roots was measured by ICP-OES (Termo Elemental Co. Iris Intrepid II XDL) with prior microwave acid sample digestion (8mL of concentrated HNO_3 and 2 mL of H_2O_2 for 0.5g DW) as previously described in Mora *et al.* (2010).

II.5.5.2 Nitrate and sulfate analysis.

Nitrate and sulfate were extracted and analyzed as previously described (Abdallah *et al.* 2011) from 30 mg of DW (shoots or roots) in 1.5 ml of 50% ethanol solution at 40°C for 1h. After centrifugation (20 min, 10 000 g) the supernatant (called S1) was recovered and 1.5 ml of 50% ethanol was added to the pellet. After a second incubation (1 h, 40°C) and centrifugation (20 min, 10 000 g), the remaining supernatant was taken up and added to the previous supernatant (S1). All these operations (*i.e.* incubation and centrifugation) were repeated twice but now with 1.5 ml of ultra-pure water and incubation at 95°C . All supernatants were finally pooled then dried under vacuum for 16 h without heating (Concentrator Evaporator RC 10.22 Jouan, Saint Herblain, France). The dry residues containing both nitrate and sulfate were solubilized in 1 ml of ultra-pure water. Thereafter, nitrate and sulfate concentrations in each tissue were determined by using ion chromatography (HPLC, ACS3000, Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA), with a conductivity detector. The eluent solution consisted of 1.8 mM Na_2CO_3 and 1.7 mM Na_2HCO_3 , and was pumped isocratically over an AS17 guard column.

II.5.6 *In vivo* nitrate reductase activity in plants

The nitrate-reductase (NR) activity was determined in each replicate using an *in vivo* assay adapted from Bungard *et al.* (1999). Shoot or root tissue (0.1g FW) was vacuum infiltrated for 3x 30 s with 10mL of phosphate buffer (pH 7.5) containing 1% (v/v) propanol and 1 M KNO_3 . After vacuum infiltration, buffer solutions containing plant material were

separated in two sets. One part was incubated in a shaking water bath at 30°C for 15 min in darkness and then boiled to stop any enzymatic activity. The other part was boiled immediately after vacuum infiltration for initial nitrite concentration determination. The colorimetric reaction was performed with 1mL of plant extract, 1 mL of 0.3% (w/v) sulfanilic acid in 30% acetic acid and 1mL of 0.05% (w/v) α -naphthalamine in 30% acetic acid. The amount of nitrite (NO_2^-) formed in each buffer solution was measured spectrophotometrically (UV-1601, UV-visible spectrophotometer, Shimadzu, Champs-sur-Marne, France) at 540nm. Thereafter, nitrate reductase activity was calculated as $\mu\text{mol NO}_3^-$ reduced per g FW and per hour.

II.5.7 RNA extraction

Total RNA was extracted from 200 mg of root and shoot FW. Frozen samples were ground to a powder with a pestle in a mortar containing liquid nitrogen. The resulting powder was suspended in 750 μl of extraction buffer [0.1 M TRIS, 0.1 M LiCl, 0.01 M EDTA, 1% SDS (w/v), pH 8] and 750 μl of hot phenol (80°C, pH 4). This mixture was vortexed for 30 s and, after addition of 750 μl of chloroform/isoamylalcohol (24:1), the homogenate was centrifuged at 15 000 g (5 min, 4°C). The supernatant was transferred into 4 M LiCl solution (w/v) and incubated overnight at 4°C. After centrifugation (15 000 g, 30 min, 4°C), the pellet was suspended in 100 μl of sterile water. RNA was then purified with an RNeasy mini kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Courtaboeuf, France). Quantification of total RNA was performed by spectrophotometry at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before Reverse Transcription (RT) and real-time PCR (q-PCR) analysis.

II.5.8 Reverse transcription and q-PCR analysis

For reverse transcription, 1 μg of total RNA was converted to cDNA with an 'iScript cDNA synthesis kit' according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France).

Q-PCR amplifications were performed using specific primers for each housekeeping gene (EF1- α [forward 5'-gcctggtatggttgacact-3' and reverse 5'-gaagtttagcagcacccttg-3'] and RNA 18S [forward 5'-cggataaccgtagtaattctag-3' and reverse 5'-gtactcattccaattaccagac-3']) and target gene: BnNRT1.1 forward 5'-tggtggaataggcggctcgagttg-3' and reverse 5'-

gtatacgTTTTGGTcattgcat-3', BnNRT2.1 forward 5'-atggaacggaagtgccttg-3' and reverse 5'-tgattcgagctgtgtgaagc-3', BnSultr1.1 forward 5'-agatattgcgatcggaccag-3' and reverse 5'-gaaaacgccagcaaagaaag-3', BnSultr1.2 forward 5'-ggtgtagttcgtggaatggt-3' and reverse 5'-aacggagtgaggaagagcaa-3', BnSultr4.1 forward 5'-gaccagaccgtaaggtca-3' and reverse 5'-ttggaatccatgtgaagcaa-3', BnSultr4.2 forward 5'-agcaagatcagggattgtgg-3' and reverse 5'-tgcaacatttgggtgtct-3'. Q-PCRs were performed with 4 µl of 100x diluted cDNA, 500 nM of primers, and 1x SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad) in a ChromoFour System (Bio-Rad). For each pair of primers, a threshold value and PCR efficiency have been determined using a cDNA preparation diluted >10-fold. For all pairs of primers, PCR efficiency was c.a. 100%. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the presence of the single peak in the melting curves after Q-PCRs and by sequencing the Q-PCR product to confirm that the correct amplicons were produced from each pair of primers (Biofidal). For each sample, the subsequent Q-PCRs were performed in triplicate. The relative expression of the genes in each sample was compared with the control sample (corresponding to untreated plants at the same time of harvest) and was determined with the delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) method using the following equation (Livak and Schmittgen, 2001):

$$\text{Relative expression} = 2^{-[\Delta Ct_{\text{treated}} - \Delta Ct_{\text{control}}]},$$
$$\text{with } \Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - [\sqrt{(Ct_{\text{EF1-}\alpha} \times Ct_{\text{18S}})}]$$

Where Ct refers to the threshold cycle determined for each gene in the exponential phase of PCR amplification and $[\sqrt{(Ct_{\text{EF1-}\alpha} \times Ct_{\text{18S}})}]$ corresponds to the geometric average of Ct of reference genes. Using this analysis method, relative expression of the different genes in the control sample of the experiment was equal to 1 (Livak and Schmittgen, 2001), and the relative expression of other treatments was then compared with the control, on this basis.

II.5.9 Microarray analysis

Briefly, each test sample was hybridized on a *Brassica napus* Gene Expression Microarray 4 X 44K (Agilent Technologies®) using a two-color microarray-based gene expression protocol. In this procedure, controls and treated samples (HA7) were compared and respectively labeled with cyanine 3 and cyanine 5. For each plant tissue (shoots and roots) and each time of harvest (1, 3 and 30 days), the same control was used for the different hybridizations. After the labeling step, cRNA sample sizes ranged from 50 to 3000 nucleotides. Thus, fragmentation was required to take away secondary structures (specific buffer at 60°C for 30 min) enabling cRNA lengths of between 50 to 200 nucleotides to be

obtained and then optimal hybridization with an Agilent 60-mer oligonucleotide microarray to be carried out. Thereafter, hybridizations were performed at 65°C for 17 hours.

Scanning of microarrays was performed with the Agilent scanner using default parameters for 4 x 44 K formats. Data were extracted with Feature Extraction 10.1 software (Agilent Technologies®).

II.5.10 Fluorescence confocal microscopy and transmission electron microscopy

For microscopy experiments, the choice of the leaf observed is important. After 1 and 3 days of contact with HA7, observations were made on young plants with four leaves. We then chose to make observation on the last fully expanded leaf: leaf #3. After, 30 days of treatment, we chose to make the observations on a leaf in the center of the plant. The first leaves that had emerged were nearly senescent and young leaves just emerged were not representative of the whole plant. Thus, among the eight leaves emerged by the end of culture, we then chose to focus our observations on leaf #5.

A square of rapeseed leaf from each replicate of each treatment (Control and HA7-treated plant) and each time point (1d, 3d and 30d) was embedded in LMPT agar (low melting point) 5% in phosphate buffer at 40°C. After cooling, slices of 50µm thickness were cut with a vibratome (Microm HM650V). Half of these slices were directly observed with confocal microscopy (Olympus FV1000) with laser excitation of autofluorescence at 458nm and emission at 650-700nm. The remaining slices were fixed with 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer 0.1M pH 7.4 from 1 hour to several days at 4°C. The sections were rinsed in phosphate buffer 0.1M pH 7.4 three times, post-fixed for 1.5 hours with 1% osmium tetroxide in 0.1M phosphate buffer pH 7.4, and then rinsed in phosphate buffer three times. The cells were then dehydrated in progressive ethanol dilutions (70-100%) and 100% propylene oxide, embedded in Aradite 502 resin and polymerised for 48h at 60°C. Ultrathin sections of 80nm thickness were cut and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The sections were observed with a JEOL 1011 transmission electron microscope and images were taken with a Mega View III Camera and Analysis FIVE software.

II.5.11 Data and statistical analysis

Regarding growth, nitrate uptake, SPAD and IRMS analysis, experiments were conducted with 10 replicates. In the case of ICP and DIONEX analysis, experiments were conducted with 6 replicates. For the microscopy, q-PCR and microarray experiments, 3 replicates were used for each sample.

All data were analyzed for significant differences by Student's test and marked by asterisks (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$).

Microarray. For each experiment (each time and each tissue), probes with [Marginal] flag and at least one channel above the background for the three biological replicates were retained. A t-test was applied on each filtered gene list with the following parameters: (i) t-test against zero, (ii) Benjamini-Hochberg correction and (iii) p-value < 0.05 . A fold change was also made on the filtered list, but no statistical test evaluates the significance of these lists.

Supplemental data

Supplemental Table S1. List of the differentially expressed genes in shoots and roots of rapeseed after 3 days of HA7 supply to the roots.

Supplemental Table S2. List of the differentially expressed genes in shoots and roots of rapeseed after 30 days of HA7 supply to the roots.

Acknowledgment

We thank Marie-Paule Bataillé and Raphaël Ségura for IRMS analyses. We acknowledge Patrick Beauclair for LICOR measurements, Julie Levallois for technical assistance in RNA extractions and q-PCR analyses, Xavier Sarda and Anne-Françoise Ameline for helping with plant culture and harvest and finally Nicolas Elie from GRECAN (Groupe Régional d'Etude sur le CANcer, Histo-imagerie quantitative, Caen, France) for microscope image analyses. We thank Laurence Cantrill for improving the English of the manuscript.

Chapitre V

Conclusions et Discussion générale

CHAPITRE V

CONCLUSIONS ET DISCUSSION GENERALE

L'évolution des pratiques culturelles constitue un impératif face aux pressions réglementaires et sociétales pour le développement d'une agriculture plus respectueuse de l'environnement. Dans ce contexte, les stratégies visant à optimiser le prélèvement d'éléments minéraux présents dans les sols et leur valorisation par les végétaux cultivés sont en plein essor. A ce titre, des stratégies relativement récentes visent à développer de nouveaux types d'intrants bénéficiant de l'apport de substances d'origine algale ou dérivées de composés humiques avec pour objectif de gagner des points d'efficacité nutritionnelle pour des plantes de grandes cultures comme le blé ou le colza.

Concernant les algues, l'épandage d'extraits bruts pour fertiliser les cultures est une pratique ancienne utilisée dès l'antiquité. Plus récemment, plusieurs travaux de recherches (Briand, 1998) ont été orientés vers la mise au point de procédés de purification des substances actives de ces extraits afin (i) d'améliorer leur efficacité biostimulante et (ii) de développer des modes d'apports plus adaptés aux surfaces de cultures actuelles. Alternativement mais avec les mêmes objectifs, d'autres travaux (Dell'Agnola & Nardi, 1987) visaient à utiliser d'autres composés en particulier dérivés d'acides humiques. Ces polymères organiques à structure complexe sont les constituants principaux de la matière organique du sol. Concernant les effets de ces acides humiques sur les végétaux, deux théories scientifiques sont actuellement évoquées. La première considère que les acides humiques n'interviennent pas directement au niveau de la plante mais agissent essentiellement au niveau du sol en stabilisant les agrégats et en chélatant les métaux (Piccolo *et al.*, 1997), améliorant ainsi la structure du sol et facilitant la croissance de la plante. La seconde théorie montre au contraire que les acides humiques agissent directement au niveau de la plante (principalement au niveau racinaire) et entraînent des modifications physiologiques qui se traduisent par une amélioration de la croissance des végétaux (Nardi *et al.* 2000a).

D'une manière générale, de nombreux travaux rapportent les conséquences bénéfiques sur le fonctionnement végétal d'un apport d'extraits d'algues ou d'acides humiques. A ce

titre, des effets sur le métabolisme azoté (Mérigout 2006, Quaggiotti *et al.* 2004), le cycle de développement de la plante (Eyheraguibel *et al.* 2008, Roussos *et al.* 2009) et la croissance (Mugnai *et al.* 2008, Nardi *et al.* 2000a) des végétaux ont été observés. Toutefois, ces études se concentrent essentiellement sur les aspects physiologiques de la réponse des plantes aux extraits. Des études plus récentes commencent à décrire les modifications de l'expression du génome en réponse à un apport d'acides humiques (Trevisan *et al.*, 2011). Cependant, la plupart du temps, les résultats issus de ces travaux ne décrivent que des modifications de l'expression d'un nombre de gènes restreints choisis *a priori*. Concernant les extraits algaux, aucune étude de modification du transcriptome n'existe à ce jour. Dans ce contexte, outre l'identification de nouveaux extraits algaux et humiques présentant des effets stimulants sur la croissance des plantes, une meilleure compréhension des mécanismes d'action de ces extraits s'avère essentielle.

Ainsi, ce travail de thèse s'appuie sur deux objectifs principaux. Le premier objectif consiste à caractériser les modifications du fonctionnement du végétal induites par différents extraits algaux et humiques. Les propriétés de ces extraits sont, selon la littérature, étroitement liées aux molécules ou aux groupements fonctionnels qu'ils contiennent. La modification de ces extraits notamment par voie chimique ou selon les modalités d'extraction choisies devrait donc permettre de modifier et d'augmenter les propriétés biostimulantes de ces extraits.

A cette fin, 15 extraits au total ont été initialement testés pour leurs effets physiologiques sur le colza (*Brassica napus* variété Capitol) par une approche de criblage utilisant des paramètres de mesure simples. Ils étaient issus de différents mélanges d'espèces pour les extraits algaux et de modifications chimiques d'extraits humiques natifs pour les acides humiques. Nous avons ainsi pu démontrer que seuls l'acide humique AH7 et l'extrait algal AZAL5 présentaient des effets bénéfiques sur les trois facteurs mesurés : production de biomasse (fig. III-1 et III-2), teneurs foliaires en chlorophylles (fig. III-3) et Efficacité d'Utilisation de l'Azote (EUA, fig. III-4). Ces deux extraits font partie de l'ensemble d'extraits issus de modifications chimiques d'extraits natifs pour les acides humiques ou de modifications du procédé d'extraction pour les extraits algaux.

Au-delà des informations obtenues sur l'intérêt des modifications chimiques des extraits ou du type d'extraction, nous avons sélectionné les deux extraits (AZAL 5 et AH7) présentant les propriétés biostimulantes les plus probantes sur le colza pour poursuivre cette

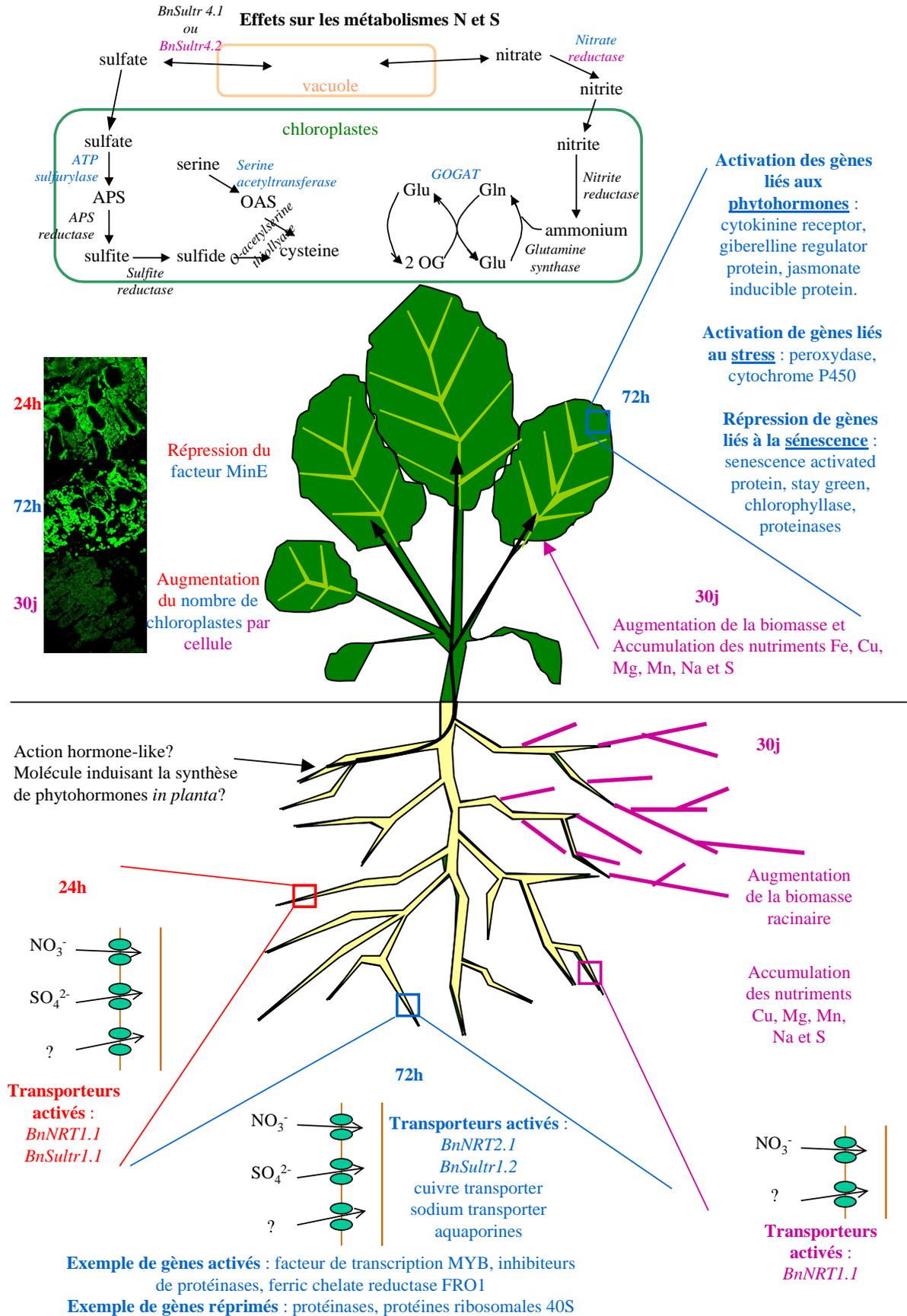


Figure V-1 : schéma des effets métaboliques et physiologiques de l'acide humique AH7 sur le colza en hydroponie après 24h (en rouge), 72h (en bleu) ou 30 jours (en violet) de contact.

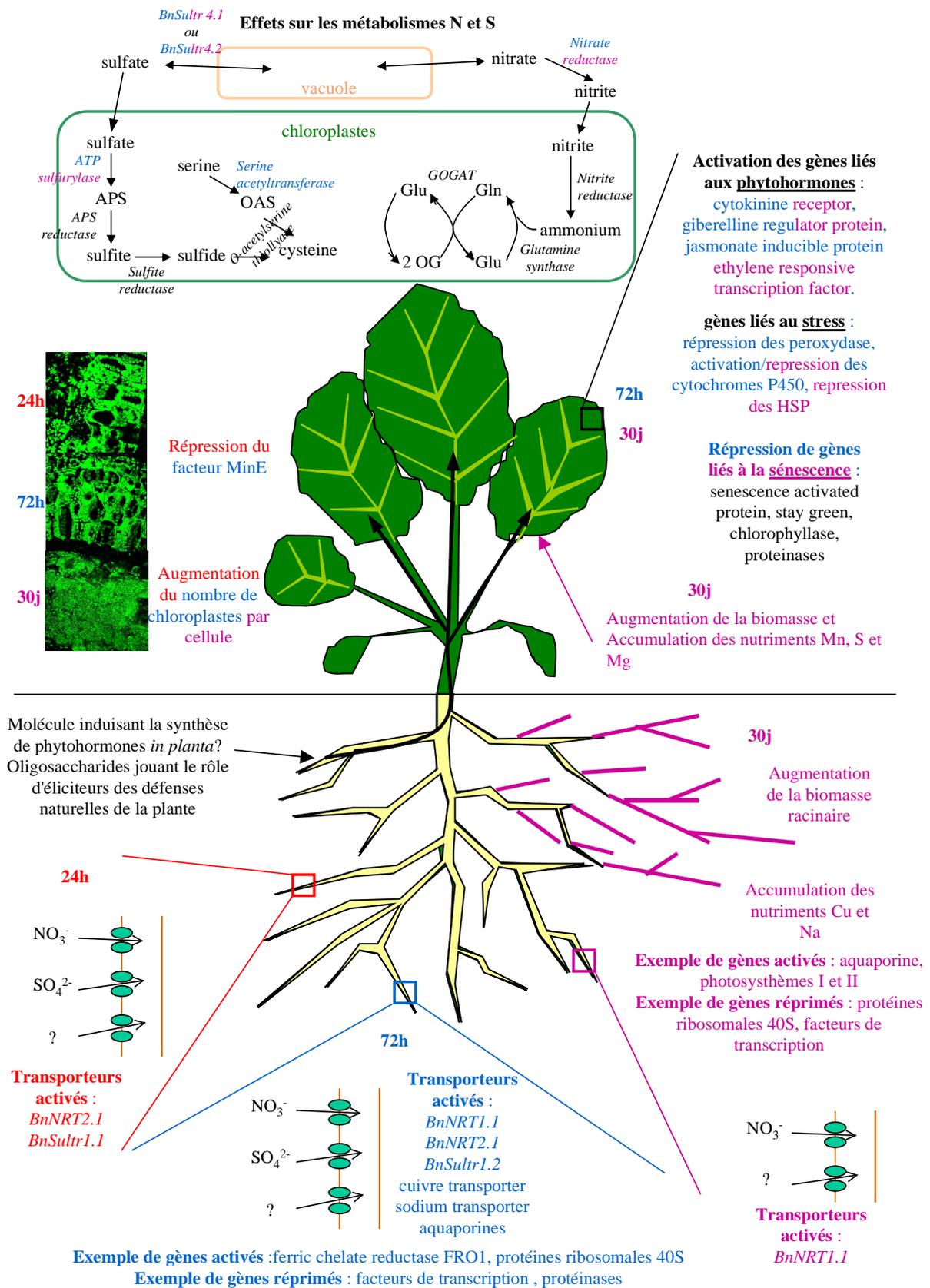


Figure V-2 : schéma des effets métaboliques et physiologiques de l'extrait algal AZAL5 sur le colza en hydroponie après 24h (en rouge), 72h (en bleu) ou 30 jours (en violet) de contact.

étude. A partir de ces deux extraits, le second objectif de ce travail doctoral a consisté à déterminer et à quantifier les principales modifications métaboliques, physiologiques et moléculaires induites. Pour mener à bien ce travail, des analyses transcriptomiques à grande échelle à l'aide d'une puce ADN spécifique du colza ont été associées à des analyses enzymatiques, des quantifications des contenus en nutriments et des observations en microscopie.

Par ailleurs, les résultats alors obtenus ont permis de montrer que l'acide humique AH7 et l'extrait algal AZAL5, bien que d'origines différentes, présentent *a priori* des effets physiologiques proches chez le colza. Cette constatation apparaissait partiellement à l'issue de notre analyse bibliographique (fig. I-22). Cette comparaison, outre le fait qu'elle facilite une discussion plus synthétique, pourrait alors apporter de plus amples informations sur le mode d'action des ces extraits. Ainsi, l'induction de réponses physiologiques très proches observées chez le colza en réponse à ces extraits AZAL5 et AH7, suggère que certaines substances contenues dans ces deux extraits pourraient être de nature similaire (ou très proche) et seraient alors capables d'agir sur des voies de signalisation communes. Nous rappellerons donc brièvement les résultats obtenus lors de ces travaux de thèse présentés de façon synthétique au sein des figures V.1 pour l'extrait AH7 et V.2 pour l'extrait algal AZAL5, puis nous ferons une comparaison entre les extraits algaux et les acides humiques. Les perspectives liées à ce travail de recherche seront ensuite présentées.

I. Un accroissement de la production de biomasse, essentiellement racinaire

La stimulation de la production de biomasse, le plus souvent racinaire, par un apport d'extraits algaux ou humiques constitue l'observation la plus rapportée de la littérature, quelle que soit l'espèce végétale étudiée (Sivasankari *et al.*, 2006 ; Roussos *et al.*, 2009 ; Atiyeh *et al.*, 2002 ; Mora *et al.*, 2010). Il faut toutefois remarquer que la nature des résultats rapportés dans la bibliographie constitue un biais, puisque seuls les cas où la croissance est stimulée sont rapportés. Dans notre cas, la stimulation de la production de biomasse du colza, que nous avons testé avec l'apport racinaire de 15 extraits, n'est pas systématique. Pour mémoire, des 3 acides humiques natifs testés (tourbe, léonardite et quebracho), seule la tourbe à une dose de 100 mg de Carbone organique .L⁻¹ augmente significativement les biomasses foliaires (+46%) et totales (+44%). Pour les acides humiques modifiés AH1 à AH7, tous augmentent significativement la biomasse racinaire (entre +39% pour AH4 à 10 mgC.L⁻¹ et +101% pour

AH1 à 10 mgC.L⁻¹) mais seuls AH6 et AH7 ont également un effet positif sur les biomasses foliaires (entre +21% pour AH6 à 100 mgC.L⁻¹ et +51% pour AH7 à 10 mgC.L⁻¹) et totales (entre +31% pour AH6 aux deux doses et AH7 à 100 mgC.L⁻¹ et +58% pour AH7 à 10 mgC.L⁻¹) (fig. III-1). Concernant les extraits algaux, seul l'extrait AZAL5 donne une réponse équivalente à celle obtenue pour les extraits humiques AH6 et AH7. Tous les autres extraits algaux (AZAL1 à AZAL4) n'ont aucun effet (voire même une action délétère) sur la production de biomasses foliaires, racinaires ou totales (fig. III-2). Seul, à notre connaissance, le travail de thèse de Mérigout (2006) sur les extraits algaux indiquait que l'augmentation de biomasse de la plante n'était pas une réponse systématique à ces extraits. Les extraits AZAL5 et AH7 ont alors été choisis pour des analyses plus précises sur sol ou en hydroponie (culture en condition de stress, culture préalable aux puces à ADN) et ont à chaque fois confirmé leurs actions bénéfiques sur la production de biomasse du colza (fig. III-5, IV.I-1 et IV.II-1). Cependant, lors des cultures sur sol, l'augmentation de biomasse induite par l'acide humique AH7 est restreinte au système racinaire avec de plus un effet dose (fig. III.8), alors qu'une augmentation de la production de biomasse racinaire et foliaire est encore induite par l'extrait algal AZAL5 (fig. III.8) mais avec une ampleur plus faible qu'en hydroponie. Ces résultats montrent qu'un apport de ces 2 extraits au niveau du sol, entraîne une plus faible efficacité et suggère qu'une pulvérisation foliaire pourrait constituer une alternative à développer.

II. Une stimulation de la photosynthèse et de la division des chloroplastes

A l'issue du criblage des 15 extraits, les molécules entraînant une augmentation significative de la teneur en chlorophylles sont les mêmes que ceux présentant une augmentation de la biomasse : la tourbe (+22 et +18% pour des doses de 10 et 100 mgC.L⁻¹ respectivement), AH6 (+30 et +27% pour des doses de 10 et 100 mgC.L⁻¹ respectivement), AH7 (+18 et +10% pour des doses de 10 et 100 mgC.L⁻¹ respectivement) et AZAL5 (+14%). Pour tous les autres extraits, aucune réponse significative n'a pu être observée après le traitement des colzas, à part pour les extraits AZAL2 à 4 (fig. III-3), mais leur action répressive sur la croissance des colzas laisse penser que l'augmentation de la teneur en chlorophylle observée pourrait se rapprocher de celles déjà décrites dans la littérature en réponse à des stress, comme notamment en réponse à la présence de métaux lourds dans le milieu nutritif (Singh *et al.*, 2006 ; Jiang *et al.*, 2007 ; Jia *et al.*, 2010 ; Najeeb *et al.*, 2011).

Dans la littérature, la teneur en chlorophylles n'est pas toujours un paramètre pris en compte dans les études concernant les extraits algaux et les acides humiques. Quand elle l'est, les auteurs rapportent, la plupart du temps, des augmentations de la teneur en chlorophylles en réponse aux traitements par les extraits (Tejada & Gonzalez, 2004 ; Mancuso *et al.*, 2006 ; Spinelli *et al.*, 2010). Cependant, dans ces études, la teneur en chlorophylles est rarement associée à des mesures de l'activité photosynthétique. Par ailleurs, à ce jour, aucun travaux n'a décrit un potentiel effet d'extraits d'algues ou humiques sur la division des chloroplastes dans les cellules foliaires. Ainsi, au cours de ce travail doctoral, **nous avons pu montrer que les extraits AZAL5 et AH7 entraînent une augmentation significative du nombre de chloroplastes (fig. IV.I-6 et IV.II-8) associée, dans le cas du traitement AH7, à une augmentation de la photosynthèse nette (fig. IV.II-8).**

Cette augmentation du nombre de chloroplastes induite par les extraits algaux et humiques n'a jamais été évoquée dans la littérature, mais force est de constater qu'elle constitue une des réponses les plus précoces. Le contrôle de la division des chloroplastes a été envisagé au travers de l'expression de gènes de réponses aux cytokinines (Okazaki *et al.*, 2009) et/ou du gène *MinE* (Itoh *et al.*, 2001 ; Kojo *et al.*, 2009). Dans notre étude, l'analyse de la réponse moléculaire très large des plantes à l'application des extraits AH7 et AZAL5 a montré une répression forte et précoce du facteur *MinE* (tableaux IV.I-4, IV.I-5 et IV.II-4). D'après la littérature (Mapple *et al.*, 2002 ; Mapple & Moller, 2007), bien que le rôle exact de *MinE* n'ait pas encore été identifié précisément, ce facteur régulerait la mise en place de l'anneau de division des chloroplastes, constitué des facteurs *Min B*, *C* et *D*. Ainsi, certaines études (Itoh *et al.*, 2001) montrent qu'une répression de l'expression de *MinE* induit dans les cellules de la plante une diminution de la division des chloroplastes (diminution du nombre de chloroplastes et une augmentation de leur taille). D'autres études montrent le même phénotype en réponse à une surexpression de *MinE* (Kojo *et al.* 2009). Face à ce constat, il est alors difficile de cerner le rôle exact de ce facteur dans le processus de division plastidiale même s'il semble que dans notre étude, sa répression se traduise par une stimulation de la division des chloroplastes.

En parallèle, plusieurs études rapportent des activations de la division des chloroplastes en réponse à un traitement par les cytokinines (Okazaki *et al.*, 2009). Ainsi, dans la littérature, la majorité des auteurs attribuent les effets des extraits algaux et des acides humiques aux phytohormones qu'ils contiennent (Khan *et al.*, 2011 ; Dell'Agnola &

Nardi,1987). Cependant, nos extraits AZAL5 et AH7 ne contiennent que de faibles concentrations de phytohormones (tableaux IV.I-2 et IV.II-2). Néanmoins, les analyses transcriptomiques révèlent une modification de l'expression de gènes de réponse aux phytohormones comme les cytokinines, les gibberellines ou le jasmonate (cytokinine receptor, gibberelline regulator protein, jasmonate inducible protein, *cf.* supplemental data). Ainsi, même si les concentrations en hormones extrêmement faibles dans les extraits permettent de penser qu'elles ne seraient pas à l'origine de ces modifications, il n'est pas à exclure que d'autres molécules constitutives de ces extraits puissent induire une synthèse d'hormones *in planta*. La validation de cette hypothèse, nécessiterait un dosage *in planta* des différentes phytohormones.

Outre la répression très précoce et très forte de l'expression de *MinE* induite par les extraits AZAL5 ou AH7, (jusqu'à 51 fois, même si une quantification plus précise par RT-PCR est requise), on peut également noter induction de l'expression des gènes codant des ferrédoxines, des ferritines ou des gènes impliqués plus généralement dans la mise en place des photosystèmes (tableaux IV.I-4, IV.I-5 et IV.II-4). Toutes ces protéines participant à la chaîne de réactions liée à la photosynthèse dans le chloroplaste, on peut ainsi suggérer que l'activation de la division des chloroplastes entraîne, dans un deuxième temps, une activation de l'expression des gènes codant les protéines nécessaires à son bon fonctionnement. La différence de cinétique entre ces deux événements (activation précoce dès 24h de la division des chloroplastes et activation des photosystèmes seulement après 72h de contact avec l'extrait) est en accord avec la littérature décrivant le mode de division des chloroplastes. Ces organites se divisent de la même façon que les organismes unicellulaires procaryotes, par la mise en place d'un anneau de division central puis une séparation du chloroplaste en deux chloroplastes « fils » (Colletti *et al.*, 2000 ; Marrison *et al.*, 1999 ; Miyagishima 2005). On peut donc supposer que, dans un premier temps, la division des chloroplastes s'active puis rapidement de nouveaux photosystèmes sont nécessaires afin d'assurer le fonctionnement optimal des nouveaux chloroplastes. **Cette augmentation du nombre de chloroplastes en réponse à AZAL5 et AH7 mériterait des études complémentaires, d'autant que les voies d'assimilation du nitrate et du sulfate, elles aussi affectées par ces deux extraits, présentent une composante chloroplastique.**

III. Une absorption et une assimilation du nitrate stimulée conformément à l'augmentation de la croissance

Nous avons dans un premier temps évalué l'Efficiencia d'Utilisation de l'Azote (EUA, fig. III-4) dans le cadre du criblage des différents extraits. Ce paramètre reflète la teneur en azote de la plante et donc la quantité d'azote qu'elle a absorbé au cours de la culture. Dans un second temps, pour les cultures préparatoires aux puces à ADN, la vitesse d'absorption de l'azote a été mesurée par marquage isotopique (fig. IV.I-4B et IV.II-6B), couplée à des analyses q-PCR des transporteurs impliqués (fig. IV.I-4C et IV.II-6C) avec en parallèle une mesure de l'activité nitrate réductase (fig. IV.I-4D et IV.II-6D).

Concernant l'EUA, qui correspond à la quantité de biomasse synthétisée par gramme d'azote (*i.e.* l'inverse de la teneur en azote estimée à l'échelle de la plante entière), nous avons pu constater les mêmes variations que pour la biomasse. Seule la tourbe et les acides humiques modifiés AH6 et AH7 augmentent l'EUA (entre +51% pour AH6 à 10 mgC.L⁻¹ et +87% pour AH7 à 100 mgC.L⁻¹). Pour les extraits algaux, AZAL5 augmente significativement l'EUA (+84%) alors que AZAL2 et AZAL3 la diminue significativement (-40% et -45%, respectivement) (fig. III-4). Il faut toutefois rester vigilant quant à l'interprétation de ce paramètre. En effet, il est bien connu que la teneur en azote diminue (et donc l'EUA augmente) avec l'augmentation de la biomasse, phénomène déjà décrit chez le colza (Juste *et al.*, 1997) et reposant sur les travaux initiaux de Lemaire et Salette (1981). L'augmentation induite par les extraits de l'efficacité d'utilisation de l'azote telle que nous l'avons initialement estimée pourrait alors n'être qu'une conséquence de l'augmentation de la production de biomasse associée à une dilution de l'azote au sein de celle-ci (Lemaire et Salette (1981)). L'estimation plus précise de l'absorption du nitrate a donc été ensuite quantifiée.

Ainsi, de même que Durand *et al.* (2003) et Mériçout (2006), nous observons une augmentation de l'absorption de l'azote (entre +31% pour AH7 après 30 jours de contact et +38% pour AZAL5 après 30 jours de contact) ainsi qu'une augmentation de l'activité nitrate réductase (+51% et +59% pour AZAL5 et AH7 respectivement dans les feuilles) qui intervient cependant de façon assez tardive (30 jours de contact). Concernant les acides humiques, Quaggiotti *et al.* (2004) et Pinton *et al.* (1999) observent une augmentation de l'absorption d'azote couplée à une activation des gènes codant les transporteurs de nitrate

(NRT2.1) chez le maïs avec en parallèle, une activation des pompes H⁺/ATPases. Chez le colza, le profil d'expression que nous avons obtenu (fig. IV.I-4C et IV.II-6C), que ce soit sous l'effet d'un apport d'AZAL5 ou de AH7, se traduit une augmentation initiale de l'expression du gène *NRT2.1* suivie plus tardivement par celle de *NRT1.1* (72h et 30 jours). **Cette augmentation de l'expression des transporteurs de nitrate s'accompagne d'une plus forte absorption du nitrate marqué au ¹⁵N (fig. IV.I-4B et IV.II-6B) et par un contenu en N significativement plus élevé à 30 jours (+108% dans les racines pour AH7 ; +115% dans les racines et +21% dans les feuilles pour AZAL5) sans cependant d'augmentation significative des quantités de nitrate (fig. IV.I-4A et IV.II-6A).** Ce résultat suggère que le nitrate supplémentaire absorbé (consécutivement à l'induction des transporteurs) est correctement assimilé et non stocké. Cette hypothèse est confortée par l'activation des gènes codant les enzymes intervenant dans la voie d'assimilation de l'azote (glutamine synthase et GOGAT, fig. V-1 et V-2) mais également par l'augmentation de l'activité nitrate réductase en réponse aux extraits (fig. IV.I-4D et IV.II-6D).

Enfin, que ce soit pour AZAL5 et AH7, il est important de noter que la croissance et le métabolisme azoté (de l'absorption à l'assimilation) sont affectés selon une cinétique et une ampleur équivalentes. Il est donc difficile à ce stade de penser que la stimulation de l'absorption du nitrate soit à l'origine de la croissance plus élevée enregistrée. Il serait même envisageable que la stimulation de la production de biomasse, qui présente d'autres causalités, soit responsable d'une augmentation du métabolisme azoté, résultant d'une synthèse accrue de protéines et d'une plus forte utilisation des acides aminés libres conduisant, par contrecoup, à une moindre rétroinhibition des transporteurs de nitrate et plus globalement de sa voie d'assimilation.

IV. Un métabolisme du soufre stimulé au-delà de la demande requise par la synthèse de biomasse

Le deuxième élément plus particulièrement étudié dans cette thèse et qui voit son métabolisme modifié par l'apport d'extrait algal ou d'acide humique est le soufre. L'absorption du soufre a été appréhendée par l'évolution du contenu des plantes en soufre (fig. IV.I-5A et IV.II-7A) et en sulfate (fig. IV.I-5B et IV.II-7B). Cette analyse du contenu a été couplée à des analyses q-PCR des transporteurs impliqués dans le l'absorption racinaire

(fig. IV.I-5C et IV.II-7C) et le stockage vacuolaire (fig. IV.I-5D et IV.II-7D) du sulfate chez le colza.

Nous avons ainsi constaté une augmentation significative après 30 jours de contact avec l'acide humique (fig. IV.II-7) du contenu des plantes traitées en soufre (+76 et +137% dans les feuilles et racines respectivement) et en sulfate (+48 et +18% dans les feuilles et racines respectivement). Avec l'extrait algal AZAL5 (fig. IV.I-5), les contenus en soufre et en sulfate après 30 jours dans les feuilles sont augmentés respectivement de 63 et 48% et dans les racines de 133 et 19%. Une seule étude, celle d'Eyheraguibel *et al.* (2008) rapporte une accumulation de soufre dans la plante en réponse à un traitement par du compost. **Ces résultats assez originaux montrent donc une stimulation plus forte de l'absorption, de l'assimilation et du stockage du soufre relativement à ce que nous avons mesuré pour la biomasse et l'absorption du nitrate.**

Cette stimulation globale du métabolisme du soufre en réponse à l'application d'un extrait algal ou d'un acide humique a par ailleurs été observée, au moins partiellement, à l'échelle moléculaire. C'est le cas en particulier pour les gènes codant des transporteurs racinaires de sulfate dont l'augmentation d'expression est précoce et importante avec AH7 (fig. IV.II-7C : de 14 fois pour BnSultr1.1 et de 18 fois pour BnSult1.2 à 72h) ou AZAL5 (fig. IV.I-5C : de 7 fois pour BnSultr1.1 dès 24h et jusqu'à 44 fois pour BnSult1.2 à 72h). L'expression des gènes codant des transporteurs de sulfate tonoplastiques foliaires est elle aussi accentuée mais de façon plus transitoire, à 72 h essentiellement, que ce soit en réponse à l'acide humique AH7 (fig. IV.II-7D) ou à l'extrait algal AZAL5 (fig. IV.I-5D). Ces transporteurs vacuolaires de sulfate sont responsables de l'efflux de sulfate à partir de la vacuole (Kataoka *et al.*, 2004). Dubousset *et al.* (2009) montrent alors que les gènes codant ces transporteurs *BnSultr* du groupe 4 sont activés dans les feuilles de colza en réponse à une carence en soufre. Abdallah *et al.* (2010) tiraient les mêmes conclusions pour les transporteurs de sulfate racinaires du groupe 1. Une activation en réponse à la carence en soufre est également rapportée pour le gène codant l'ATP sulfurylase (Leustek & Saito, 1999) intervenant dans la voie d'assimilation chloroplastique du soufre. Lors de notre étude, nous avons également observé une induction de l'expression de ce gène en réponse à AZAL5 (72h et 30 jours) ou AH7 (72h). **On peut donc penser que la réponse de la plante à une exposition aux extraits AH7 ou AZAL5, se traduit précocement par la perception d'un manque de soufre, conduisant tout d'abord à une surexpression des transporteurs de**

sulfate racinaires et tonoplastiques et dans un second temps par une stimulation de l'absorption et une mobilisation du sulfate vacuolaire. Dans un troisième temps, on constate une augmentation du contenu en S et sulfate de la plante associée à une répression de l'expression des gènes de type *Sult1* ou *Sult4*.

Une régulation à l'échelle moléculaire par certaines phytohormones (auxine, zéatine) du métabolisme du soufre en condition de carence a déjà été rapportée (pour revue, Kopriva & Rennenberg, 2004) et on ne peut exclure leur intervention après une induction de leur synthèse par nos extraits, comme cela a été envisagé pour le métabolisme azoté.

V. Analyses moléculaires plus larges

Parallèlement aux analyses des métabolismes azotés et soufrés, nous avons procédé à une analyse moléculaire de masse, reposant sur l'utilisation d'une puce ADN spécifique du colza, récemment disponible. Cet outil moléculaire présente l'avantage de pouvoir analyser simultanément l'expression d'un grand nombre de gènes (près de 63000 dans le cas présent). Cependant, du fait du séquençage partiel du génome de colza, seul 40% des séquences présentes sur la puce sont spécifiques de gènes dont la fonction est connue (ou supposée), ce qui constitue un inconvénient lors de l'analyse des résultats. Toutefois, en dépit de cette restriction, l'analyse des résultats de microarray nous a permis de montrer que les extraits d'intérêt modifiaient de manière significative le transcriptome des plantes traitées. En effet, en réponse aux extraits d'intérêt, nous avons montré une modulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans les métabolismes du carbone (et la photosynthèse), de l'azote et du soufre, le métabolisme cellulaire, celui des acides gras, des phytohormones, les processus de sénescence, les réponses au stress, ainsi que le transport des ions et de l'eau (fig. IV.I-3 et IV.II-5).

Ainsi, à titre d'exemple, en réponse à AH7, on constate une induction de l'expression de gènes codant des facteurs de transcription tels que les facteurs MYB ou WRKY. Dans la littérature, l'induction de ces facteurs de transcription est la plupart du temps associée à des conditions de stress (Dubos *et al.*, 2010 ; Eulgem *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2005). En effet, le rôle des facteurs de transcription de type MYB est assez bien décrit comme intervenant dans la régulation de la synthèse de composés phénoliques, telles que les phytoalexines, au cours de la mise en place des mécanismes de défense des plantes en réponse à une attaque par un

agent pathogène. Ainsi, Johnson et Dowd (2004) rapportent qu'une surexpression du facteur MYB augmente la résistance des plantes d'*Arabidopsis* vis-à-vis des insectes. L'induction de l'expression de gènes codant des facteurs de transcription MYB en réponse à AH7 suggère alors que cet extrait pourrait être à l'origine d'une activation des voies de synthèse de composés phénoliques de défense, permettant ainsi une meilleure résistance du colza vis-à-vis de stress biotiques et/ou abiotiques.

Par ailleurs, on constate également une induction de gènes codant certaines aquaporines en réponse à l'application des extraits AZAL5 et AH7. Ces canaux hydriques sont majoritairement activés lorsque les conditions de cultures de la plante rendent difficile l'absorption d'eau, c'est-à-dire en condition de stress hydrique ou salin (pour revue, Forrest & Bhave, 2007). Ainsi, encore une fois, nous observons que l'apport d'extrait algal ou d'acide humique dans la solution nutritive se traduit par l'induction de gènes codant des protéines généralement exprimées en situation de stress. Lors des cultures hydroponiques, nous avons pu mesurer que le potentiel osmotique de la solution nutritive Hoagland n'était pas affecté par l'ajout de l'acide humique AH7 ou de l'extrait algal AZAL5. Ainsi, nous avons pu vérifier que l'ajout de ces extraits dans la solution nutritive n'était pas à l'origine d'une modification significative du potentiel osmotique capable de générer une situation de stress hydrique chez les plantes. Cependant, il n'est pas à exclure que les composés de fortes masses moléculaires présents dans ces extraits (acides humiques ou polysaccharides de l'extrait algal) puissent obstruer les aquaporines et ainsi ralentir l'influx d'eau dans la plante, simulant alors des conditions de stress hydrique à l'origine de la néosynthèse d'aquaporines.

Parallèlement à ces inductions de gènes, nous avons également observé une répression d'autres gènes codant des protéines qui sont généralement sur-exprimées en cas de stress biotiques ou abiotiques (« dehydration responsive element », « cold regulated plasma membrane », « stress responsive protein », « wound responsive protein » ou encore « salt and low temperature response protein », cf supplémental data). Par conséquent, même si les traitements AZAL5 et E7 se traduisent par l'induction de certains gènes de défense, il semble que l'ensemble des mécanismes de défense ne soient pas activés. Toutefois, il est intéressant de rapprocher ces analyses moléculaires des effets physiologiques observés en conditions de stress salin et qui montrent que les plantes stressées et traitées par les extraits AZAL5 et E7 ont une croissance supérieure aux plantes stressées et non traitées (par AZAL5 ou E7).

Toutefois, ces résultats méritent d'être confirmés en étudiant la résistance des plantes dans d'autres situations de stress et notamment en situation de stress biotiques.

Toujours à une échelle moléculaire globale, on constate également une répression de l'expression de gènes usuellement exprimés durant la sénescence foliaire tels que ceux codant des chlorophyllases, des « stay green protein » et plus généralement des gènes étiquetés « senescence-associated genes ». La répression de ces gènes codant des protéines impliquées dans le catabolisme des macromolécules suggère une limitation de la dégradation des chlorophylles (Park *et al.*, 2007) et des protéines (Etienne *et al.*, 2007; Desclos *et al.*, 2008) chez les plantes traitées par les extraits. En conséquence, il peut être suggéré que la sénescence foliaire de ces plantes soit retardée et que potentiellement la durée de vie des feuilles soit augmentée. Cette augmentation de la durée de vie des feuilles, qui n'a pas été évaluée dans ce travail, conduirait alors un meilleur remplissage des graines en permettant par exemple, une meilleure synchronisation des processus de recyclage et de remplissage. De ce fait, il est envisageable qu'un apport d'extrait (AZAL5 ou E7) au stade végétatif se traduise *in fine* par une amélioration (i) de l'efficacité d'utilisation de l'azote et/ou (ii) du rendement du colza au stade reproducteur (Rossato *et al.*, 2001; Malagoli *et al.*, 2005a). La confirmation de cet effet de ces deux extraits, allant jusqu'à une éventuelle augmentation du rendement, pourrait donc constituer une perspective supplémentaire de ce travail doctoral.

La comparaison cinétique des réponses moléculaires induites par les 2 extraits montre que les activations et répressions interviennent majoritairement après 72h de contact avec les deux types d'extraits. A 30 jours de traitement, les réponses du colza diffèrent entre les deux extraits. Pour le traitement par AZAL5, la réponse observée après 30 jours de contact est globalement identique à celle décrite précédemment à 72h. Au contraire, pour le traitement par AH7, après 30 jours de contact, le nombre de gènes différentiellement exprimés connaît une baisse drastique et le profil métabolique de la plante change radicalement. Ainsi, on observe une répression des Heat Shock Protein, protéines impliquées dans les réponses au stress. Mais également une répression de la S-adenosylmethionine decarboxylase, une enzyme connue pour être impliquée dans la voie de synthèse des polyamines et de l'éthylène (Kumar *et al.*, 1996). Sa répression est alors susceptible d'altérer la synthèse de ces composés et donc de perturber la signalisation phytohormonale. **Il semble donc que l'extrait algal présente des conséquences moléculaires à plus long terme comparé à l'extrait AH7, ce qui pourrait permettre d'envisager un effet « starter » pour ce dernier et un effet à plus long**

terme pour l'extrait algal. L'utilisation conjointe de ces deux extraits, permettant de concilier un effet starter à un effet long terme, pourrait alors faire l'objet de nouveaux travaux visant à potentialiser l'effet individuel de chacun de ces deux extraits.

Chapitre VI

Perspectives

CHAPITRE VI

PERSPECTIVES

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de cette thèse nous ont donc permis de sélectionner, à partir de 15 extraits initiaux, deux extraits issus d'acides humiques (AH7) ou de composés algaux (AZAL5), présentant un potentiel bio-stimulant chez le colza. Nous avons ensuite précisé quelques modalités d'action de ces deux extraits, notamment sur la croissance, la photosynthèse et les nutritons N et S, mais l'approche moléculaire large que nous avons utilisée pourrait ouvrir d'autres pistes de recherche. De par la nature du projet de recherche, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées tant sur un aspect appliqué, avec pour objectif final d'utiliser ces composés en agriculture, que sur un aspect plus fondamental, visant à caractériser les signaux et les voies de régulations affectées.

Dans le cadre des démarches plus finalisées :

- Si le caractère bio-stimulant de ces extraits en hydroponie est important, leur application sur un sol restreint notoirement leur efficacité, principalement en raison des interactions potentielles importantes avec ce compartiment. Alternativement, une application de ces extraits par pulvérisation foliaire pourrait être envisagée. Les premiers effets observés à l'échelle foliaire (photosynthèse, expression du gène *MinE*, division des chloroplastes) lors de l'étude en hydroponie permettent d'envisager cette démarche avec optimisme. Un effet synergique de l'apport conjoint de ces 2 extraits pourrait aussi être testé rapidement (combinaison de l'effet « starter » de AH7 et de celui à plus long terme d'AZAL5).
- La stimulation de la croissance observée à l'échelle de la plante entière cultivée pendant 30 jours en hydroponie mériterait d'être vérifiée sur un pas de temps plus long (cycle de développement complet), notamment afin d'évaluer les conséquences de l'application de ces extraits sur l'accélération du cycle de développement et/ou sur le rendement en graines et éventuellement sur leur qualité.

- Le passage à une échelle plus large constitue un objectif inhérent à cette démarche. Moyennant l'obtention de résultats positifs lors des deux étapes précédentes, l'application de AZAL5 et AH7 par pulvérisation foliaire en condition de plein champ permettrait non seulement de confirmer leur intérêt mais également d'optimiser leur application (effet doses, conditions de potentialisation dans le cadre d'interactions avec des stress biotiques ou abiotiques). Des analyses simples pourraient alors être envisagées pour la mesure de la croissance et du rendement (par analyse de ces composantes) ainsi que pour l'absorption de l'azote et du soufre (mesure des exportations de N et S, teneur en sulfate). L'efficacité d'utilisation des engrais N et S pourrait alors être estimée par méthode isotopique. D'autres indicateurs simples dérivés de ce travail (observation en microscopie de la densité des chloroplastes, mesure de la teneur en chlorophylles et/ou de la photosynthèse nette) pourraient y être associés.
- La dernière étape consisterait à vérifier la nature bio-stimulante de ces 2 extraits sur d'autres plantes de grandes cultures (extension des travaux actuellement en cours sur le blé au CIPAV de Pampelune).

Dans le cadre de démarches plus fondamentales visant à identifier les mécanismes impliqués et leur chronologie, il paraît pertinent de :

- Vérifier l'hypothèse que l'extrait algal ou l'extrait dérivé d'acides humiques stimule le métabolisme de la plante via une induction des voies d'assimilation du N et du S au niveau des feuilles. Pour cela, une étude des modifications des profils protéomiques de la feuille de colza tout au long de son développement jusqu'à son abscission pourrait être conduite. A titre d'exemple, en utilisant les indicateurs de sénescence disponibles au laboratoire (*SAG12/Cab* ; Gombert *et al.*, 2006), il serait alors possible de déterminer l'impact de ces extraits sur la durée de vie de la feuille. De plus, les chloroplastes étant les organites les plus fortement impliqués dans les voies d'assimilation réductrice du N et S minéral aboutissant à la production d'acides aminés essentiels à la synthèse des protéines et au bon fonctionnement des feuilles du colza, une analyse du plastoprotéome pourrait être conduite afin de mieux caractériser les protéines plastidiales les plus fortement induites ou réprimées en réponses aux traitements par AZAL5 ou AH7. Ces approches protéomiques à l'échelle de l'organe (limbe foliaire) et au niveau subcellulaire

pourraient être réalisées par électrophorèses bidimensionnelles et l'identification des spots protéiques d'intérêt assurée par analyse ESI-LC MSMS. Parallèlement, une étude par microscopie confocale à balayage laser et microscopie électronique, s'appuyant sur les plateaux techniques de l'IFR ICORE (CMABio et Histo-imagerie quantitative), permettrait de vérifier l'impact de l'extrait algal sur la structure des chloroplastes (nombre, taille, forme, niveau de chlorophylles...).

- Réaliser une étude de transcriptomique ciblée sur des gènes codant des enzymes clés des métabolismes N et S. Les activités enzymatiques clés des métabolismes du N et du S constituent des facteurs déterminants de l'efficacité d'assimilation de l'N (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010) et du S (Hawkesford, 2000 ; Nikiforova *et al.*, 2005, 2006). La régulation d'enzymes plastidiales (ou situés juste en amont de la voie chloroplastique) vis-à-vis d'un traitement par AZAL5 ou AH7 devra donc être examinée avec la plus grande attention. Tout d'abord, l'étude pourrait consister à suivre l'expression de gènes codants les enzymes clés de l'assimilation du S en ciblant principalement les gènes situés en amont de la synthèse de la cystéine (ATP sulfurylase, APS réductase, Sérine Acétyl transférase...). La quantification des activités enzymatiques clés liées au métabolisme du S pourrait aussi être envisagée, ainsi que la détermination des teneurs en métabolites liés à ces activités enzymatiques. Concernant le métabolisme de l'N, l'analyse des enzymes clés du métabolisme azoté telles que la Nitrate Réductase (NR), la Nitrite Réductase (NiR), la glutamine synthase (GS) et la glutamate synthase (GOGAT) pourront être réalisées au niveau transcriptomique et au niveau enzymologique en étroite collaboration avec l'INRA de Versailles. L'étude de l'expression d'autres gènes cibles impliqués dans la régulation des processus de remobilisation de l'N (BnD22, Protéase, FTsH8, sous-unités de protéasome ; Desclos *et al.*, 2009), dans la protection des chlorophylles (Water Soluble Chlorophyll Binding Protein (WSCP), Desclos *et al.* (2009) ; gènes Stay Green (sgr), Park *et al.* (2007)), ou de gènes impliqués dans la division des chloroplastes (*Plastid Division 1 and 2* : pdv1 et 2 ; Okasaki *et al.*, 2009) pourrait également être envisagée. Toutefois, le nombre de gènes proposé ici est non exhaustif et pourra être abondé en fonction des analyses Microarray obtenus dans le cadre du présent travail doctoral.
- Caractériser les signaux à l'origine des modifications physiologiques et moléculaires induites par l'extrait algal ou dérivé d'acides humiques. Nous avons démontré que ces

deux extraits ne contiennent pas de quantités notables de phytohormones, ce qui n'interdit pas de penser qu'ils sont cependant capables d'induire leur synthèse *in planta*. Des dosages phytohormonaux des tissus végétaux en collaboration avec le CIPAV de Pampelune pourraient permettre de tester cette hypothèse. A titre d'exemple, des travaux récents (Okasaki et *al.*, 2009) montrent que des hormones de type « cytokinine-like » sont capables de stimuler une division chloroplastidiale comparable à celle que nous avons pu observer en réponse aux traitements avec AZAL5 et AH7. Par conséquent, un dosage des cytokinines *in planta* permettrait de vérifier si le phénomène observé dans notre étude est dépendant (ou non) de cette hormone.

- Analyser de façon plus globale les résultats très riches (plus de 1000 gènes différentiellement exprimés) obtenus avec les puces à ADN. Par exemple, l'expression de nombreux gènes codant des transporteurs (aquaporines, transporteurs de cobalt, de cuivre et de sodium) est également augmentée par ces deux extraits. Parallèlement, nous avons procédé, en collaboration avec le CIPAV, à l'analyse par ICP-OES (bore, calcium, cuivre, fer, potassium, manganèse, magnésium, sodium, potassium, soufre et zinc) des tissus végétaux traités par AZAL5 ou AH7. Les résultats préliminaires (non présentés dans ce manuscrit) révèlent, à l'instar de l'azote, que les contenus de la plante entière en calcium, potassium, magnésium, phosphore et bore étaient stimulés avec une ampleur équivalente à celle mesurée pour la biomasse. Par contre, à l'instar de ce que nous avons observé pour le soufre, les contenus en cuivre, sodium et manganèse étaient augmentés dans une proportion plus élevée que celle requise uniquement par l'augmentation de biomasse. Enfin, ces deux extraits semblent stimuler le transport du fer vers les parties aériennes. Des travaux complémentaires portant sur la stimulation spécifique de l'absorption, du transport et du stockage de ces éléments pourraient donc être envisagés.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdallah M, Dubousset L, Meuriot F, Etienne P, Avice JC, Ourry A (2010) Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2635-2646.

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

Abiven S, Menasseri S, Chenu C (2009) The effect of organic input over time on soil aggregate stability – A literature analysis. *Soil Biology and Biochemistry* **41**: 1-12.

Agostini F, Tei F, Silgram M, Farnselli M, Benincasa P, Aller MF (2010) Decreasing nitrate leaching in vegetable crops with better N management. *Genetic Engineering, Biofertilisation, Soil Quality and Organic Farming Sustainable Agriculture Reviews* **4**: 147-200.

Aguirre E, Leménager D, Bacaicoa E, Fuentes M, Baigorri R, Zamarreño AM and García-Mina JM (2009) The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**:215-223.

Andersson S, Nilsson SI, Saetre P (2000) Leaching of dissolved organic carbon (DOC) and dissolved organic nitrogen (DON) in mor humus as affected by temperature and pH. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1-10.

Arancon NQ, Edwards CA, Bierman P, Metzger JD, Lucht C (2005) Effects of vermicomposts produced from cattle manure, food waste and paper waste on the growth and yield of peppers field. *Pedobiologia* **49**: 297-306.

Arancon NQ, Adwards CA, Bierman P (2006) Influence of vermicomposts on field strawberries: Part 2. Effects on soil microbiological and chemical properties. *Bioresource Technology* **97**: 831-840.

Atiyeh RM, Lee S, Edwards CA, Arancon NQ, Metzger JD (2002) The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresource Technology* **84**: 7-14

Ayuso M, Hernandez T, Garcia C, Pascual JA (1996) Stimulation of barley growth and nutrient absorption by humic substances originating from various organic materials. *Bioresource Technology* **57**: 251-257.

Baigorri R, Fuentes M, González-Gaitano G, García-Mina JM (2007) Simultaneous presence of diverse molecular patterns in humic substances in solution. *Journal of Physical Chemistry B* **111**: 10577-10582.

Barancikova G, Senesi N, Brunetti G (1997) Chemical and spectroscopic characterization of humic acids isolated from different Slovak soil types. *Geoderma* **78**: 251-266.

Blunden G, Gordon SM (1986) Betaines and their sulphonate analogues in marine algae. In: Round FE, Chapman DJ (eds) *Progress in Phycological Research*, vol 4. Biopress Ltd, Bristol, pp 39–80.

Blunden G (1991) Agricultural uses of seaweeds and seaweed extracts, *in*: Guiry, M.D. *et al.* (Ed.) (1991). *Seaweed resources in Europe: uses and potential*. pp. 65-81.

Borda T, Celi L, Zavattaro L, Sacco D, Barberis E (2011) Effect of agronomic management on risk of suspended solids and phosphorus losses from soil to water. *Journal of Soil Sediments* **11**: 440-451.

Bossuyt H, Six J, Hendrix PF (2007) Protection of soil carbon by microaggregates within earthworm casts. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 251-258.

Briand X (1998) IPA-systemic nutrition in foliar fertilisers. *Agrofood Industry Hi-Tech*. **9**: 5-10.

Bungard R, Wingler A, Morton J, Andrews M, Press M, Scholes J (1999) Ammonium can stimulate nitrate and nitrite reductase in the absence of nitrate in *Clematis vitalba*. *Plant Cell and Environment* **22**: 859-866.

Canellas LP, Olivares FL, Okorokova-Façanha AL, Façanha AR (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology* **130**: 1951-1957.

Canellas LP, Piccolo A, Dobbss LB, Spaccini R, Olivares FL, Zandonadi DB, Façanha AR (2010) Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere* **78**: 457-466.

Cardon ZG, Berry J (1992) Effects of O₂ and CO₂ concentration on the steady-state fluorescence yield of single guard cell pairs of intact leaf discs of *Tradescantia albiflora*: Evidence for Rubisco-mediated carbon fixation and photorespiration in guard cells. *Plant Physiology* **99**: 1238-1244.

Carletti P, Masi A, Spolaore B, Polverino De Laureto P, De Zorzi M, Turetta L, Ferretti M, Nardi S (2008) protein expression changes in maize roots in response to humic substances. *Journal of chemical Ecology* **34**: 804-818.

Castaigns L, Marchive C, Meyer C, Krapp A (2011) Nitrogen signaling in *Arabidopsis thaliana*: How to obtain insights into a complex signaling network. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1391-1397.

Cesco S, Nikolic M, Römheld V, Varanini Z, Pinton R (2002) Uptake of ⁵⁹Fe from ⁵⁹Fe-humate complexes by cucumber and barley plants. *Plant Soil* **241**: 121-128.

Chen THH, Murata N (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current opinion in plant biology* **5**: 250-257.

Chen R, Ni Z, Nie X, Qin Y, Dong G, Sun Q (2005) Isolation and characterization of genes encoding Myb transcription factor in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science* **169**: 1146-1154.

Christl I, Kretzschner R (2001) Relating ion binding by fulvic and humic acids to chemical composition and molecular size. 1. Proton binding. *Environmental Science and Technology* **35**: 2505-2511.

Colletti KS, Tattersall EA, Pyke KA, Froelich JE, Stokes KD, Osteryoung KW (2000) A homologue of the bacterial cell division site-determining factor MinD mediates placement of the chloroplast division apparatus. *Current Biology* **10**: 507-516.

Conte P, Piccolo A (1999) Conformational arrangement of dissolved humic substances. Influence of solution composition on association of humic molecules. *Environmental Science and Technology* **33**: 1682-1690.

Cookson WR, Abaye DA, Marschner P, Murphy DV, Stockdale EA, Goulding KWT (2005) The contribution of soil organic matter fractions to carbon and nitrogen mineralization and microbial community size and structure. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 1726-1737.

Couée I, Hummel I, Sulmon C, Gouesbet G, El Amrani A (2004) Involvement of polyamine in root development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **76**: 1–10.

Cluzet S, Terregrosa C, Jacquet C, Lafitte C, Fournier J, Mercier L, Salamagne S, Briand X, Esquerré-Tugayé MT, Dumas B (2004) Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* ssp. *Plant Cell and Environment* **27**: 917-928.

Craigie JS (2011) Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology* **23**: 371-393.

Daniel-Vedele F, Filleur S, Caboche M (1998) Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 235–239.

Dejoux JF, Recous S, Meynard JM, Trinsoutrot I, Leterme P (2000) The fate of nitrogen from winter-frozen rapeseed leaves: mineralization, fluxes to the environment and uptake by rapeseed crop in spring. *Plant and Soil* **218**: 257-272.

Dell’Agnola G, Nardi S (1987) Hormone-like effect and enhanced nitrate uptake induced by depolycondensed humic fractions obtained from *Allolobophora rosea* and *A. caliginosa* faeces. *Biology and Fertility of Soil* **4**: 115-118.

Desclos M, Dubousset L, Etienne P, Bonnefoy J, Lecahérec F, Satoh H, Ourry A, Avice JC (2008) A proteomic profiling approach to reveal a novel role of BnD22 (*Brassica napus*

drought 22)/ water soluble chlorophyll binding protein in young leaves during nitrogen remobilization induced by stressful condition. *Plant Physiology* **147**: 1830-1844.

Desclos M, Etienne P, Coquet L, Jouenne T, Bonnefoy J, Segura R, Rezé S, Ourry A, Avice JC (2009) A combined ¹⁵N tracing/proteomic study in *Brassica napus* reveals the chronology of proteomics events associated with N remobilisation during leaf senescence induced by nitrate limitation or starvation. *Proteomics* **9**: 3580-3606.

Dreccer MF, Schapendonk AHM, Slafer GA, Rabbinge R (2000) Comparative response of wheat and oilseed rape to nitrogen supply: absorption and utilization efficiency of radiation and nitrogen during reproductive stage determining yield. *Plant and Soil* **220**: 189-205.

Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L (2010) MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* **15**: 573-581.

Dubousset L, Abdallah M, Desfeux A-S, Etienne P, Meuriot F, Hawkesford MJ, Gombert J, Segura R, Bataillé M-P, Rezé S, Bonnefoy J, Ameline A-F, Ourry A, Le Dily F, Avice J-C (2009) Remobilization of leaf S compounds and senescence in response to restricted sulphate supply during the vegetative stage of oilseed rape are affected by mineral N availability. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3239-3253.

Duchaufour P (1970) *Precis de pédologie*. Masson et Cie Editeurs. Paris. 488 p

Durand N, Briand X, Meyer C (2003) The effect of marine bioactive substance (N PRO) and exogenous cytokinins on nitrate reductase activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **119**: 489-493.

Edwards CA, Arancon NQ, Vasko-Bennett M, Askar A, Keeney G, Little B (2010) Suppression of green peach aphid (*Myzus persicae*) (Sulz.), citrus mealybug (*Planococcus citri*) (Risso), and two spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) (Koch.) attacks on tomatoes and cucumbers by aqueous extracts from vermicomposts. *Crop protection* **29**: 80-93

Esparza I, Salinas I, Santamaria C, Garcia-Mina JM, Fernandez JM (2005) Electrochemical and theoretical complexation studies for Zn and Cu with individual polyphenols. *Analytica Chimica Acta* **543**: 267-274

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

Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* **5**: 199-206.

Evans ML, Mulkey TJ, Vesper MJ (1980) Auxin action on proton influx in corn roots and its correlation with growth. *Planta* **148**: 510-512.

Eyheraguibel B, Silvestre J, Morard P (2008) Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresource Technology* **99**: 4206-4212.

Forde B, Lorenzo H (2001) The nutritional control of root development. *Plant and Soil* **232**: 51-68.

Forrest KL, Bhave M (2007) Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype. *Funct Integr Genomics* **7**: 263-289.

Garcia-Mina JM, Antolin MC, Sanchez-Diaz M (2004) Metal-humic complexes and plant micronutrient uptake: a study based on different plant species cultivated in diverse soil types. *Plant and Soil* **258**: 57-68.

Garcia-Mina JM (2006) Stability, solubility and maximum metal-binding capacity in metal-humic complexes involving humic substances extracted from peat and organic compost. *Organic Geochemistry* **37**: 1960-1972.

Gardissal CD (1857) A method of treating and preparing seaweeds or marine plants for manure. British Patent vol. XXIX January– June.

Gombert J, Etienne P, Ourry A, Le Dilly F (2006) The enlargement of expression of the *SAG12* gene displays a gradation of leaf senescence along the axis of *Brassica napus* L. whole plant. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1949-1956.

Gorova A, Skvortosa T, Klimkina I, Pavlichenko A (2005) Cytogenetic effects of humic substances and their use for remediation of polluted environments. In: Perminova IV (Eds.) *Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice*. Springer, Netherlands, 311-328.

Hankins SD, Hockey HP (1990) The effect of a liquid seaweed extract from *Ascophyllum nodosum* (Fucales, Phaeophyta) on the two-spotted red spider mite *Tetranychus urticae*. *Proceedings of the International Seaweed Symposium* **13**: 555-559.

Hawkesford MJ (2000) Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. *Journal of Experimental Botany* **51**: 131-138.

Hervé RA, Roullier DL (1977) Method and apparatus for communiting (sic) marine algae and the resulting product. United States Patent 4,023,734.

Heyl A, Riefler M, Romanov GA, Schmülling T (2011) Properties, functions and evolution of cytokinin receptors. *European Journal of Cell Biology*, doi:10.1016/j.ejcb.2011.02.009.

Holmström K-O, Somersalo S, Mandal A, Palva TE, Welin B (2000) Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *Journal of Experimental Botany* **51**: 177-185.

Hong DD, Hien HM, Son PN (2007) Seaweeds from Vietnam used for functional food, medicine and biofertilizer. *Journal of Applied Phycology* **19**: 817–826.

Imbufe AU, Patti AF, Burrow D, Surapaneni A, Jackson WR, Milner AD (2005) effects of potassium humate on aggregate stability of two soils from Victoria, Australia. *Geoderma* **125**: 321-330.

Itoh R, Fujiwara M, Nagata N, Yoshida S (2001) A chloroplast protein homologous to the eubacterial topological specificity factor MinE plays a role in chloroplast division. *Plant Physiology* **127**: 1644-1655.

Jayaraj J, Wan A, Rahman M, Punja ZK (2008) Seaweed extract reduces foliar fungal diseases on carrot. *Crop Protection* **27**: 1360-1366.

Jia Y, Tang S, Wang R, Ju X, Ding Y, Tu S, Smith DL (2010) Effects of elevated CO₂ on growth, photosynthesis, elemental composition, antioxidant level, and phytochelatin concentration in *Lolium mutiforum* and *Lolium perenne* under Cd stress. *Journal of Hazardous Material* **180**: 384-394.

Jiang HM, Yang JC, Zhang JF (2007) Effects of external phosphorus on the cell ultrastructure and the chlorophyll content of maize under cadmium and zinc stress. *Environmental pollution* **147**: 750-756.

Johnson ET, Dowd PF (2004) Differentially enhanced insect resistance, at a cost, in *Arabidopsis thaliana* constitutively expressing a transcription factor of defensive metabolites. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **52**(16): 5135-5138.

Jones HG (1998) Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *Journal of Experimental Botany* **49**: 387-398.

Juste E, Jeuffroy MH, Mary B (1997) Wheat, barley and durum wheat. In "Diagnosis of the nitrogen status in crops", G. Lemaire (Ed), Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 71-91.

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

Keeling AA, McCallum KR, Beckwith CP (2003) Mature green waste compost enhances growth and nitrogen uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.) and oilseed rape (*Brassica napus* L.) through the action of water-extractable factors. *Bioresource Technology* **90**: 127-132.

Kelley KB, Riechers DE (2007) Recent developments in auxin biology and new opportunities for auxinic herbicide research. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **89**: 1-11.

Khan W, Rayirath UP, Subramanian S, Jithesh MN, Rayorath P, Hodges DM, Critchley AT, Craigie JS, Norrie J, Prithiviraj B (2009) Seaweed extract as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation* **28**: 386-399.

Khan W, Hiltz D, Critchley AT, Prithiviraj B (2011) Bioassay to detect *Ascophyllum nodosum* extract-induced cytokinin-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Applied Phycology* **19**: 409-414.

Kojo KH, Fujiwara MT, Itoh RD (2009) Involvement of *AtMinE* in plastid morphogenesis in various tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **73**: 2632-2639.

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

Kozuch J, Pempkowiak J (1996) molecular weight of humic acids as a major property of the substances influencing the accumulation rate of cadmium by a blue mussel (*Mytilus edulis*). *Environment international* **22**: 585-589.

Krouk G., Lacombe B, Bielach A, Perrine-Walker F, Malinska K, Mounier E, Hoyerova K, Tillard P, Leon S, Ljung K, Zazimalova E, Benkova E, Nacry P, Gojon A (2010) Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental Cell* **18**: 927-937.

Kumar A, Taylor MA, Mad Arif SA, Davies HV (1996) Potato plants expressing antisense and sense S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. *The Plant Journal* **9**: 147-158.

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

Lakhdar A, Hafsi C, Rabhi M, Debez A, Montemurro F, Abdely C, Jedidi N, Ouerghi Z (2008) Application of municipal solid waste compost reduces the negative effects of saline water in *Hordeum maritimum* L. *Bioresource Technology* **99**: 7160-7167.

Lemaire G, Salette J (1981) Analyse de l'influence de la température sur la croissance de printemps de graminées fourragères. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 292, 843-846.

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

Liang Y, Si J, Nikolic M, Peng Y, Chen W, Jiang Y (2005) Organic manure stimulate biological activity and barley growth in soil subjected to secondary salinization. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 1185-1195.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(DDC(t)) method. *Methods* **25**: 402-408.

Malagoli P, Laine P, Rossato L, Ourry A (2005a) Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) from stem extension to harvest. II A ¹⁵N-labelling based simulation model of N partitioning between vegetative and reproductive tissues. *Annals of Botany* **95**: 1187-1198.

Malagoli P, Laine P, Rossato L, Ourry A (2005b) Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) from stem extension to harvest. I Global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation with leaf fall and their residual N. *Annals of Botany* **95**: 853-861.

Mancuso S, Azzarello E, Mugnai S, Briand X (2006) Marine bioactive substance (IPA extract) improve foliar ion uptake and water stress tolerance in potted *Vitis vinifera* plants. *Advances in Horticultural Science* **20**: 156-161.

Mapple J, Chua N-H, Moller SG (2002) The topological specificity factor AtMinE1 is essential for correct plastid division site placement in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **31**: 269-277.

Mapple J, Moller SG (2007) Plastid division: Evolution, mechanism and complexity. *Annals of Botany* **99**: 565-579.

Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gauffichon L, Suzuki A (2010) Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* **105**: 1141-1157.

Marrison JL, Rutherford SM, Robertson EJ, Lister C, Dean C, Leech RM (1999) The distinctive roles of five different *ARC* genes in the chloroplast division process in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **18**: 651-662.

Mercier L, Lafitte C, Borderies G, Briand X, Esquerré-Tugayé MT, Fournier J (2001) The algal polysaccharide carrageenans can act as elicitor of plant defense. *New Phytologist* **149**: 43-51.

Mérigout P (2006) Etude du métabolisme de la plante en réponse à l'apport de différents fertilisants et adjuvants culturels. Influence des phytohormones sur le métabolisme azoté. PhD Thesis, INRA Paris-Grignon, France.

Metting B, Rayburn WR, Reynaud PA (1988) Algae and agriculture. In Lembi C and Waaland JR *Algae and Human Affairs*. Cambridge University Press, New York. p. 335-370.

Miyagishima S (2005) origin and evolution of the chloroplast division machinery. *Journal of Plant Research* **118**: 295-306.

Milton RF (1952) Improvements in or relating to horticultural and agricultural fertilizers. The Patent Office London, no. 664:989.

Mora V, Bacaicoa E, Zamarreno AM, Aguirre E, Garnica M, Fuentes M, Garcia-Mina JM (2010) Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-

related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *Journal of Plant Physiology* **167**: 633-642.

Moroney JV, Bartlett SG, Samuelsson G (2001) Carbonic anhydrase in plants and algae. *Plant Cell and Environment* **24**: 141-153.

Mugnai S, Azzarello E, Pandolfi C, Salamagne S, Briand X, Mancuso S (2008) Enhancement of ammonium and potassium root influxes by the application of marine bioactive substances positively affects *Vitis vinifera* plant growth. *Journal of Applied Phycology* **20**: 177-182.

Muscolo A, Panuccio MR, Abenavoli MR, Concheri G, Nardi S (1996) Effect of molecular complexity and acidity of earthworm faeces humic fractions on glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, and phosphoenolpyruvate carboxylase in *Daucus carota* áII cells. *Biology and Fertility of Soils* **22**: 83-88.

Muscolo A, Cutrupi S, Nardi S (1998) IAA detection in humic substances. *Soil Biology and Biochemistry* **30**: 1199-1201.

Muscolo A, Bovalo F, Gionfriddo F, Nardi S (1999) Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biology and Biochemistry* **31**: 1303-1311.

Muscolo A, Sidari M, Attina M, Francioso O, Tugnoli V, Nardi S (2007a) Biological activity of humic substances is related to their chemical structure. *Soil Science Society of America Journal* **71**: 75-85.

Muscolo A, Sidari M, Francioso O, Tugnoli V, Nardi S (2007b) The auxin-like activity of humic substances is related to membrane interactions in carrot cell culture. *Journal of Chemical Ecology* **33**: 115-129.

Najeeb U, Jilani G, Ali S, Sarwar M, Xu L, Zhou W (2011) Insights into cadmium induced physiological and ultra-structural disorders in *Juncus effusus* L. and its remediation through exogenous citric acid. *Journal of Hazardous Materials* **186**: 565-574.

Nardi S, Concheri G, Pizzeghello D, Sturaro A, Rella R, Parvoli G (2000a) Soil organic matter mobilization by root exudates. *Chemosphere* **41**: 653-658.

Nardi S, Pizzeghello D, Gessa C, Ferrarese L, Trainotti L, Casadoro G (2000b) A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 415-419.

Nardi S, Pizzeghello D, Reniero F, Rascio N (2000c) Chemical and biochemical properties of humic substances isolated from forest soils and plant growth. *Soil Science Society of America Journal* **64**: 639-645.

Nardi S, Pizzeghello D, Muscolo A, Vianello A (2002a) Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry* **34**: 1527-1536.

Nardi S, Sessi E, Pizzeghello D, Sturaro A, Rella R, Parvoli G (2002b) Biological activity of soil organic matter mobilized by root exudates. *Chemosphere* **46**: 1075-1081.

Nardi S, Tosoni M, Pizzeghello D, Provenzano MR, Cilenti A, Sturaro A, Rella R, Vianello A (2005) Chemical characteristics and biological activity of organic substances extracted from soil by root exudates. *Soil Science Society of America Journal* **69**: 2012-2019.

Nardi S, Muscolo A, Vaccaro S, Baiano S, Spaccini R, Piccolo A (2007) Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and krebs cycle in maize seedlings. *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 3138-3146.

Nelson WR, Van Staden J (1984) The effect of seaweed concentrate on the growth of nutrient-stressed, greenhouse cucumbers. *Horticultural Science* **19**: 81-82.

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

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

Noquet C, Avice JC, Rossato L, Beauclair P, Henry MP, Ourry A (2004) Effect of altered source-sink relationships on N allocation and vegetative storage protein accumulation in *Brassica napus* L. *Plant Science* **166**: 1007-1018.

Okazaki K, Kabeya Y, Suzuki K, Mori T, Ichikawa T, Matsui M, Nakanishi H, Miyagishima S (2009) The PLASTID DIVISION 1 and 2 component of the chloroplast division machinery determine the rate of chloroplast division in land plant cell differentiation. *Plant Cell* **21**: 1769-1780.

Ougham HJ, Thomas AM, Thomas BJ, Frick GA, Armstrong GA (2001) Both light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase A and protochlorophyllide oxidoreductase B are down-regulated in the slender mutant of barley. *Journal of Experimental Botany* **360**: 1447-1454.

Park SY, Yu JW, Li J, Yoo SC, Lee NY, Lee SK, Jeong SW, Seo HS, Koh HJ (2007) The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. *Plant Cell* **19**: 1649-1664 .

Patriquin DG, Baines D, Abboud A (1995) Diseases, pests and soil fertility. In: Cook, H.F., Lee, H.C. (Eds.), *Soil Management in Sustainable agriculture*. Wye College Press, Wye, UK, pp. 161-174.

Piccolo A, Pietramellara G, Mbagwu JSC (1997a) Reduction in soil loss from erosion-susceptible soils amended with humic substances from oxidized coal. *Soil Technology* **10**: 235-245.

Piccolo A, Pietramellara G, Mbagwu JSC (1997b) Use of humic substances as soil conditioners to increase aggregate stability. *Geoderma* **75**: 267-277.

Pilet PE, Elliott MC, Moloney MM (1979) Endogenous and exogenous auxin in the control of root growth. *Planta* **146**: 405-408.

Pinton R, Cesco S, Iacoletti G, Astolfi S, Varanini Z (1999) Modulation of NO₃⁻ uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H⁺ATPase. *Plant and Soil* **215**: 155-161.

Puglisi E, Fragoulis G, Ricciuti P, Cappa F, Spaccini R, Piccolo A, Trevisan M, Grecchio C (2009) Effects of humic acid and its size-fractions on the bacterial community of soil rhizosphere under maize (*Zea mays* L.). *Chemosphere* **77**: 829-837.

Quaggiotti S, Ruperti B, Pizzeghello D, Francioso O, Tugnoli V, Nardi S (2004) Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany* **55**: 803-813.

Ramanan R, Kannan K, Vinayagamoorthy N, Ramkumar KM, Sivanesan SD, Chakrabarti T (2009) Purification and characterization of a novel plant-type carbonic anhydrase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **14**: 32-37.

Rathore SS, Chaudhary DR, Boricha GN, Ghosh A, Bhatt BP, Zodape ST, Patolia JS (2009) Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. *South African Journal of Botany* **75**: 351-355.

Rayirath P, Benkel B, Hodges DM, Allan-Wojitas P, MacKinnon S, Critchley AT, Prithiviraj B (2009) Lipophilic component of the brown seaweed, *Ascophyllum nodosum*, enhance freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **230**: 135-147.

Rayorath P, Jithesh MN, Farid A, Khan W, Palanisamy R, Hankins SD, Critchley AT, Prithiviraj B (2008) Rapid bioassay to evaluate the plant growth promoting activity of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. using a model plant, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Journal of Applied Phycology* **20**: 423-429.

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

Roussos PA, Denaka NK, Damvakaris T (2009) Strawberry fruit quality attributes after application of plant growth stimulating compounds. *Scientia Horticulturae* **119**: 138-146.

Russell L, Stokes AR, Macdonald H, Muscolo A, Nardi S (2006) Stomatal response to humic substances and auxin are sensitive to inhibitors of phospholipase A₂. *Plant and Soil* **283**: 175-185.

Sakamoto A, Murata N (2002) The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* **25**: 163-171.

Schmidt W, Santi S, Pinton R, Varanini Z (2007) Water-extractable humic substances alter root development and epidermal cell pattern in *Arabidopsis*. *Plant and Soil* **300**: 259-267.

Schwartz A, Ilan N, Grantz DA (1988) Calcium effect on stomatal movement in *Commelina Communis* L. *Plant Physiology* **87**: 583-587.

Singh N, Ma LQ, Srivastava M, Rathinasabapathi B (2006) Metabolic adaptations to arsenic induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science* **170**: 274-282.

Sivasankari S, Venkatesalu V, Anantharaj M, Chandrasekaran M (2006) Effect of seaweed extracts on the growth and biochemical constituents of *Vigna sinensis*. *Bioresource Technology* **97**: 1745-1751.

Smejkalova D, Piccolo A (2008) Aggregation and disaggregation of humic supramolecular assemblies by NMR diffusion ordered spectrometry (DOSY-NMR). *Environmental Science and Technology* **42**: 699-706.

Spinelli F, Fiori G, Noferini M, Sprocatti M, Costa G (2010) A novel type of seaweed extract as a natural alternative to the use of iron chelates in strawberry production. *Scientia Horticulturae* **125**: 263-269.

Subramanian S, Sangha JS, Gray BA, Singh RP, Hiltz D, Critchley AT, Prithiviraj B (2011) Extracts of the marine brown macroalga, *Ascophyllum nodosum*, induce jasmonic acid dependent systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of plant Pathology* DOI 10.1007/s10658-011-9802-6.

Sutton R, Sposito G (2005) Molecular structure in soil humic substances: The new view. *Environmental Science and Technology* **39**: 9009-9015.

Swift RS (1996) Organic matter characterization, in *Methods of soil analysis Part 3 Chemical methods SSSA Book Ser5*, ed. by Sparks DL, SSSA, Madison, WI, pp 1011-1069.

Tejada M, Gonzalez JM (2004) Effects of foliar application of a byproduct of the two-step olive oil mill process on rice yield. *European Journal of Agronomy* **21**: 31-40.

Temple WD, Bomke AA (1988) Effects of kelp (*Macrocystis integrifolia*) on soil chemical properties and crop responses. *Plant and Soil* **105**: 213-222.

Trevisan S, Botton A, Vaccaro S, Vezzaro A, Quaggiotti S, Nardi S (2011) Humic substances affect *Arabidopsis thaliana* physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. *Environmental and Experimental Botany* **74**: 45-55.

Turan M, Köse C (2004) Seaweed extracts improve copper uptake of grapevine. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science* **54**: 213–220.

Varga B, Kiss G, Galambos I, Gelencser A, Hlavay J, Krivacsy Z (2000) Secondary structure of humic acids. Can micelle-like conformation be proved by aqueous size exclusion chromatography? *Environmental Science and Technology* **34**: 3303-3306.

Vaughan DA, Balazs E, Heslop-Harrison JS (2007) From crop domestication to super-domestication. *Annals of Botany* **100**: 893-901.

Visser SA (1985) Viscometric studies on molecular weight fractions of fulvic and humic acids of aquatic, terrestrial and microbial origin. *Plant and Soil* **87**: 209-221.

Wu Y, Jenkins T, Blunden G, Von Mende N, Hankins SD (1998) Suppression of fecundity of the rootknot nematode, *Meloidogyne javanica*, in monoxenic cultures of *Arabidopsis thaliana* treated with an alkaline extract of *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Applied Phycology* **10**: 91–94.

Zandonadi DB, Canellas LP, Façanha AR (2007) Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta* **225**: 1583-1595.

Zhang X, Schmidt RE (1997) The impact of growth regulators on the α -tocopherol status in water-stressed *Poa pratensis*. *International Turfgrass Society Research Journal* **8**: 1364–1371.

Caractérisation des modifications physiologiques et métaboliques induites chez *Brassica napus* L. par l'apport d'extraits algaux ou d'acides humiques

Résumé : Le colza est caractérisé par une faible efficacité d'utilisation de l'azote et requiert une fertilisation azotée importante. L'utilisation de substances ayant un rôle biostimulant pourrait constituer une alternative d'amélioration de son bilan agroenvironnemental. Les actions bénéfiques des extraits algaux ou dérivés d'acides humiques ont été décrites sur l'augmentation de production de biomasse et le rendement des plantes. Bien que ces effets aient été largement décrits sur le plan physiologique, aucune étude n'a été réalisée à l'échelle du transcriptome afin de déterminer leurs cibles métaboliques chez les plantes. Dans ce travail, un criblage réalisé à partir de 10 extraits humiques et de 5 extraits algaux a permis d'identifier un acide humique (AH7) et un extrait algal (AZAL5) augmentant la production de biomasse et la teneur foliaire en chlorophylles du colza. Une comparaison par microarray des transcriptomes de colzas traités ou non par ces extraits, couplée à des analyses d'activités enzymatiques et d'expression de gènes par q-PCR a permis de mettre en évidence une action globale des extraits AH7 et AZAL5 sur le métabolisme du colza (expression différentielle de plus de 1000 gènes). Les effets d'une exposition à AH7 et AZAL5 se traduisent à moyen et long termes, respectivement, par une stimulation des nutriments azotés et sulfurés avec pour cette dernière, une augmentation supérieure à celle requise par l'augmentation de biomasse. Cette activation des voies d'assimilation est associée à une augmentation massive du nombre de chloroplastes par cellule observée dès les 24 premières heures de contact entre le colza et l'extrait algal ou l'acide humique. Après une discussion générale des résultats, les perspectives de ce travail sont présentées.

Mots clés : Analyses microarrays, azote, acides humiques, chloroplastes, colza, extraits algaux, nitrate, sulfate, transporteurs.

Characterization of physiological and metabolic modifications induced in *Brassica napus* L. by seaweed extract and humic acids.

Abstract: Rapeseed is characterized by a low nitrogen use efficiency, thus requiring high N fertilization rate to maintain yield. Biostimulant application on this crop could improve its agroenvironmental balance. Seaweed extracts and humic acids are known for their beneficial effects on plant growth and yield. However, despite some physiological effects that have been already described, only few studies focused on the action of these extracts on transcriptome expression to identify their metabolic targets. A screening procedure of 10 humic acids and 5 seaweed extracts was used to identify one humic acid (AH7) and one seaweed extract (AZAL5) which increased rapeseed growth weight and leaf chlorophyll content. A microarray comparison of treated and non-treated rapeseed transcriptome was associated with enzymatic activity analysis and q-PCR analysis of gene expressions. It revealed that humic acid and seaweed extract presents a global action on rapeseed metabolism (with more than 1000 genes differentially expressed). The effect of plant exposition to AH7 and AZAL5 occurred at short and long term, respectively, through a stimulation of nitrogen and sulphur metabolisms with for the latter an increase that was higher than the one expected from higher growth rate. These effects were associated with massive enhancement of chloroplast number per cell during the first 24 hours of rapeseed exposition to humic acid or seaweed extract. A general discussion of results is then presented before perspectives of this work.

Keywords: Humic acids, chloroplasts, rapeseed, nitrogen, seaweed extract, microarrays analysis, nitrate, sulphate.

Thèse / PhD thesis de l'Université de Caen – Ecole doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement – Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée – UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutriments N, C, S. Université de Caen Basse Normandie.