



HAL
open science

Contribution au développement d'un indicateur de la nutrition soufrée et de fertilisants innovants chez le blé tendre d'hiver (*Triticum aestivum* L.)

Marion Serot

► **To cite this version:**

Marion Serot. Contribution au développement d'un indicateur de la nutrition soufrée et de fertilisants innovants chez le blé tendre d'hiver (*Triticum aestivum* L.). Sciences agricoles. 2013. dumas-00912360

HAL Id: dumas-00912360

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00912360>

Submitted on 2 Dec 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Remerciement

J'adresse tout d'abord mes remerciements au directeur du laboratoire, M. Jean-Claude Yvin pour m'avoir accueilli au sein du CRIAS afin de réaliser ce stage de dernière année. Je souhaite également remercier l'ensemble du personnel du CRIAS avec lequel j'ai évolué pendant ces six mois de stage.

J'adresse une attention particulière à mon maître de stage Mustapha Arkoun qui a consciencieusement encadré mon travail tout en me laissant autonome, et qui s'est tenu très présent et source de bons conseils lors de la rédaction de ce mémoire.

J'adresse aussi mes remerciements aux personnes avec qui j'ai été amenée à travailler, à savoir :

- Noemie Vimont pour son indispensable aide au laboratoire et sa bonne humeur constante.
- Marion Randu qui m'a été d'un grand secours pour obtenir mes résultats à temps.
- Karine pour ses conseils techniques et éclairés sur les criblages de biostimulants et bonnes pratiques de laboratoires.

Je souhaite de la même façon remercier Soulayman SAKR, mon tuteur de stage, pour le temps qu'il m'a accordé et pour ses conseils précieux et avisés.

Je voudrais enfin remercier, Raphaël, Antoine et Noémie qui ont rendu ce séjour à Saint Malo fort amusant.

Liste des sigles et abréviations

- ABA : Acide abscissique
- APR : Adénosine 5'-phosphosulfate réductase
- APS : Adénosine 5'-phosphosulfate
- ATPS : ATP Sulfurylase
- Cl⁻ : Chlorure
- EPS : Efficience de Prélèvement du Soufre
- ERS : Efficience de Remobilisation du Soufre
- EUA : Efficience d'Utilisation de l'Azote
- EUS : Efficience d'Utilisation du Soufre
- GSH : Glutathion
- Laminaria70 : Extrait de *Laminaria d.* à une concentration hydroponique de 70 mg.L⁻¹
- MS : Matière sèche
- N : Azote
- NBI : Nitrogen Balance Index
- NR : Nitrate Réductase
- NO₃⁻ : Nitrate
- OAD : Outil d'Aide à la Décision
- OAS : O-acétylsérine
- OAS-TL : O-acétylsérine-thiol-lyase
- PAPS : 3'-phospho-5'-adénylylsufate
- PO₄³⁻ : Phosphate
- Ulva70 : Application d'*Ulva spp.* à une concentration hydroponique de 70 mg.L⁻¹
- Ulva140 : Application d'*Ulva spp.* à une concentration hydroponique de 140 mg.L⁻¹
- Undaria70 : Application d'*Undaria p.* à une concentration hydroponique de 70 mg.L⁻¹
- S : Soufre
- +S : Modalité témoin (en présence de Soufre)
- - S : Modalité carencée en Soufre
- SAM : S-Adenosyl methionine
- SAT : Sérine Acétyl Transférase
- SIR : Sulfite réductase
- SO₂ : Dioxyde de soufre
- SO₄²⁻ : Sulfate
- SULTR : Sulfate transporter

Table des matières

I- Etat de l'art	1
II- Etude bibliographique	3
A. Le Soufre, élément indispensable pour les cultures	3
B. Acquisition et devenir du Soufre dans la plante	3
B-1. Origine du Soufre dans l'environnement.....	3
B-2. La fertilisation soufrée des cultures.....	4
B-3. Absorption et Assimilation du Soufre par la plante	4
C. Caractérisation d'une carence en Soufre	5
C-1. Réponses physiologiques et mécanismes de Régulation	5
i. Au niveau agronomique	5
ii. Au niveau physiologique	6
iii. Modifications métaboliques.....	7
iv. Perturbations hormonales	7
C-2. Interactions avec le métabolisme Carboné et Azoté	8
D. Diagnostic de carence soufrée et les Outils d'Aide à la Décision	9
E. Stratégies d'amélioration de l'Efficiéce d'Utilisation du Soufre	12
E-1. Le marché des biostimulants.....	12
E-2. Les propriétés biostimulantes des extraits algaux	12
i. Les algues utilisées en Agriculture.....	12
ii. Biostimulation, croissance et développement des plantes	13
iii. Biostimulation et nutrition des plantes	13
F. Les objectifs de l'étude	15
III- Matériels et Méthodes	16
A. Matériel végétal et conditions de culture	16
A-1. Germination des graines et culture en hydroponie.....	16
A-2. Origine des algues et préparation des extraits.....	16
A-3. Plan d'expérimentation et application des traitements	16
i. Etude de la carence en Soufre	16
i. Criblage des extraits d'algue	17
B. Mesure des paramètres physiologiques de la plante	17
B-1. Détermination des biomasses foliaires et racinaires.....	17
B-2. Détermination des teneurs foliaires en chlorophylle.....	17
C. Analyses biochimiques	18
C-1. Extraction et dosage des sulfates, nitrates, chlorures et phosphates	18
C-2. Préparation des échantillons et détermination des teneurs en N et S total	18
C-3. Mesure de l'activité nitrate réductase.....	18
D. Traitement statistique des données	19
IV- Résultats	20
A. Etude de la carence en Soufre chez le blé	20
A-1. Effet d'une carence en soufre sur la physiologie de la plante	20
A-2. Effet d'une carence en soufre sur le métabolisme de la plante	21
A-3. Evolution de différents ratios au cours du temps.....	23
B. Criblage des extraits d'algue	23
B-1. Effet des extraits sur la production de biomasse du blé	23





B-2. Effet des extraits sur l'absorption et l'assimilation du Soufre.....	24
V- Discussion	25
A. Les indicateurs potentiels de carence en Soufre chez le blé (<i>Triticum aestivum</i> L)...	25
A-1. Impact d'une carence en soufre sur la croissance du blé	25
A-2. Impact d'une carence en soufre sur le métabolisme soufré et azoté.....	26
A-3. Impact d'une carence en soufre sur le contenu en anions	26
A-4. Quels indicateurs pour la nutrition soufrée chez le blé ?	27
B. Biostimulation de la nutrition soufrée chez le blé (<i>Triticum aestivum</i> L).....	28
VI- Conclusions et perspectives	30
VII- Bibliographie et sitographie	32



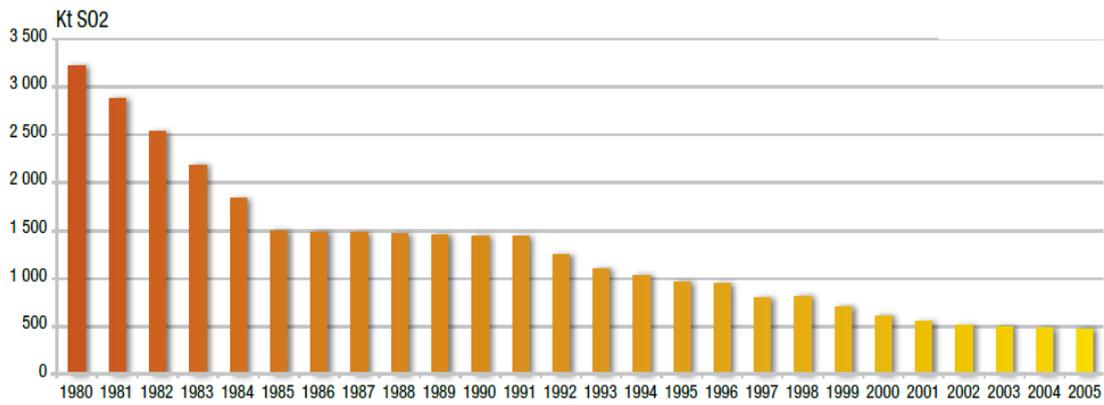


Figure 1 : Evolution des émissions de SO₂ dans l'atmosphère (en kt) entre 1980 et 2005 en France Métropolitaine (Source : CITEPA)

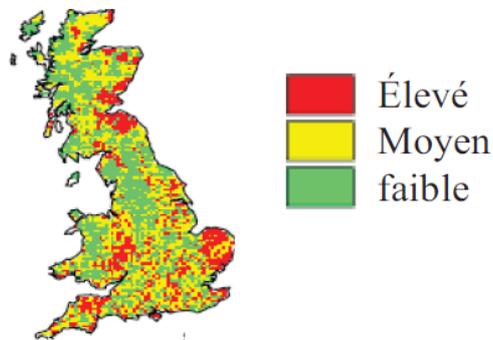


Figure 2 : Cartographie des zones à risque de déficience en soufre en fonction des retombées atmosphériques au Royaume-Uni (Source : Institute of Arable Crops Research – Rothamstead)

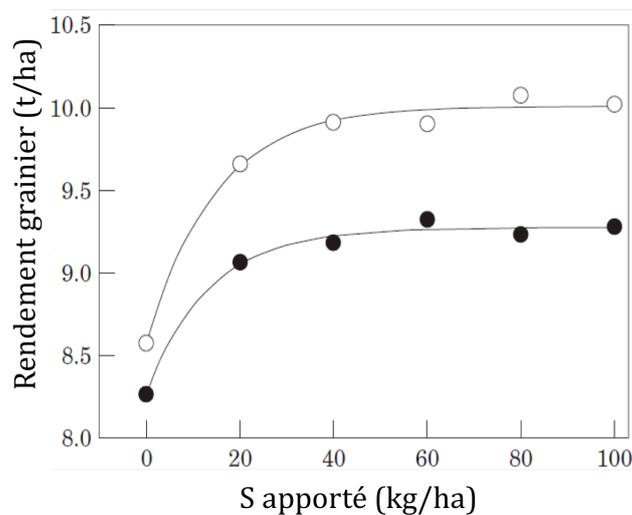


Figure 3 : Evolution du rendement grainier de blé (*Triticum aestivum* L) en fonction de l'apport de soufre. □ : 180 kg N/ha ; o : 230 kg N/ha (Whithers *et al.*, 1995)



I - Etat de l'art

Depuis les années 80, les dépôts atmosphériques de dioxyde de soufre (SO₂) sur les terres agricoles ont diminué de plus de 80 % (CITEPA, 2012, Figure 1) grâce aux efforts considérables de réduction d'émissions industrielles. Les applications d'engrais soufrés ont, quant à eux, diminué de près de 30 % entre 1999 et 2010 (Unifa, 2010). Ainsi, l'exportation de soufre (S) par les cultures et la forte diminution des apports sur les sols agricoles engendrent un épuisement progressif en soufre des sols (Scherer, 2001), entraînant des débuts de carence sur de nombreuses cultures (colza, blé, prairie) comme il a été observé en Angleterre durant cette dernière décennie (Blake-Kalff *et al.*, 2001, Figure 2).

Le soufre est pourtant le 4ème élément fertilisant le plus important pour les plantes après le tryptique azote (N), phosphore (P) et potassium (K). Chez le blé, une carence en soufre peut entraîner une perte de rendement de 2 à 10 quintaux/ha dans la plupart des cas et jusqu'à 20 q/ha pour les carences sévères (Arvalis, 2013, Figure 3).

D'un point de vue qualitatif, une telle carence diminue la qualité boulangère de la farine de blé (Zhao *et al.*, 1999). Cette importance agronomique s'explique par le rôle physiologique du soufre qui, en interaction avec les métabolismes azotés (N) et carbonés (C), est impliqué dans la synthèse d'acides aminés indispensables à la formation et aux fonctionnements de diverses protéines (Droux, 2004). Il entre également dans la composition de molécules nécessaires à la synthèse de la chlorophylle, de phytohormones, de peptides, de lipides ou encore de vitamines. De par la synergie qui existe entre les métabolismes soufrés et azotés, un apport optimal en soufre induit une augmentation des capacités d'assimilation de l'azote par la plante (Fismes *et al.*, 2000 ; Kopriva and Rennenberg, 2004) et donc une meilleure Efficience d'Utilisation de l'Azote (EUA).

Dans le sol, le soufre se trouve essentiellement sous forme organique (90 à 95%, Gharmakher *et al.*, 2009, Figure 5) et est absorbé par les plantes sous forme de sulfate (SO₄²⁻, élément particulièrement sensible au lessivage). La richesse d'un sol en S renseigne peu sur sa disponibilité pour la nutrition de la plante. De ce fait, les instituts techniques en France recommandent souvent d'apporter des engrais soufrés pour les plantes de grande culture. Ces recommandations dites de sécurité, ne sont cependant pas raisonnées car ne prennent pas en compte la disponibilité du S du sol pour les plantes. Il en résulte des conditions de sur-fertilisation pouvant conduire à des excédents de sulfate dans la culture ou bien dans le sol, ou à l'inverse, à des conditions de carence qui réduiront l'EUA (Schnug *et al.*, 1993).

Avec un bilan soufre déficitaire en France, il devient essentiel de maîtriser la fertilisation soufrée afin d'éviter les manques comme les excès dans les apports. Des études ont cherché à développer des indicateurs de la nutrition soufrée qui permettraient d'apporter à la culture la quantité de S uniquement requise. Cependant, il n'existe pas de méthode de diagnostic fiable et simple de la nutrition soufrée ou du potentiel de fourniture du sol qui permettrait de pouvoir raisonner la fertilisation soufrée.





Dans ce contexte, le Centre de Recherche & Développement de Timac Agro International (groupe Roullier) spécialisé dans la nutrition végétale et animale, a initié le projet SERAPIS, labellisé par deux pôles de compétitivité (Vegepolys et Valorial) avec de nombreux partenaires (Végénov BBV, INRA-UCBN 950 EVA de Caen, INRA Legume Research Laboratory- UMR LEG à Dijon, Groupe ESA – UR LEVA à Angers, société Anaximandre). Le but de ce partenariat est de développer simultanément, des indicateurs de fertilisation soufrée, des fertilisants innovants avec activateur de la nutrition soufrée et des outils de pilotage en temps réel de la fertilisation pour les agriculteurs. Ce mémoire de fin d'étude s'inscrit dans le cadre de ce projet.

Le stage consiste, dans un premier temps, à identifier des indicateurs biochimiques permettant de qualifier le niveau de nutrition soufrée du blé tendre d'hiver ; il s'agit de l'étape préalable à la mise en place d'un Outil d'Aide à la Décision (OAD). L'objectif, dans un second temps, sera de tester et évaluer sur la même espèce, la biostimulation de l'absorption et de l'assimilation du soufre par des extraits d'algues.

Ce manuscrit s'articule autour de trois grandes parties. Une partie bibliographique, qui fait état des connaissances actuelles notamment sur l'utilisation du soufre par les plantes, permet de préciser les objectifs de recherche. Une autre partie présente les méthodologies expérimentales et les résultats de l'étude, suivie d'une discussion générale, des conclusions et des perspectives de recherche issues de ce travail.



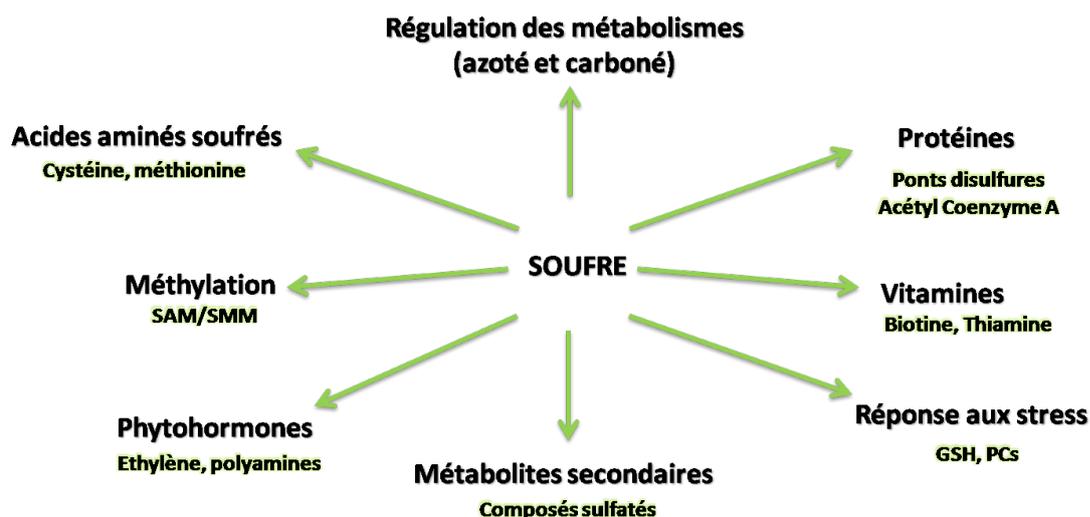


Figure 4 : Rôle du soufre dans le métabolisme des végétaux (adapté d'après Hesse and Hoefgen, 2003 et Dubousset, 2009). GSH : Glutathion sous forme réduite ; PCs : Phytochélatines ; SAM : S- adénosylméthionine ; SMM : S-méthylmethionine.

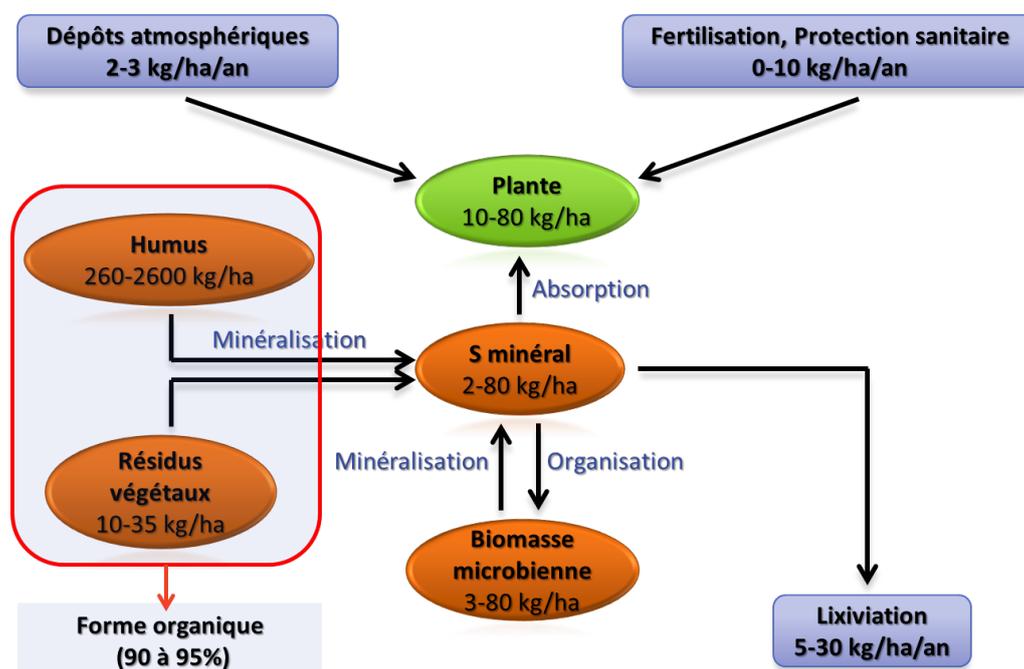


Figure 5 : Modèle simplifié du cycle du soufre dans le système sol-plante-atmosphère. Les données indiquent les ordres de grandeurs pour les compartiments sol-plante-atmosphère et flux annuels entrant et sortant (Machet *et al.*, 2009; Blake-Kalff *et al.*, 2001)



II - Etude bibliographique

A. Le Soufre, élément indispensable pour les cultures

Le soufre (S) est un macroélément essentiel à la croissance des végétaux (Leustek *et al.*, 2000). En effet, il rentre dans la composition de nombreuses molécules végétales au premier rang desquelles on trouve les acides aminés et les protéines, mais aussi certains composés secondaires (Figure 4). D'un point de vue agronomique, le soufre est un macroélément essentiel à la croissance des végétaux, et sa concentration bien qu'assez variable dans la plante, est proche de celle du phosphore. On considère désormais que le soufre est le quatrième élément le plus important, après le tryptique NPK. Certaines cultures présentent des besoins élevés en soufre comme le colza et les crucifères plus généralement (le chou-fleur par exemple), avec des besoins supérieurs à 100 kg SO_3^- /ha. D'autres cultures comme les céréales à paille, le maïs, la pomme de terre, les betteraves, la tomate ou encore les cultures fourragères ont des besoins moindres mais non négligeables, entre 50 et 100 kg/ha de soufre. D'un point de vue physiologique, le soufre est nécessaire à la croissance des plantes. C'est un constituant important de 2 acides aminés essentiels (méthionine, cystéine) et de ce fait, il est indispensable (tout comme l'azote) à la synthèse des protéines et notamment à la formation de la chlorophylle dans les feuilles (Figure 4). Ainsi une bonne alimentation soufrée permet à la plante de mieux valoriser l'azote. Le soufre joue aussi un rôle essentiel dans le métabolisme des vitamines, de plus il entre dans la composition de nombreuses molécules contrôlant la tolérance des plantes aux stress environnementaux (Figure 4). Le soufre est également essentiel pour la formation et le fonctionnement des nodules dans les racines des légumineuses.

B. Acquisition et devenir du Soufre dans la plante

B-1. Origine du Soufre dans l'environnement

Les parcelles agricoles bénéficient de quatre entrées majeures de soufre : la dégradation de la roche mère, les dépôts atmosphériques, la décomposition de la matière organique et les apports effectués par l'agriculteur (produit fongique, irrigation et fertilisation soufrée ; Figure 5). Les dépôts atmosphériques sont issus, entre autres, des éruptions volcaniques et de l'utilisation de combustibles fossiles par les industries. Ils se font sous forme de dihydrogène (H_2S) pouvant s'oxyder dans l'atmosphère pour former du dioxygène de soufre (SO_2) adsorbé par le sol et la végétation. Or depuis les années 80, la réglementation mise en place pour réduire cette pollution a permis une diminution de plus de 80% des émissions atmosphériques et donc des retombées sur les sols agricoles (Figure 1). Cette dépollution a conduit à un appauvrissement des sols en soufre (Figure 2).

Par ailleurs, dans le sol, 95 % du soufre total est présent sous forme organique (Figure 5) non assimilable par la plante et la détermination du stock de soufre organique potentiellement minéralisable reste délicate et récente (Niknahad-Gharmakher *et al.*, 2009). Ceci explique l'utilisation de fertilisants soufrés dans le but de garantir un apport suffisant lors des périodes



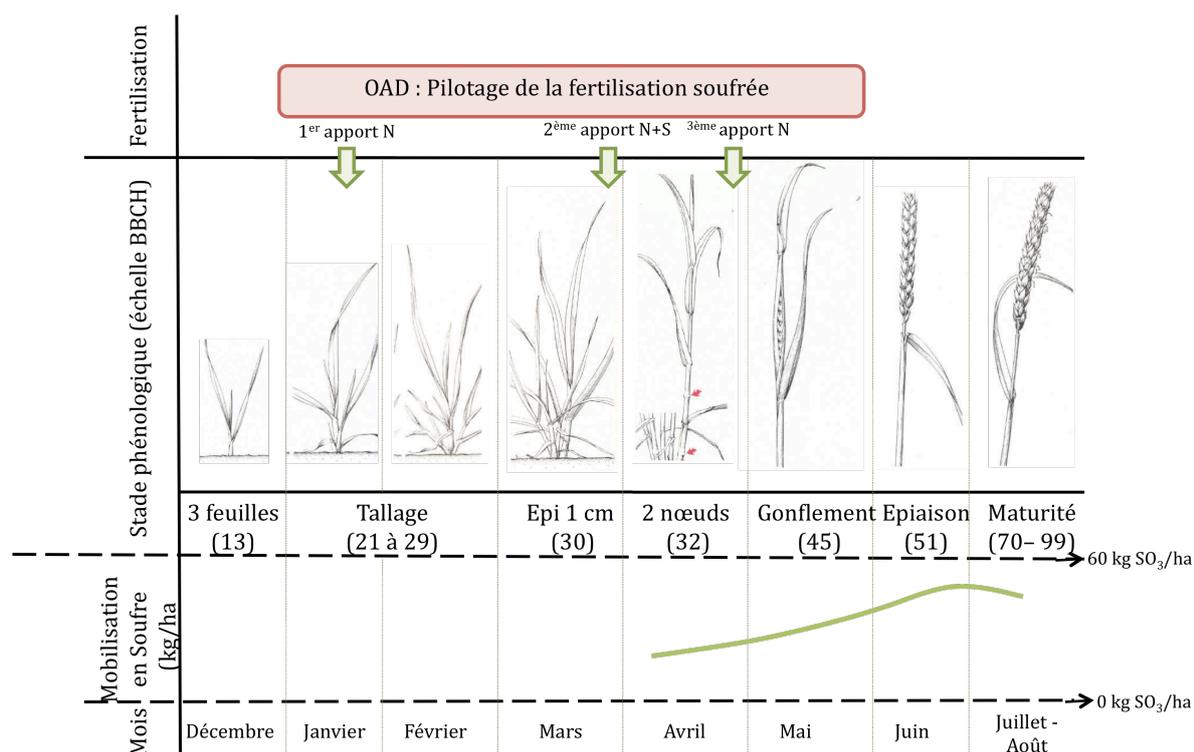


Figure 6 : Stades phénologiques, mobilisation du soufre et gestion de la fertilisation azotée et soufrée tout au long du cycle de développement du blé tendre d'hiver (d'après le Comifer, la SADEF et Arvalis). La courbe de mobilisation du soufre par le blé (kg de soufre par hectare de blé) est comprise entre 0 et 60 kg SO_3^{2-} .

Tableau 1 : Grille de décision d'un apport de soufre sur céréales d'hiver et de printemps dans les situations sans apports réguliers de fumier depuis 20 ans (Source : Arvalis)

Types de sol	Pluviométrie (mm) du 1/10 au 1/03	Apports nécessaires (kg $\text{SO}_3^{2-} \cdot \text{ha}^{-1}$)	
		Si apports >60 kg $\text{SO}_3^{2-} \cdot \text{ha}^{-1}$ sur le précédent cultural	Si aucun apport de soufre sur le précédent cultural
Risques élevés de lessivage : Sols superficiels filtrants	>250	40	50
	< 250	20	30
Risques moyens de lessivage : Sols type argilo calcaires moyennement profonds	> 400	30	40
	300 à 400	20	30
	< 300	0	20
Risques faibles de lessivage : sols profonds sains, type limono argileux	> 400	20	30
	300 à 400	0	20
	< 300	0	0



clés de la croissance. Pour une culture de blé, cette période se situe entre le stade deux nœuds et le stade épiaison, d'où l'importance de maîtriser la fertilisation soufrée à ces stades (Figure 6).

B-2. La fertilisation soufrée des cultures

Les pratiques agricoles de fertilisation ont changé et les fertilisants contenant du soufre sont moins utilisés (Unifa, 2010). Cependant, il est conseillé d'apporter du soufre, en prenant compte de la nature du sol, de la pluviométrie et du précédent cultural de la parcelle (Tableau 1). En effet, le soufre apporté dans un sol filtrant et superficiel sera plus lixivié et la minéralisation plus faible, d'où la nécessité d'effectuer des apports de fertilisants soufrés. De même pour une région à forte pluviométrie hivernale, le risque de lixiviation est également important. Enfin, certains précédents culturaux, ayant reçus un apport en soufre conséquent (>60 kg/ha), laissent un reliquat plus ou moins important selon le type de sol, diminuant ainsi la quantité de soufre à apporter pour les prochaines cultures (Tableau 1). Les céréales de printemps sont généralement moins exigeantes en soufre par rapport aux céréales d'hiver, dont les besoins sont plus élevés. L'apport de cet élément se fait généralement au deuxième passage de la fertilisation azotée, c'est-à-dire après le stade épis 1 cm. (Figure 6). L'interaction N-S existe et l'application de soufre permet d'améliorer l'EUA. Cependant, un apport mal maîtrisé d'un des deux éléments peut induire un antagonisme puis une déficience qui auront un impact négatif sur les rendements (Fismes *et al.*, 2000), d'où la nécessité également de piloter en concert les deux types de fertilisation.

B-3. Absorption et assimilation du soufre par la plante

Une fois le soufre apporté sur la parcelle et réduit sous forme disponible pour la culture, celui-ci doit être transporté de la solution du sol jusqu'au site d'assimilation du sulfate : les chloroplastes. Les plantes peuvent également absorber le soufre présent dans l'atmosphère mais cette voie reste accessoire.

Le sulfate (SO_4^{2-}), est moins concentré dans le sol que dans le cytosol et le potentiel électrique négatif du cytosol repousse les sulfates spontanément (Morot-Gaudry *et al.*, 2012). Ainsi, le transport du sulfate est un transport actif de type symport, consommateur d'énergie. (Leustek and Saito 1999). Chez le blé, le riz et le colza, 5 groupes spécifiques de transporteurs de sulfate ont été caractérisés (Buschner *et al.*, 2010).

Le groupe 1 comprend des transporteurs à haute affinité exprimés majoritairement dans les racines. Ils jouent un rôle dans l'absorption du sulfate au niveau des racines et dans le chargement phloémique du sulfate (Yoshimoto *et al.*, 2002). Chez le blé deux gènes de ce groupe ont été identifiés, ce sont les transporteurs SULTR1;1 et SULTR1;3 (Buchner *et al.*, 2010).

Le sulfate ainsi absorbé est soit stocké dans les vacuoles soit transporté dans la plante via le xylème. Le groupe 2 code pour des transporteurs à faible affinité situés au niveau des vaisseaux conducteurs de sève xylémique et phloémique des racines. Le sulfate absorbé est donc transporté sur une longue distance dans la plante. Chez le blé un seul gène a été identifié : SULTR 2;1 (Buchner *et al.*, 2010).





Figure 7 : Assimilation du soufre par la voie non réductrice (APS : l'Adénosine 5'-phosphosulfate ; PAPS : 3'-phospho-5'-adénylylsufate). D'après Lewandowska and Sirko (2008) et Leustek *et al.* (2000)

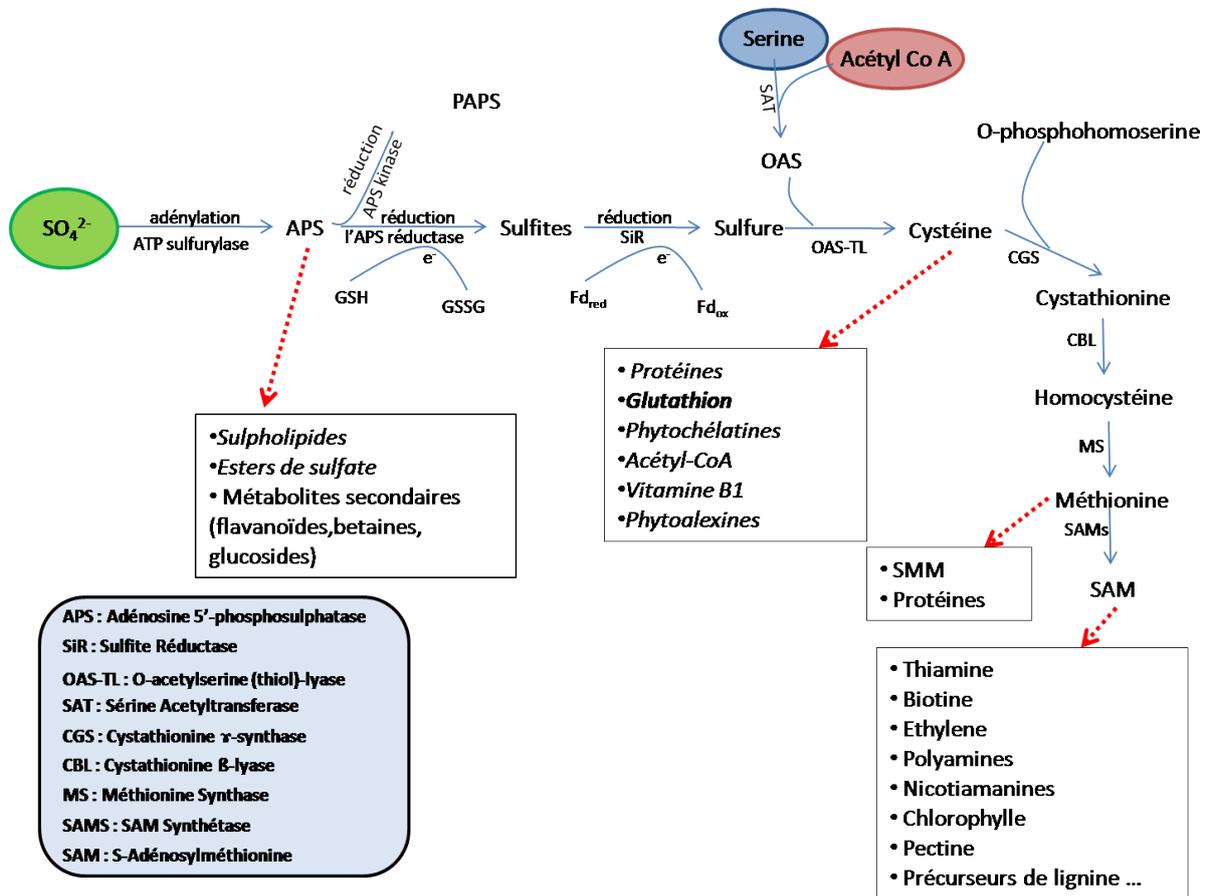


Figure 8 : Assimilation du soufre par la voie réductrice d'après Lewandowska and Sirko (2008) et Leustek *et al.* (2000). Les cercles verts, rouges et bleus représentent respectivement les sources de soufre, de carbone et d'azote ; ainsi l'OAS se situe au carrefour du métabolisme de ces trois éléments. Les flèches rouges en pointillées indiquent l'ensemble des éléments issus des produits de l'assimilation du sulfate



Le groupe 3 n'a pas encore révélé son rôle dans le transport de sulfate tandis que le groupe 4, dont SULTR4;1 a été identifié chez le blé, serait responsable de l'efflux vacuolaire du sulfate (Kataoka *et al.*, 2004). Enfin, le groupe 5 tient un rôle cellulaire qui n'est pas encore bien caractérisé mais jouerait un rôle dans l'influx vacuolaire de sulfate (Hawkesford *et al.*, 2003).

Une fois transporté, le sulfate peut être stocké dans la vacuole ou assimilé par la plante. Ce processus d'assimilation peut se faire de deux manières différentes : par la voie réductrice ou non réductrice.

Par la voie non réductrice, le sulfate est transformé par adénylation pour donner l'Adénosine 5'-phosphosulfate (APS) qui est ensuite réduite par l'enzyme APS kinase pour donner la 3'-phospho-5'-adénylsulfate (PAPS). La PAPS est transformée par sulfotransférase et peut alors être utilisée dans la synthèse de métabolites soufrés. La figure 7 résume cette voie d'assimilation.

La voie réductrice, résumée dans la figure 8, se déroule dans le chloroplaste et parfois au niveau des mitochondries (pour la formation de la cystéine et du glutathion). Les deux premières étapes sont les mêmes que celles de la voie non réductrice. L'enzyme APS réductase catalyse la réduction des sulfites par un don d'électron de la part du glutathion. Ces sulfites sont ensuite réduits, en présence de ferrédoxine (Fd), par l'enzyme sulfite réductase (SiR) pour donner soit des sulfolipides soit du soufre. Ce dernier sera ensuite intégré à l'O-acétylsérine (OAS) par l'O-acétylsérine-thiol-lyase (OAS-TL) pour former la cystéine. L'OAS est un élément synthétisé à partir de sérine, issue du métabolisme azoté, et d'acétyl CoA, issu du métabolisme carboné. Ainsi, la cystéine représente le carrefour des métabolismes N, C et S (Figure 8). La cystéine peut ensuite être transformée par la glutamylcystéine synthétase puis par l'enzyme glutathion synthétase pour former le glutathion à partir de glycine et glutamate.

La cystéine est aussi précurseur de la biosynthèse d'un autre acide aminé, la méthionine qui s'intègre dans les protéines ou dans la synthèse de la S-Adenosyl methionine (SAM).

C. Caractérisation d'une carence en soufre

Lors d'une carence en soufre, les processus de transport et d'assimilation du soufre présentés précédemment ne sont pas les seuls à être fortement perturbés. Les métabolismes azoté et carboné connaissent également d'importantes modifications, ce qui engendre des conséquences d'autant plus sévères d'un point de vue agronomique.

C-1. Réponses physiologiques et mécanismes de régulation

i. Au niveau agronomique

Lors d'une carence en soufre le rendement grainier et la qualité des grains sont fortement affectés. Il existe, en effet, une forte relation entre la durée de la carence et les différentes composantes du rendement. Chez un blé carencé en soufre, il a été observé une diminution



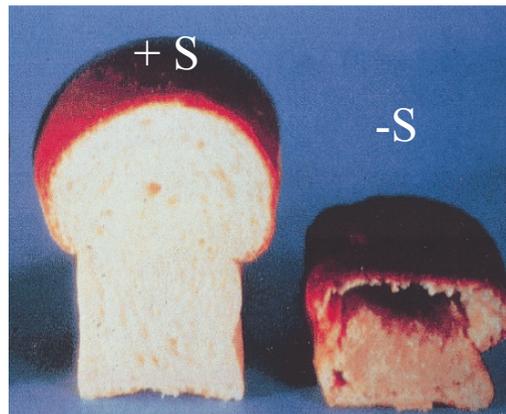


Figure 9: Influence d'un apport soufré sur la qualité du pain chez le blé de printemps (*Triticum aestivum L.*, Byers *et al.*, 1987)

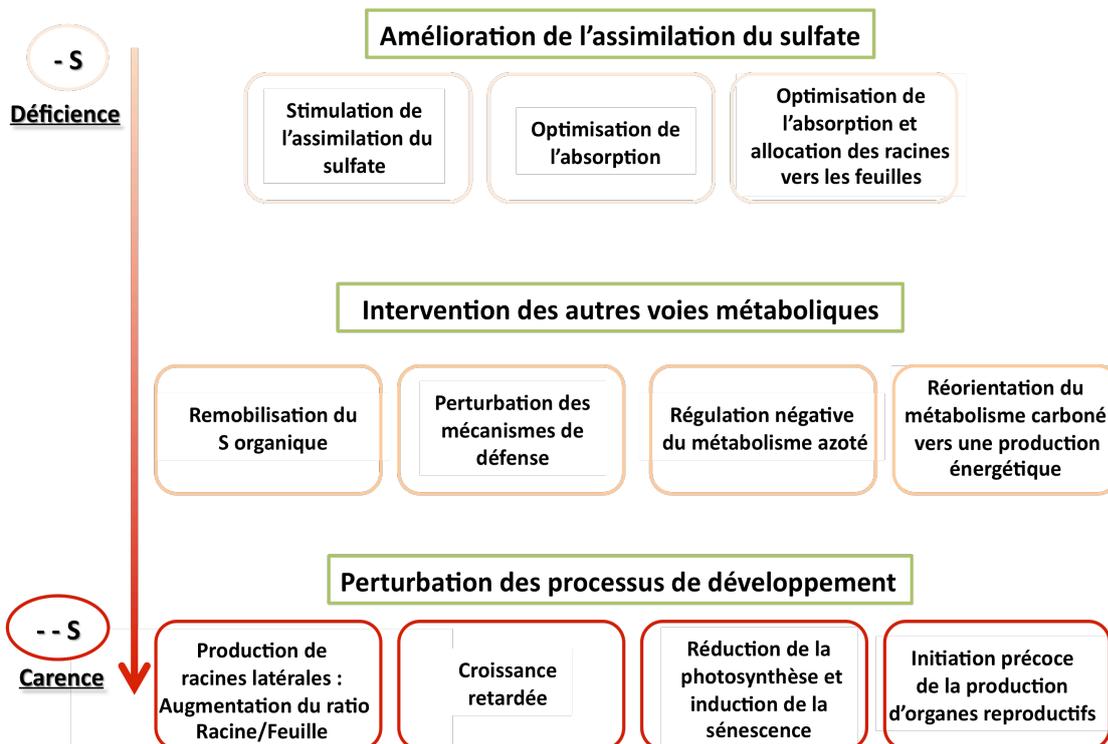


Figure 10: Modèle de hiérarchisation des modifications physiologiques intervenant au sein d'une plante au cours d'une carence en soufre (Hawkesford and De Kok, 2006 ; Nikiforova and Hoefgen, 2008 ; Honsel *et al.*, 2012 ; Lewandoswka and Sirko, 2008)



notable du poids des grains, du nombre d'épis, du nombre de grains par épis, et de manière plus générale du rendement grainier et fourrager (Haneklaus *et al.*, 1995 ; Hawkesford and De Kok, 2007).

Une carence en soufre entraîne également une réduction des défenses naturelles de la plante face aux stress abiotiques et biotiques (Lewandowska and Sirko, 2008 ; Leustek *et al.*, 2000), impactant ainsi le rendement des cultures en situation de stress (Heidari *et al.*, 2011).

La qualité de la graine peut être également altérée par une carence en soufre. Celle-ci dépend des quantités de cystéines et méthionines, acides aminés participant à la formation des ponts disulfures de la fraction gluténique des protéines, améliorant ainsi les paramètres W (force), G (gonflement) et L (extensibilité) de la farine (Zhao *et al.*, 1999 ; Figure 9).

ii. Au niveau physiologique

Suite à une faible disponibilité en S, la perception d'une carence fait intervenir une cascade de réactions au sein de la plante aboutissant à de nombreuses réponses physiologiques. Ces réponses peuvent être hiérarchisées en trois niveaux tels que présentés dans la figure 10.

Un premier niveau de réponses concerne la voie d'acquisition du sulfate et son allocation. En réponse à une limitation, les capacités d'absorption et d'assimilation du sulfate sont plus importantes (Parmar *et al.*, 2007 ; Koralewska *et al.*, 2008). Le transport phloémique du sulfate des racines vers les parties aériennes augmente également, tout comme la remobilisation du sulfate stocké dans les vacuoles (Hoefgen and Nikiforova, 2008 ; Lewandowska and Sirko, 2008, Hawkesford *et al.*, 2003).

Le deuxième niveau de réponse fait intervenir des processus de remobilisation des ressources organiques de soufre. Il entraîne également une perturbation des mécanismes de défenses qui fragilise la plante face au stress oxydatif et à l'exposition de métaux lourds. A ce stade, le métabolisme azoté commence à être affecté (Hawkesford and De Kok, 2007 ; Kopriva and Rennenberg, 2004). Enfin, la synthèse d'auxine entraîne une augmentation du ratio biomasse racinaires/ biomasse des parties aériennes, ainsi que, dans certaines études, une production de racines latérales (Carfagna *et al.*, 2011).

Le troisième et dernier niveau de réponse à une carence en soufre se manifeste au niveau physiologique par une diminution de l'activité photosynthétique de la plante associée à une réduction dans la synthèse de lipides et de SAM. La synthèse des phytohormones, auxine et acide abscissique (ABA), est également affectée contribuant à un retard de croissance de la plante (cf. chapitre « Perturbations hormonales »). Enfin, des phénomènes de sénescence apparaissent, la plante cible alors son métabolisme vers la production d'organes reproducteurs (Hawkesford and De Kok, 2007 ; Hoefgen and Nikiforova, 2008).



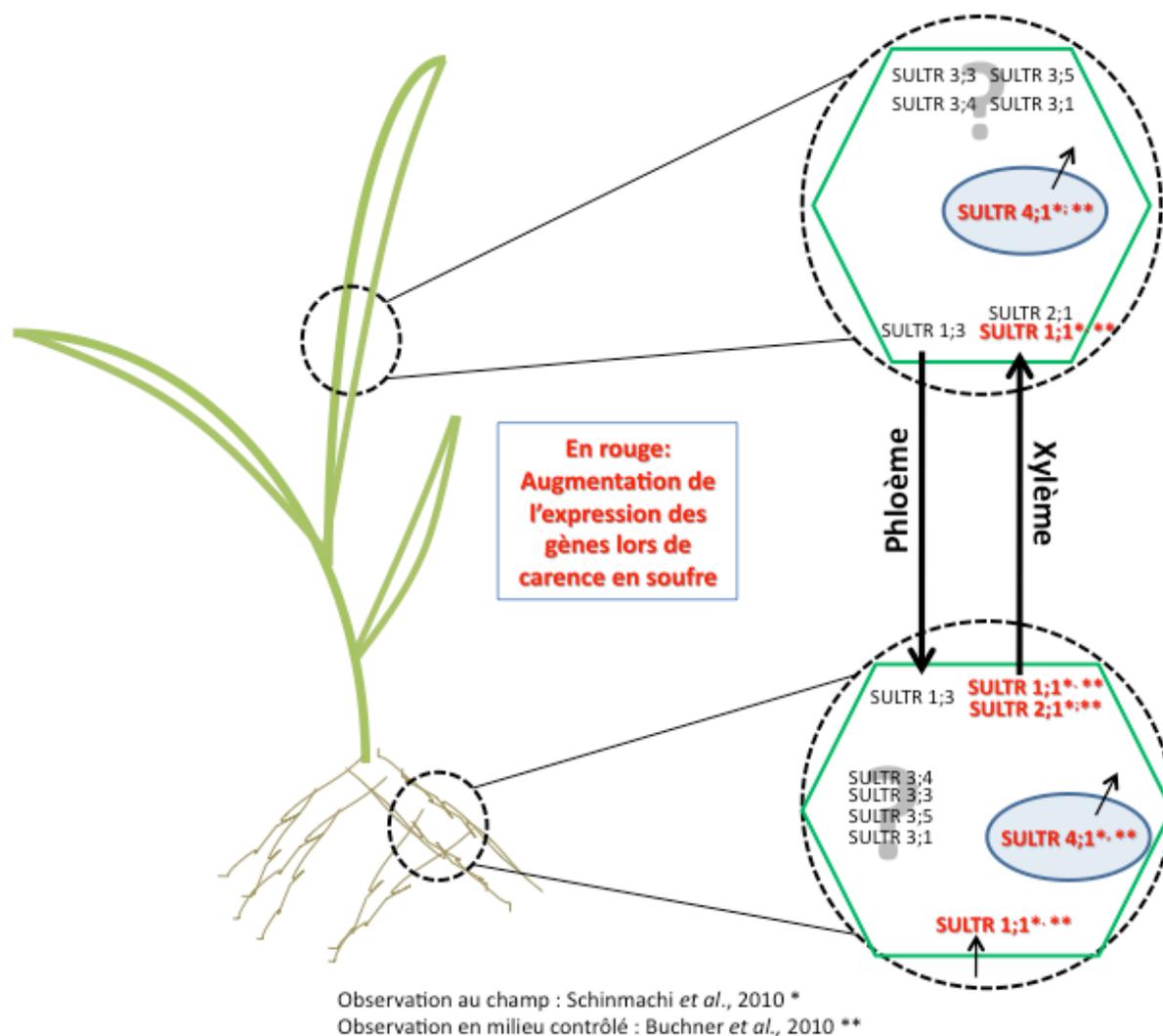


Figure 11 : Schéma récapitulatif des modifications transcriptomiques des transporteurs de sulfate sur blé lors d'une carence en soufre en plein champ (Schinmachi *et al.*, 2010) et en milieu contrôlé (Buchner *et al.*, 2010)



Dès l'application d'une carence en soufre, les capacités d'absorption en sulfate de la plante augmentent. En effet, le transporteur SULTR1;1, intervenant dans l'acquisition du sulfate au niveau racinaire, est fortement induit (Honsel *et al.*, 2012 ; Parmar *et al.*, 2007 ; Koralewska *et al.*, 2008 ; Figure 11). L'expression du gène SULTR4;1, intervenant dans l'efflux vacuolaire des ions sulfates, augmente également (Figure 11). Le sulfate, alors stocké dans les vacuoles, est remobilisé pour son assimilation (Kataoka *et al.*, 2004 ; Shinmachi *et al.*, 2010 ; Honsel *et al.*, 2012). Enfin, le transporteur du groupe 2 (SULTR2;1) est également induit lors d'une limitation en soufre afin d'optimiser le transfert du soufre vers les organes puits (Figure 11). Ces organes, tels que les graines ou encore les racines, présentent dans ces conditions une forte croissance et une forte capacité de rétention des ions sulfates (Honsel *et al.*, 2012 ; Buchner *et al.*, 2010 ; Lopez-Bucio *et al.*, 2003, Shinmachi *et al.*, 2010).

Les teneurs en protéines de la plante, telles que la RuBisCo, contenant 120 cystéines et 168 méthionines, diminuent lors d'une carence en soufre. Ces protéines sont alors dégradées dans la plante afin de remobiliser ce soufre organique pour d'autres processus métaboliques (Ahmad and Abdin, 2000 ; Carfagna *et al.*, 2011).

Les concentrations en glutathion diminuent également lors d'une carence (Carfagna *et al.*, 2011). Or, ces thiols répriment l'expression de gènes impliqués dans l'assimilation du soufre tels que l'APR (Koralewska *et al.*, 2009), ATPS, SAT et OAS-TL (Figure 8 ; Koprivova *et al.*, 2000). Ainsi, lors d'une carence en S, il y aurait une dé-repression de ces gènes, augmentant les capacités d'assimilation du soufre de la plante (Koralewska *et al.*, 2009).

Concernant la cystéine, reconnue également dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'assimilation du soufre, la littérature rapporte des résultats souvent contrastés quant à sa régulation en conditions de soufre limitantes (Zhao *et al.*, 1996 ; Carfagna *et al.*, 2011 ; Hoefgen and Nikiforova, 2008).

iii. Perturbations hormonales

Dans les premières étapes de réponses à un déficit en soufre, le niveau de sérine augmente dans la plante. Chez *Arabidopsis thaliana*, cette augmentation est suivie d'une augmentation des teneurs en tryptophane, impliqué dans la synthèse d'auxine. Cette dernière intervient alors dans la modification de l'architecture racinaire (Nikiforova *et al.*, 2003). Un rétrocontrôle *via* la calmoduline se produit par la suite, provoquant un arrêt du développement de racines latérales à un stade de carence avancé (Hoefgen and Nikiforova, 2008 ; Nikiforova *et al.*, 2003).

Les cytokinines tiennent un rôle dans la régulation des gènes codant pour l'absorption et l'assimilation du soufre. Lors d'une carence en soufre, les formes actives de cytokinines (zéatines) diminuent ; cela entraîne une dé-repression des gènes codants pour les transporteurs racinaires du groupe 1 et donc une augmentation de l'absorption du sulfate par la plante (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004 ; Honsel *et al.*, 2012). Les cytokinines, qui sont également très liées au statut azoté de la plante joueraient des rôles complexes dans la coordination de



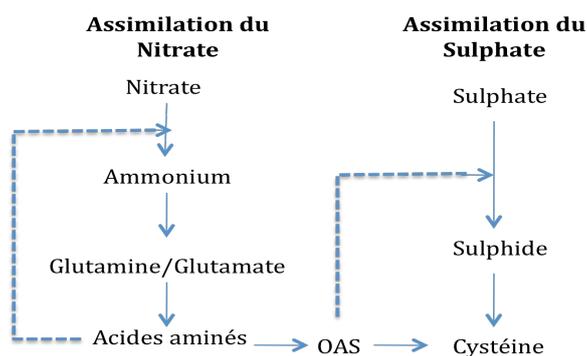


Figure 12 : Connexion entre l'assimilation du soufre et de l'azote *via* l'O-acétylserine. Les flèches pleines représentent les flux métaboliques et les flèches pointillées les probables rétrocontrôles (Hesse *et al.*, 2004)

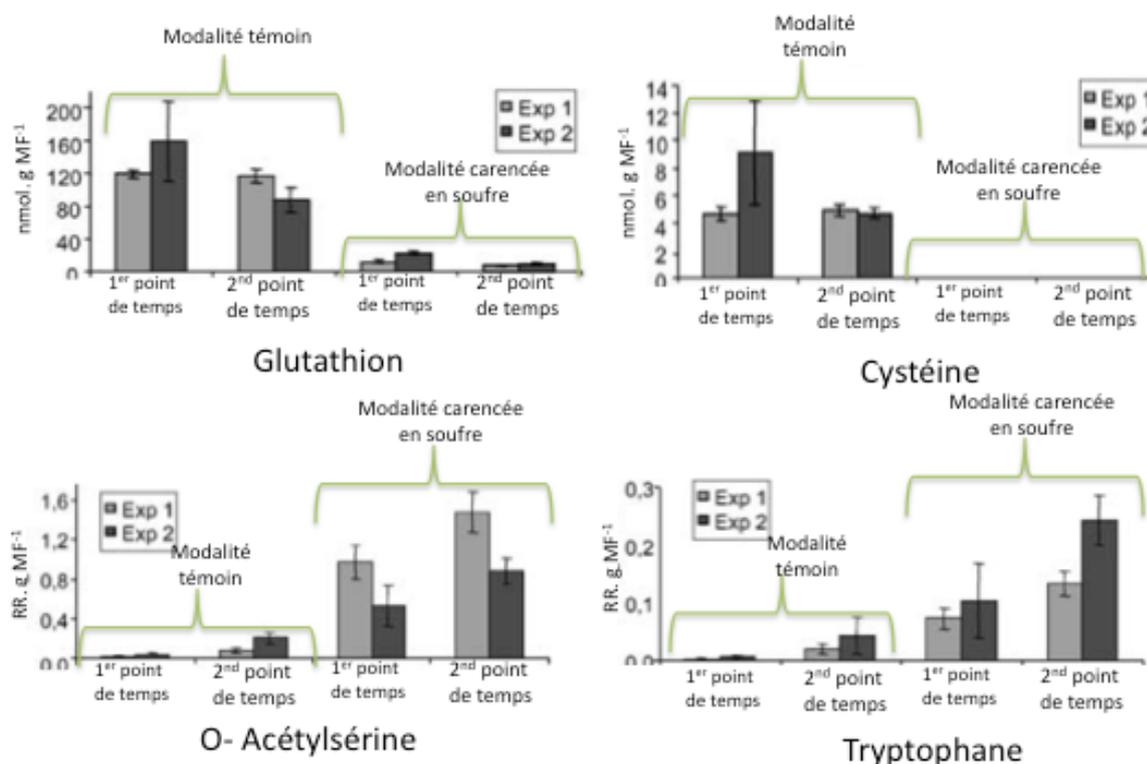


Figure 13 : Teneurs en métabolites liées au métabolisme soufré et azoté chez *Arabidopsis thaliana* au stade plantule en absence et en présence de soufre (Nikiforova *et al.*, 2003).

Exp 1 : application de la carence 8 jours après la germination ; Exp 2 : application de la carence dès la germination. Premier point de temps : pas de symptôme visible de carence ; 2^{ème} point de temps : premiers symptômes visible de carence



Quant à l'acide abscissique (ABA), il est reconnu pour augmenter le niveau de glutathion dans la plante (Barroso *et al.*, 1999), contrôlant ainsi leur état redox, notamment lors d'un stress (Rubio *et al.*, 2009). Honsel *et al.*, (2012) rapportent chez le peuplier, une diminution des teneurs en ABA dans les feuilles de plantes carencées en soufre. Cette réponse à une carence serait donc liée à une adaptation de la plante à cette situation de déficience plutôt qu'à un stress.

C-2. Interactions avec le métabolisme carboné et azoté

Comme il a été précisé précédemment, les interactions entre le métabolisme soufré, azoté et carboné, sont multiples. Ainsi, une carence en soufre perturbe fortement ces interactions et entraîne plusieurs modifications métaboliques à l'échelle de la plante.

Métabolisme carboné

En premier lieu, la fermeture stomatique observée en réponse à une carence en S, limite l'assimilation de CO₂ (Ahmad and Abdin, 2000). Ceci est suivi par une baisse des teneurs en chlorophylle et des protéines soufrées telles que la RuBisCo. De plus, la carence en S induit une réorientation du métabolisme C vers une production d'énergie (*via* l'inhibition de la synthèse de saccharose et d'amidon, l'induction de la glycolyse et de certaines réactions du cycle de Krebs). Selon Hoefgen and Nikiforova (2008), cette réorientation du métabolisme C permettrait à la plante de survivre et éventuellement de produire des graines.

Métabolisme azoté

Plusieurs études ont mis en évidence des interactions entre l'assimilation réductrice du sulfate (SO₄²⁻) et celle du nitrate (NO₃⁻, Koprivova *et al.* 2000 ; Prosser *et al.* 2001, Figure 12). Une carence en S provoque une inhibition de l'absorption du NO₃⁻ et une répression de l'activité nitrate réductase (NR), enzyme clé de l'assimilation de l'azote minéral. Cette inhibition entraîne une accumulation de nitrate (Kopriva and Rennenberg 2004 ; Prosser *et al.* 2001). Elle induit également une diminution de la disponibilité en acides aminés soufrés nécessaires à la synthèse des protéines ainsi qu'une accumulation d'autres acides aminés. Les profils métaboliques couplés à des approches transcriptomiques d'une carence en S chez *Arabidopsis* montrent en effet des diminutions de pools d'acides aminés tels que la cystéine, la proline, l'arginine et la méthionine accompagnée d'une accumulation d'autres acides aminés tels que le tryptophane, la sérine, la glutamine, l'asparagine, la glycine, la thréonine, ou encore l'isoleucine (Nikiforova *et al.*, 2003, Figure 13). La cystéine, produit final de l'assimilation réductrice du sulfate constitue le carrefour entre les métabolismes S et N (Figure 12). Sa diminution engendre une baisse de synthèse de nombreux métabolites impliqués dans la résistance aux attaques pathogènes comme par exemple le glutathion. L'O-acétylsérine (OAS), issue de la voie d'assimilation du nitrate est un précurseur nécessaire à la synthèse de la cystéine (Figure 12). Cette molécule est particulièrement accumulée en réponse à une carence en S (Kopriva & Rennenberg 2004, Nikiforova *et al.*, 2003) et régule positivement l'expression de l'APS réductase, l'ATPS et des transporteurs de SO₄²⁻ (Kopriva and Rennenberg, 2004 ; Honsel *et al.*, 2012, cf. Figure 8).





D. Diagnostic de carence soufrée et les Outils d'Aide à la Décision

Un indicateur de nutrition est utilisé dans le but de déceler un seuil critique de concentration en nutriment entraînant une diminution de rendement, de croissance ou de qualité (Rasmussen *et al.*, 1977). Dans cette étude, nous nous intéressons uniquement aux indicateurs biochimiques de carence en soufre.

Les qualités techniques d'un indicateur de nutrition sont :

- La Répétabilité : l'outil doit présenter les mêmes résultats sous des conditions identiques.
- La Spécificité : un indicateur de carence doit déceler spécifiquement la carence. Il ne doit pas être influencé par d'autres facteurs tels que des carences autres que soufrées ou des stress biotiques comme abiotiques (stress hydrique, attaque de pathogènes etc.).
- La Sensibilité : un outil sensible permettra une détection précoce de la carence et permettra à l'agriculteur de corriger sa fertilisation à temps.
- La Robustesse et la reproductibilité : l'indicateur peut être utilisé sur une large gamme de conditions, il demeure fiable quelque soit la variété ou le cultivar utilisés et quelque soit les conditions pédo-climatiques de la parcelle.
- L'Ergonomie et Convivialité: un outil doit être simple à utiliser pour éviter le biais provoqué par l'échantillonneur, le nombre de paramètres d'entrées à renseigner doivent être suffisants pour permettre une robustesse de l'outil mais ne doivent pas être trop fastidieux à renseigner.

Différents types d'indicateurs ont été proposés. Cependant, tous ne regroupent pas l'ensemble des qualités techniques décrites précédemment :

- Les indicateurs macroscopiques

Le principal symptôme visible d'une carence en soufre est l'apparition de chloroses sur les jeunes feuilles. La mesure des teneurs en chlorophylle se fait par des techniques de réflectance rapides et non destructives, elles révèlent facilement un déficit en nutriment. L'outil GPN@soufre, diffusé depuis 2007 par la société Grande Paroisse et CEREXAGRI, utilise des images prises à quelques centimètres du couvert végétal à partir du stade 2^{ème} nœud pour déceler une carence en soufre sur blé. Cependant, avec de tels outils il est difficile de déterminer quel élément nutritif est déficient (Ayala-Silva and Beyl, 2005), la réflectance des feuilles carencées en soufre étant analogue à celles d'autres déficits, notamment azoté.



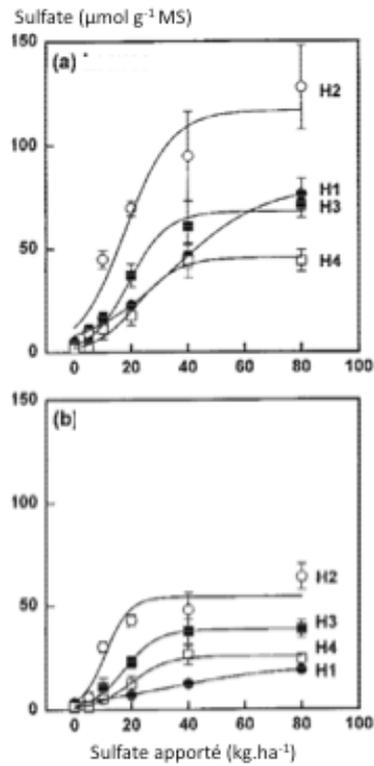


Figure 14 : Teneur en sulfate de feuilles (a) et tiges (b) chez le blé, (Blake-Kalff *et al.*, 2000). H1, H2, H3 et H4 représentent des stades croissants de récolte

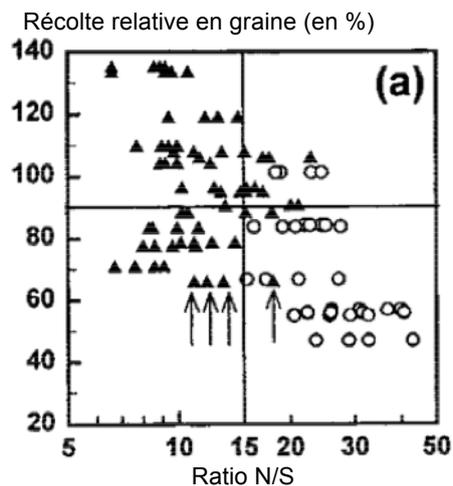


Figure 15 : Ratio N/S sur feuilles de blé en phase de tallage (Blake-Kalff *et al.*, 2000). La ligne horizontale représente 90 % du rendement grainier maximum et la ligne verticale le valeur critique de N/S. (▲ : fertilisation soufrée > 10 kg S·ha⁻¹ ; ○ : fertilisation soufrée < 10 kg S·ha⁻¹)



Les teneurs en soufre total, sulfate et glutathion

La concentration en soufre total dans la plante est un indicateur peu fiable car les variations annuelles observées sur une même modalité sont trop importantes (Rasmussen *et al.*, 1977).

En effet, les teneurs en soufre total dépendent du stade de développement de la plante et sont principalement dues aux variations endogènes du sulfate (Blake-Kalff *et al.*, 2002). L'estimation de la carence est donc difficile à moins d'analyser les tissus à un stade de développement précis (Zhao *et al.*, 1996).

Le sulfate se révèle donc être un meilleur indice de carence, ses concentrations indiquent très clairement une réduction du soufre dès les débuts de la carence (Honsel *et al.*, 2012). L'outil Nutricheck®, développé par Challenge Agriculture, mesure ainsi la teneur en sulfate du jus de base de tige de blé au stade 2^{ème} nœud. Cependant, comme le S total, les teneurs en sulfates changent au cours de la croissance (Figure 14) et cet indicateur reste tardif pour rattraper une fertilisation (Arvalis, 2013).

Le glutathion, de même que le sulfate, répond rapidement à une carence en soufre mais varie selon le stade de développement de la plante (Honsel *et al.*, 2012, Zhao *et al.*, 1996) s'avérant être alors un indicateur peu fiable (Blake-Kalff *et al.*, 2000).

Les ratios N/S et $\text{SO}_4^{2-}/\text{NO}_3^-$

Le ratio N/S est très utilisé pour la caractérisation d'une déficience en soufre (Figure 15). Ce ratio se base sur les interactions qui existent entre les métabolismes soufrés et azotés, il présente alors des valeurs plus stables au cours du développement de la plante (Scherer, 2001 ; Rasmussen *et al.*, 1977, Figure 15). Cependant, ce ratio doit être interprété avec prudence car il peut être modifié suite à une variation de l'azote total uniquement et sans modification des teneurs en soufre total (Blake-Kalff *et al.*, 2000).

D'autre part, il est important de travailler sur un type d'organe et un stade de développement uniquement car l'azote et le soufre ne suivent pas les mêmes dynamiques au cours du développement. Des changements de ratio peuvent alors mener à des erreurs d'interprétations (Scherer, 2001).

Un déficit en soufre entraîne une accumulation de nitrate vacuolaire et une diminution de sulfate. Ainsi le ratio $\text{SO}_4^{2-}/\text{NO}_3^-$ pourrait être un bon indicateur de nutrition soufrée. Il reste néanmoins intéressant d'analyser le ratio N/S pour connaître la part assimilée de SO_4^{2-} et NO_3^- (Sarda *et al.*, 2013).

Le ratio sulfate / soufre total

Le ratio sulfate / soufre total est un indice très critiqué. En effet, la variation du soufre total étant en partie due aux teneurs en sulfate, le numérateur du ratio (sulfate) dépend du dénominateur (soufre total), ce qui diminue la sensibilité de l'indicateur (Zhao *et al.*, 1996).



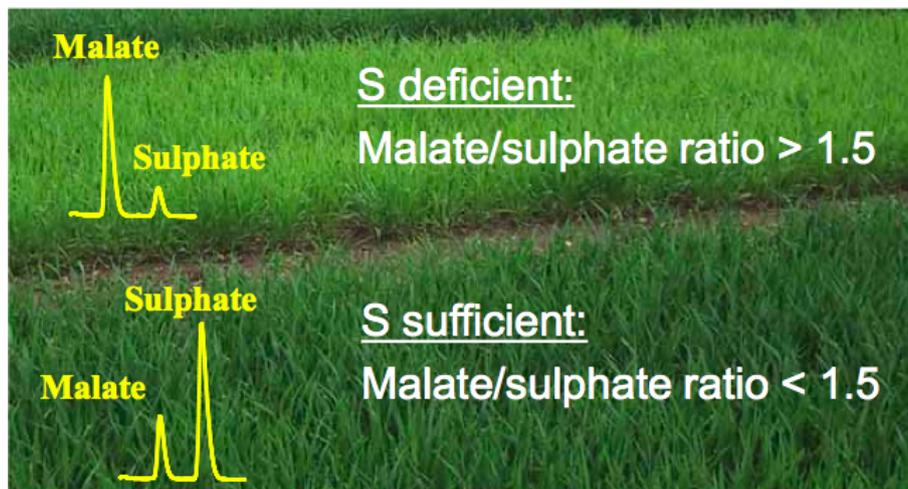


Figure 16 : Ratio malate / sulfate vacuolaire comme indicateur d'une carence en soufre (Blake-Kalff *et al.*, 2002)



Le ratio malate / sulfate vacuolaire

Le sulfate, dont les teneurs diminuent dans la vacuole, serait remplacé par le malate qui agit alors en tant qu'osmoticum (Blake-Kalff *et al.*, 2000). Les concentrations du malate suivent celles du sulfate au cours du développement de la plante. Ainsi, un ratio malate/sulfate montre une forte stabilité tout au long de la culture lorsque l'apport soufré est suffisant (Blake-Kalff *et al.*, 2002). Pour cette fiabilité, un test malate – sulfate a été développé en Angleterre par le laboratoire Hill Farm Court Research (Figure 16). Cet outil permet de faire un diagnostic de la nutrition soufrée dès la fin du tallage.

Les teneurs en amides

Selon Zhao *et al.*, (1996), une accumulation en amides, en particulier l'asparagine, est la réponse la plus rapide de la plante à une restriction en soufre. Cependant ces amides répondent à différent stress, il serait donc intéressant d'évaluer la spécificité de ces indicateurs.

Malgré les limites évoquées, l'analyse des tissus végétaux demeure la plus fiable en comparaison avec les analyses de sol (Blake- Kalff *et al.*, 2002). Cette rétrospective des outils de caractérisation d'une carence en soufre souligne l'importance de travailler sur un type d'organe et un stade de développement pré définis, le plus précoce possible.

Par ailleurs, il y a des marges de progrès à faire afin de mieux piloter la fertilisation soufrée au cours d'un cycle de culture. Ces marges ne concernent d'ailleurs pas uniquement les OAD mais aussi les engrais qui pourraient assurer un meilleur prélèvement des éléments nutritifs et une plus forte assimilation par la plante, notamment *via* l'utilisation de biostimulants.





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

Selon Hawkesford (2000), il existe deux stratégies d'amélioration de l'Efficiace d'Utilisation du Soufre (EUS).

La première consiste en l'amélioration de l'acquisition du soufre par la plante, c'est l'Efficiace du Prélèvement du Soufre (EPS), qui peut être un levier d'amélioration de l'EUS via notamment des méthodes de fertilisation innovantes, qui favoriseraient le développement racinaire pour une meilleure acquisition des nutriments.

La seconde stratégie repose sur l'amélioration de l'utilisation efficace des réserves de soufre déjà présentes dans la plante, c'est l'Efficiace de Remobilisation du Soufre (ERS). Elle fait intervenir la force puit et les phénomènes de sénescence lors du remplissage du grain (Hawkesford, 2000).

Dans cette étude, nous travaillerons principalement sur la biostimulation de l'acquisition et de l'assimilation du soufre chez le blé.

E-1. Le marché des biostimulants

Le secteur des biostimulants est un secteur en pleine émergence et encore mal défini. En effet, la définition même du terme biostimulant demeure encore vague en France et varie d'un pays à l'autre. On définit un biostimulant comme une substance naturelle, autre qu'un fertilisant, qui stimule le métabolisme, et améliore la capacité de nutrition et l'adaptation de la plante à différentes conditions de stress. Ce dernier provoque un impact positif sur la santé de la plante, sa croissance et son rendement (Colativa *et al.*, 2010 ; Spinelli *et al.*, 2010).

Un rapport de l'European Biostimulants Industry Consortium (EBIC) établi en 2011, a évalué l'utilisation de ces produits sur environ 5.5 millions d'hectares en Europe. La hausse des prix des fertilisants ainsi que le renforcement de la politique environnementale favorise le développement de tels produits alternatifs. En effet, le rapport de l'EBIC a estimé, pour les années à venir, une augmentation annuelle du marché européen des biostimulants de 10%.

Cependant, il existe aujourd'hui une multitude de produits (engrais foliaires, microorganismes, argiles, algues ou encore acides humiques) classés comme biostimulants généraux de la plante et qui ne ciblent pas de besoins agronomiques précis. Afin d'attirer de nouveaux consommateurs, il est indispensable de développer de nouveaux produits qui puissent répondre à un ou plusieurs besoins spécifiques des cultures. Des produits qui activent la nutrition en optimisant l'absorption et l'assimilation d'engrais demeurent assez rares compte tenu des investissements nécessaires pour les mettre en place.

E-2. Les propriétés biostimulantes des extraits algaux

i. Les algues utilisées en agriculture

Les algues présentent un fort potentiel en tant que source de molécules actives biostimulantes. Selon leur pigmentation principale, elles sont classifiées en trois catégories : les algues vertes, les algues rouges et les algues brunes. Ces dernières sont les plus utilisées en agriculture, notamment *Ascophyllum nodosum* L. ; *Laminaria spp.* ; *Fucus spp.* ou encore *Sargassum spp.*





Figure 17 : Effet de l'application racinaire d'un extrait d'algue du genre Fucale sur la biomasse racinaire de la vigne. A. Plante témoin non traitée, biomasse racinaire = $17,73 \pm 2,29$. B. Plante traité par l'extrait algal à 0,1% (v/v) une fois par semaine tout au long de la culture pendant 4 mois, biomasse racinaire = $22,38 \pm 3,07$ g (Mugnai *et al.*, 2008)

Tableau 2 : Effets de l'extrait algal *Kappaphycus alvarezii* sur le rendement grainier et sur la remobilisation du soufre et de l'azote vers les graines chez le soja. Les lettres indiquent les différences statistiques pour $P < 0,05$ (Rathore *et al.*, 2009)

Traitement (Dilution en %)	Acquisition dans les grains ($\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$)		Rendement grainier ($\text{q} \cdot \text{ha}^{-1}$)
	Azote	Soufre	
0	79,71 e	4,17 b	13,39 d
2,5	83,20 de	3,89 b	14,80 cd
5	81,91 de	5,82 ab	14,92 cd
7,5	94,45 cd	6,04 ab	16,35 bc
10	104,09 bc	6,85 a	17,18 b
12,5	119,02 a	7,11 a	19,60 a
15	108,33 ab	8,08 a	21,09 a



Les extraits d'algues contiennent des constituants susceptibles de stimuler la plante, tels que des éléments nutritifs majeurs et mineurs, acides aminés, vitamines et substances d'induction de la croissance semblables aux cytokinines, auxines, et acides absissiques.

Pour qu'une application d'extrait d'algue soit efficace sur la biostimulation des cultures, il est nécessaire de tenir compte de sa concentration. En effet, les effets d'un apport à faible concentration sur la croissance et le rendement sont avérés par la plupart des auteurs (Kumar *et al.*, 2011). Il est également important de prendre en compte le nombre d'applications. Trois applications de l'extrait tout au long du cycle de la culture semblent générer de meilleurs résultats (Khan *et al.*, 2011). Enfin, la température extérieure et le stade du développement de la plante sont à prendre en compte dans le choix des dates d'application.

ii. Biostimulation, croissance et 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. Pour la plupart des études, l'augmentation de biomasse totale résulte principalement d'une augmentation de la biomasse racinaire (Figure 17). 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 (Figure 17). De même, Rayorath *et al.* (2008) montrent que des plants d'*Arabidopsis thaliana* traités par un extrait d'*Ascophyllum nodosum* présentent une augmentation de biomasse racinaire accompagnée d'une augmentation de la longueur des racines.

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, qui par ailleurs se répercutent sur le rendement des cultures. En effet, Rathore *et al.*, (2009) observent une augmentation de près de 57 % du rendement grainier du témoin avec une application foliaire de *Kappaphycus alvarezii* sur soja (Tableau 2). De même chez le fraisier, Spinelli *et al.*, (2010) observent une augmentation de 27 % de la production de fruits avec application d'*Ascophyllum nodosum*.

iii. Biostimulation et nutrition des plantes

Une stimulation de l'acquisition des nutriments par la plante a été rapportée par plusieurs auteurs suite à une pulvérisation foliaire d'extraits d'algues. En effet, Rathore *et al.*, (2009) ont observé une augmentation de l'absorption de l'azote, du phosphore, du potassium et du soufre après une pulvérisation foliaire d'un extrait de *Kappaphycus alvarezii* sur des plants de soja. 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 (Tableau 2). De la même manière, Mancuso *et al.* (2006) rapportent, sur vigne, une meilleure acquisition de l'azote, du phosphore et du



Tableau 3 : Effet du N-PRO sur l'activité *in vitro* de la nitrate réductase chez *Arabidopsis thaliana* en fonction de la concentration en azote (1mM et 7mM). N-PRO : extrait d'algue manufacturé par Roullier appliqué à une concentration de 1,7%v/v (Durand *et al.*, 2003)

Traitement	Activité Nitrate réductase (nmol nitrite.mg ⁻¹ protéine.min ⁻¹)	
	1mM	7mM
Témoin	0,36 ± 0,18	1,75 ± 0,66
Cytokinines	0,39 ± 0,21	1,99 ± 0,76
N-PRO	3,43 ± 1,30	3,80 ± 1,38



magnésium après application d'un extrait riche en Isopentenyl Adenine (IPA, BiotechMarine) et en glycine bétaïne. Ces derniers favoriseraient l'ouverture des stomates (Mancuso *et al.*, 2006) ainsi que le maintien de leur turgescence et leur conductance (Spinelli *et al.*, 2010). Cet extrait permettrait également d'augmenter le niveau de photosynthèse. En effet, chez le fraisier, une augmentation des teneurs en chlorophylle (+11%) a été observée après une application foliaire d'un extrait d'*Ascophyllum nodosum* (Spinelli *et al.*, 2010).

Par ailleurs, des travaux sur du colza d'hiver (*Brassica napus L.*) ont permis de montrer l'effet d'un extrait d'*Ascophyllum nodosum* sur l'absorption du soufre (Jannin *et al.*, 2013). Les résultats de cette étude montrent une stimulation plus forte de l'absorption, de l'assimilation et du stockage du soufre chez les plantes traitées, ceci associé à une surexpression des transporteurs de sulfate racinaires de type Sult1 ou Sult4.

Enfin, les travaux de Durand *et al.* (2003) se sont focalisés sur les modifications du métabolisme azoté induites par les extraits algaux. Ils rapportent une augmentation de l'activité nitrate réductase (NR) chez *Arabidopsis thaliana* en réponse à un extrait algal N-PRO (nom commercial d'un produit manufacturé par le groupe Roullier). 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 l'activité NR, 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 (Tableau 3). 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.



Tableau 4 : Les différentes hypothèses de travail testées lors cette étude

Lors d'une carence en soufre	Lors d'une application d'extrait d'algue
Diminution du ratio feuille/racine	Augmentation de la croissance de la plante
Assimilation du sulfate stocké dans la vacuole	Absorption et assimilation du soufre amélioré : augmentation des teneurs en soufre et sulfate
Remplacement des sulfates par des ions de remplacement dans la vacuole	
Affectation du métabolisme carboné : ↓ chlorophylles	
Affectation du métabolisme azoté : activité de la nitrate réductase affectée	



F. Objectifs de l'étude

Face à l'évolution récente des contraintes économiques et environnementales agricoles, cette étude s'insère totalement dans une optimisation de la gestion du soufre par les plantes cultivées, notamment pour les grandes cultures comme le blé. En effet, limiter les pertes de rendement en valorisant au mieux les apports de soufre est un enjeu crucial pour l'Europe et en particulier pour la France, deuxième exportateur mondial de denrées agricoles. Ce but ne pourra être atteint qu'en développant simultanément, des indicateurs de fertilisation soufrée, des fertilisants innovants avec activateur de la nutrition soufrée et des outils de pilotage de la fertilisation en temps réel. Ces derniers contribueront à la préservation de l'environnement et permettront aux agriculteurs de répondre aux exigences de l'Agriculture raisonnée et durable.

Ce projet de Recherche et Développement vise donc à :

- Développer des indicateurs de nutrition soufrée pour le pilotage de la fertilisation
- Rechercher de nouvelles molécules d'origine naturelle permettant d'optimiser la nutrition soufrée et azotée.

Cette étude tentera de répondre à ces objectifs et aux hypothèses de travail présentées dans le tableau 4 à travers des expérimentations menées sous conditions contrôlées afin d'éviter tout biais environnemental. Ainsi, les effets d'une carence en soufre seront appréhendés chez le blé (*Triticum aestivum L.*) via la mesure de la production de biomasse racinaire et foliaire, et l'analyse des teneurs en N, S, SO₄²⁻, NO₃⁻ et Cl⁻ au sein des feuilles à des stades de croissance végétative (indicateurs précoces). Parallèlement, seront quantifiés l'évolution des teneurs en chlorophylle ainsi que l'activité enzymatique nitrate réductase.

L'ensemble de ces éléments constituera une première étape dans la recherche d'indicateurs ioniques et biochimiques de la nutrition soufrée.

Le deuxième volet portera sur le criblage d'extraits d'algues incorporés dans la solution nutritive en conditions nutritives optimales. Les effets sur la croissance du blé et sur l'absorption du soufre seront également étudiés.



Tableau 5 : Composition des solutions Hoagland témoin et carencées en soufre. En rouge, les éléments dont les concentrations diffèrent entre les deux modalités. La solution témoin est également utilisée pour le criblage des extraits d'algues

Elements principaux	Concentrations finales (mM)	
	Solution témoin	Solution carencée
Ca	1,20	1,10
N	2,70	2,70
K	1,58	1,58
P	1,00	1,00
Fe	0,10	0,10
Mg	0,10	0,10
S	0,1087	0,0087
Cl	0,20	0,20
Na	0,20	0,20

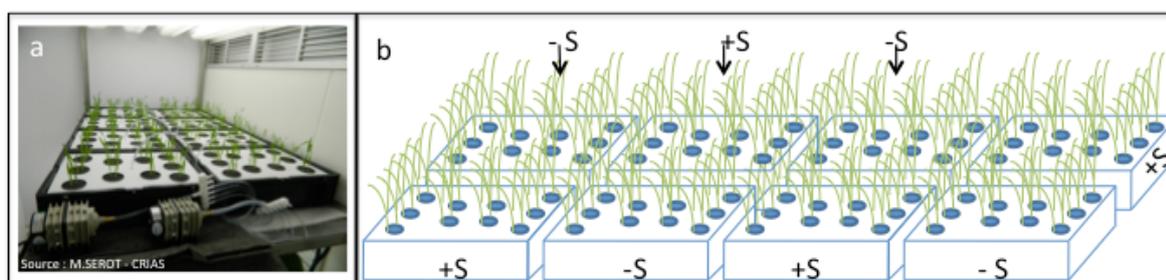


Figure 18 : Système hydroponique général en bac. A) 3 plantules de blé sont insérées par l'hypocotyle dans un cylindre de mousse, disposé sur des plaques (10 mousses par plaque) de façon à ce que seule les racines plongent dans la solution nutritive (7 L). Des tuyaux en plastiques, plongés dans la solution, assurent un bullage d'air comprimé permettant l'oxygénation des racines. B) disposition schématique des différentes modalités. -S : modalité carencée, +S : modalité témoin

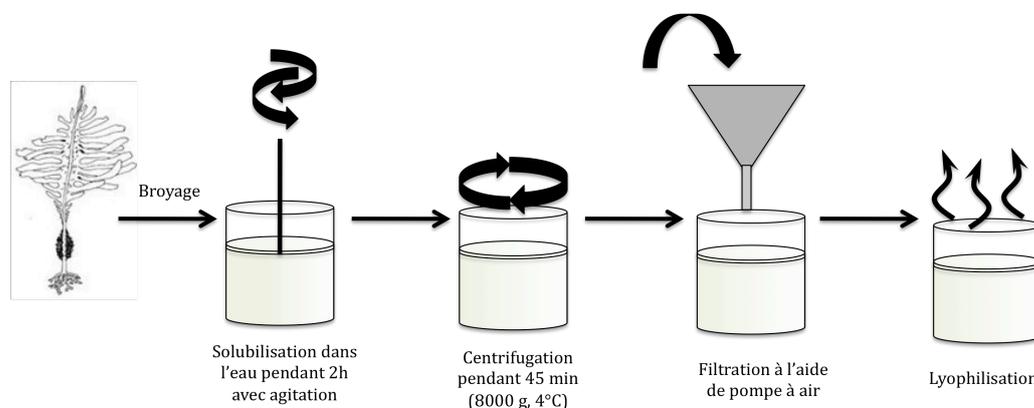


Figure 19 : Représentation schématique de l'extraction à l'eau d'extraits à base d'algues : *Undaria pinnatifida*, *Laminaria digitata* et *Ulva spp*



III - Matériels et Méthodes

A. Matériel végétal et conditions de culture

La variété de blé tendre d'hiver (*Triticum aestivum* L.) utilisée pour l'ensemble des expérimentations est « Sankara ». C'est une variété de Blé Panifiable Supérieur (BPS) avec une teneur en protéines moyenne. Elle est tolérante au froid et caractérisée par une montaison assez tardive.

Toutes les cultures sont menées en conditions contrôlées en chambre de croissance. L'hygrométrie est stable et la thermopériode est de 22°C/18°C jour/nuit avec une photopériode de 12h. Les plantes reçoivent un éclairage artificiel dispensé par des lampes néons (lumilux cool daylight, 36 W).

A-1. Germination des graines et culture en hydroponie

Les graines de blé sont mises à germer en présence d'eau déminéralisée sur une couche de perlite humidifiée pendant 5 jours à l'obscurité, puis les plantules sont placées 5 jours à la lumière. Elles sont ensuite repiquées dans des bacs hydroponiques contenant 7 L de solution Hoagland témoin (composition indiquée dans le Tableau 5) avant l'application du traitement (carence en soufre ou apport d'extraits d'algues). Les solutions sont aérées à l'aide d'une pompe à air et sont changées tous les deux à trois jours afin d'éviter toute carence dans le milieu. A chaque changement, le pH est ajusté à 6 avec de l'hydroxyde de potassium (KOH). Chaque bac d'hydroponie est composé de 10 godets contenant 3 plantules de blé chacun (Figure 18).

A-2. Origine des algues et préparation des extraits

Les algues sont fournies par la société Setalg (Pleubian, France). Deux Algues brunes (*Undaria pinnatifida* et *Laminaria digitata*) et une algue verte (*Ulva spp*) ont été testées. Chaque type d'algue broyée, a été mis dans de l'eau ultra pure sous agitation pendant 2 heures à une concentration de 50 g.L⁻¹. Cette solution est centrifugée pendant 45 minutes (8000 g, 4°C), filtrée puis lyophilisée (Figure 19). La poudre obtenue est ensuite resolubilisée pour être incorporée dans la solution nutritive destinée à la culture du blé.

A-3. Plan d'expérimentation et application des traitements

i. Etude de la carence en soufre

Après la germination des graines de blé et leur transplantation dans des bacs d'hydroponie (cf. A-1), les plantules reçoivent une solution Hoagland pendant 10 jours avant l'application de la carence en soufre (Figure 20). Les bacs sont ensuite séparés en deux lots (modalités) : un lot « témoin » qui reçoit la même solution nutritive avec 0,1mM de soufre, et un lot « traité » cultivé sur une solution carencée en soufre (8µM ; Tableau 5). Chaque lot est constitué de 4 bacs et chaque bac constitue une répétition biologique (Figure 18). Les plantes sont ensuite cultivées pendant 35 jours à partir du début du traitement (T=0). Tout au long de l'expérimentation, des récoltes successives ont été réalisées : à T0 (récolte avant application



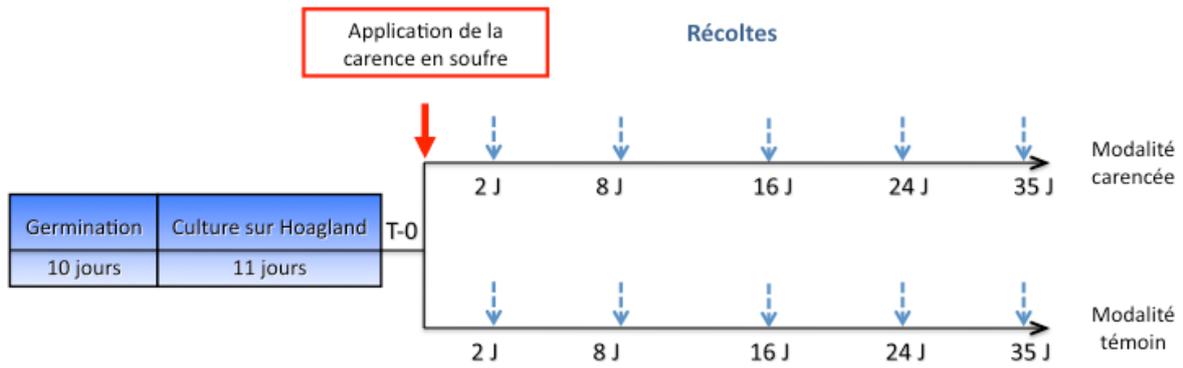


Figure 20 : Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour l'étude des effets de différents stades de carence en soufre sur 35 jours

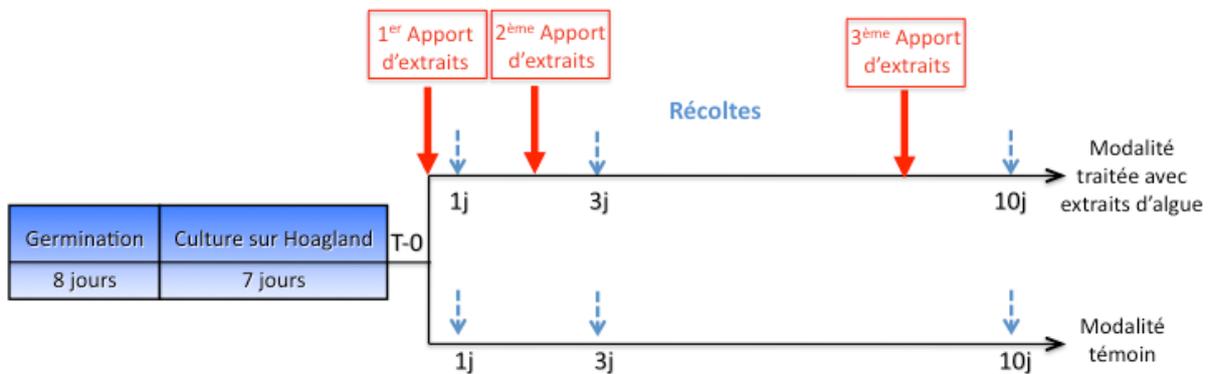


Figure 21 : Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour le criblage des extraits d'algues

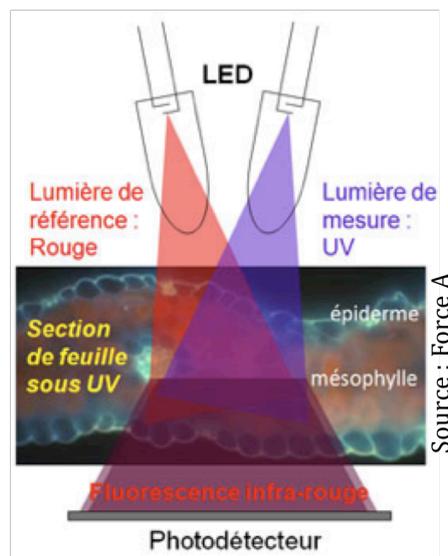


Figure 22 : Principe de fonctionnement de l'appareil Dualex®. La concentration en chlorophylle présente dans le mésophylle est estimée par fluorescence chlorophyllienne via un photodétecteur



ii. Criblage des extraits d'algues

Après la germination des graines de blé et leur transplantation dans des bacs d'hydroponie (cf. A-1), les plantules reçoivent une solution Hoagland pendant 7 jours avant l'apport des extraits (Figure 21). Les bacs sont ensuite séparés en deux lots (modalités) et cultivées pendant 10 jours en l'absence (témoin) ou en présence de l'extrait algal. 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 de la culture. Les concentrations utilisées sont de 70 mg.L^{-1} pour les extraits d'*Undaria pinnatifida* et de *Laminaria digitata*, et deux concentrations de l'algue verte *Ulva spp* ont été testées : 70 et 140 mg.L^{-1} . Des récoltes successives ont été réalisées : à T0 (récolte avant application de l'extrait), 1, 3 et 10 jours de traitement (Figure 21). Trois plantes par répétitions sont prélevées à chaque récolte pour des analyses ultérieures (cf. II et III du chapitre Matériels et Méthodes).

B. Mesure des paramètres physiologiques de la plante

B-1. Détermination des biomasses foliaires et racinaires

A chaque date de récolte et pour chaque traitement, 4 lots de trois plantes sont prélevés (1 lot de 3 plantes = 1 répétition biologique). Les parties aériennes (feuilles et tiges) et racinaires de chaque plante sont séparées, pesées (biomasse fraîche) puis broyées finement dans de l'azote liquide. Des aliquotes de matière fraîche sont séparées en deux lots. Le premier, lyophilisé pendant 48h, servira à la détermination de la matière sèche, aux analyses de l'azote et du soufre total par un analyseur CHNS et aux analyses d'ions par chromatographie ionique. Le deuxième lot est immédiatement plongé dans l'azote liquide puis conservé à -80°C pour des analyses ultérieurs (acides aminés, phytohormones...).

B-2. Détermination des teneurs foliaires en chlorophylle

Les teneurs foliaires en chlorophylle sont mesurées dès lors que la largeur de la feuille de blé est suffisante pour utiliser l'appareil de mesure Dualex[®], capteur optique portable de Force-A (Orsay, France). Le principe de mesure consiste en une excitation des feuilles par des rayons Ultra-Violet (UV) et rayons rouges (Figure 22). La concentration en flavonoïdes est, quant à elle, mesurée par la différence entre la fluorescence chlorophyllienne sous infrarouge et celle sous UV (Figure 22). A partir de ces données, il est donc possible de calculer le ratio des teneurs en chlorophylle/flavonoïdes, 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 lors de l'étude de la carence en soufre. 10 mesures par réplicat (ensemble des plantes d'un bac hydroponique) sont effectuées quotidiennement.



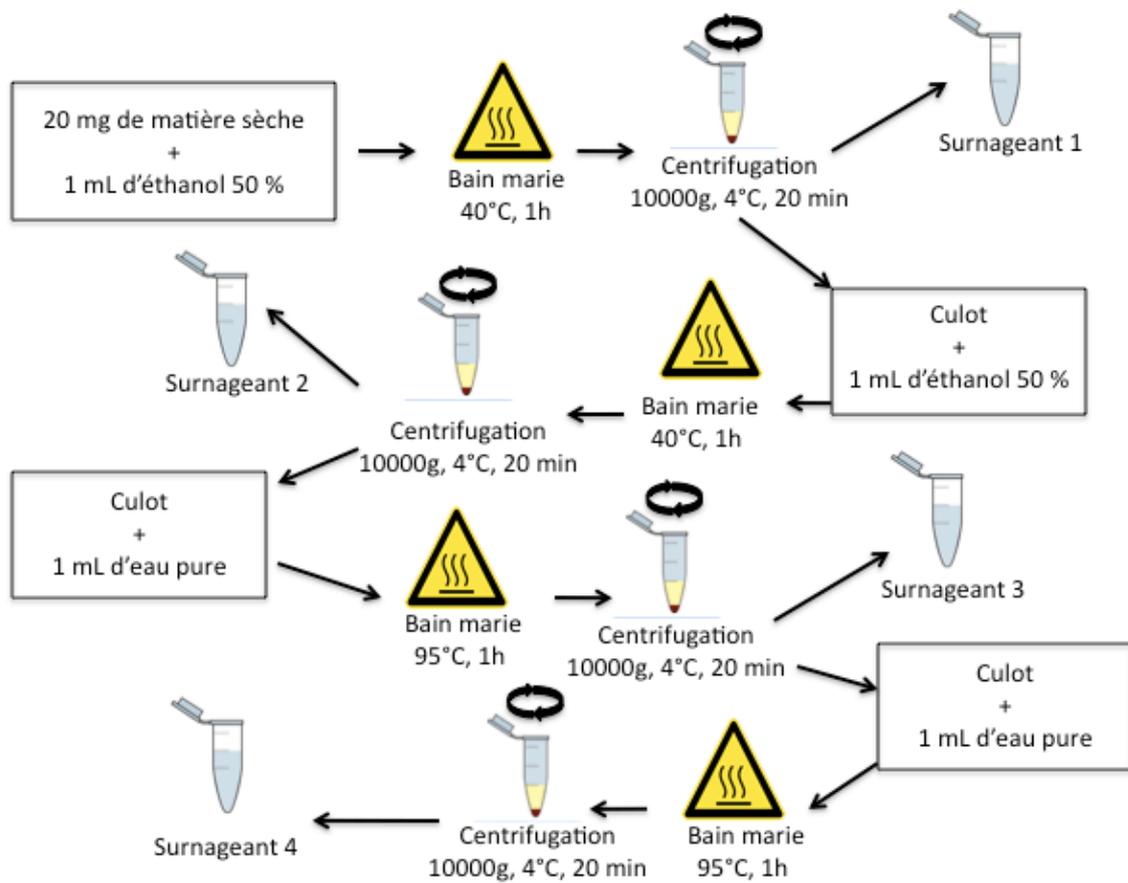


Figure 23 : Représentation schématique du protocole d'extraction de sulfate, nitrate, chlorure et phosphate à partir de matière sèche racinaire et foliaire. L'ensemble des surnageants est ensuite concentré sous vide puis re-suspendu dans 1mL d'eau pure



C-1. Extraction et dosage des sulfates, nitrates, chlorures et phosphates

Le sulfate, nitrate, chlorure et phosphate sont extraits à partir de 20 mg de matière sèche (feuille ou racine ; Figure 23). L'extrait est placé dans 1ml de solution d'éthanol 50 % à 40°C pendant 1h. Après centrifugation de 20 minutes à 4°C (10000g), le surnageant est récupéré. Il est de nouveau placé 1h à 40°C après ajout de 1 ml d'éthanol au culot. Après incubation et centrifugation (20min, 4°C et 10000g), le surnageant est récupéré et ajouté au précédent. Cette opération (2 incubations et 2 centrifugations) est répétée une nouvelle fois en remplaçant l'éthanol 50% par 1ml d'eau ultra-pure et en augmentant la température d'incubation à 95°C (Figure 23). Les quatre surnageants sont ensuite regroupés et concentrés sous vide pendant 10 h à température ambiante (Concentrator Evaporator RC 10.22 Jouan, Saint Herblain, France). Les résidus secs des surnageants sont solubilisés dans 1 ml d'eau ultra-pure, centrifugés 20 min (10000g) à température ambiante puis filtrés à l'aide d'un filtre seringue conçu pour les analyses ioniques. Des dilutions de 5 et 25 sont effectuées pour respectivement déterminer la concentration en nitrate et celles en sulfate, phosphate et chlorure par chromatographie ionique à haute performance (HPLC, ICS 5000+). 25µl d'extrait filtré est injecté grâce à un passeur automatique. Les échantillons sont élués grâce à une solution constituée d'acide méthane sulfonique (MSA ; 20mM) délivrée par un système de pompe isocratique. Les cations de l'échantillon sont détectés, après séparation, grâce à un détecteur conductimétrique.

C-2. Préparation des échantillons et détermination des teneurs en N et S total

Un aliquote sec (2 à 2,5mg) de chaque organe (feuille ou racine) réduit en poudre fine est placé dans une capsule en étain. L'azote (N) et le soufre (S) sont déterminés à l'aide d'un analyseur élémentaire C/H/N/S (FLASH 2000, Thermo Scientific). Le principe de ce dernier se base sur la combustion totale de l'échantillon à 1050°C sous courant d'oxygène et sous pression. Le carbone, l'hydrogène, l'azote et le soufre des échantillons sont respectivement transformés en dioxyde de carbone, eau, dioxyde d'azote et dioxyde de soufre. Les produits sont séparés sur une colonne chromatographique et mesurés par un détecteur à conductibilité thermique. L'élément (N ou S total : Etot) contenu dans un tissu (i) à un temps donné (t) est calculé selon la formule : $E_{tot,i,t} = (\% E_{i,t} \times MS_{i,t})/100$. Où %E_{i,t} est le pourcentage d'azote ou de soufre contenu dans le tissu i au temps t et MS_{i,t} est la biomasse sèche du tissu i au temps t.

C-3. Mesure de l'activité nitrate réductase

L'enzyme nitrate réductase (NR) catalyse la première étape de la réduction du nitrate dans le cytoplasme, elle conduit à la production de nitrite. L'activité de la NR est mesurée *in vivo* et consiste en un dosage des nitrites issus de la réaction enzymatique en utilisant la propriété du nitrite à se colorer en rose en présence de réactif de GRIESS.



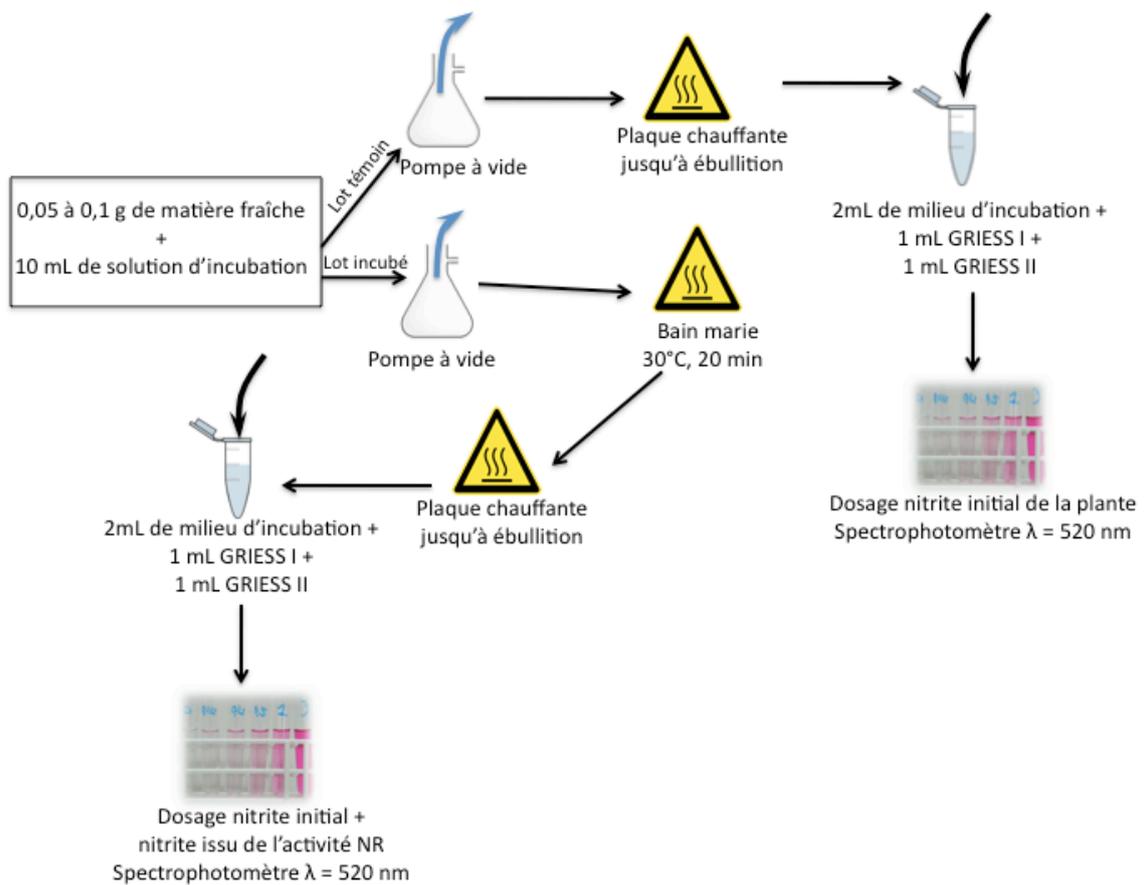


Figure 24 : Représentation schématique du protocole de dosage de l'activité nitrate réductase.



L'activité de la NR est mesurée sur 4 plantes par modalités avant ou après chaque récolte, c'est à dire à T0, 2, 3, 7, 15, 25 et 30 jours après l'application de la carence en soufre, sur des feuilles fraîchement découpées en carré. Afin de s'assurer que le dosage de l'activité NR ne prend pas en compte le nitrite présent dans les feuilles avant la réaction enzymatique, il est nécessaire de prélever un lot témoin qui dose la quantité de nitrite initiale de la feuille, ceci pour chaque échantillon. Ainsi deux lots de 0,05 à 0,1 g de feuille chacun sont préparés, l'un pour le dosage initial de nitrite (témoin) et l'autre pour le dosage de l'activité NR (lot incubé, Figure 24). Chaque lot est placé dans un erlenmeyer de 100 ml renfermant 10 ml de milieu d'incubation constitué de nitrate de potassium (KNO_3), de tampon phospho-potassique (PO_4HK_2 et $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) et de propanol-1. Un vide de 30 secondes renouvelé trois fois est effectué sur chaque erlenmeyer avec une pompe à vide. Puis les lots témoins sont placés sur une plaque chauffante jusqu'à ébullition pour stopper la réaction enzymatique. Les « lots incubés » sont placés 15 à 20 minutes à 30°C à l'obscurité. Après cette incubation, ils sont chauffés jusqu'à légère ébullition pour stopper la réaction enzymatique (Figure 24).

Pour effectuer un dosage colorimétrique, une gamme étalon est effectuée avec une solution mère de nitrite à $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de concentration diluée successivement aux concentrations de 0 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 et 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Les nitrites des milieux d'incubation et de la gamme étalon sont ensuite révélés. 2 ml de chaque lot et point de gamme sont prélevés, auxquels sont ajoutés 1mL de réactif GRIESS I (acide sulfanilique, acide acétique glacial) puis 1mL de GRIESS II (a-naphtylamine, acide acétique glacial). Après 10 minutes, l'ensemble des échantillons est passé au spectrophotomètre (Lambda 25, Perkin Elmer, Fremont, CA, USA) réglé sur $\lambda = 520 \text{ nm}$.

D. Traitement statistique des données

L'ensemble des traitements est réalisé systématiquement avec quatre répétitions. Les données obtenues sont présentées sous forme de moyennes et la variabilité des résultats est présentée sous la forme de l'écart type de la moyenne pour $n=4$. Pour réaliser les analyses statistiques, les résultats a été traité sur le logiciel R avec l'aide de l'interface graphique : R Commander.

Pour l'ensemble des données, la normalité et l'homogénéité de la variance ont été respectivement vérifiées avec les tests de Shapiro Wilks et Bartlett à 95%. Le test de Student est ensuite appliqué pour identifier les différences entre modalités. Lors d'une comparaison de plusieurs modalités, une analyse de variance (ANOVA) est réalisée suivie d'un test de comparaison des moyennes de Turkey.

Lorsque la normalité et l'homogénéité des données ne sont pas validées, un test de Wilcoxon est réalisé au seuil de risque $\alpha=5$ pour identifier les différences entre modalités.



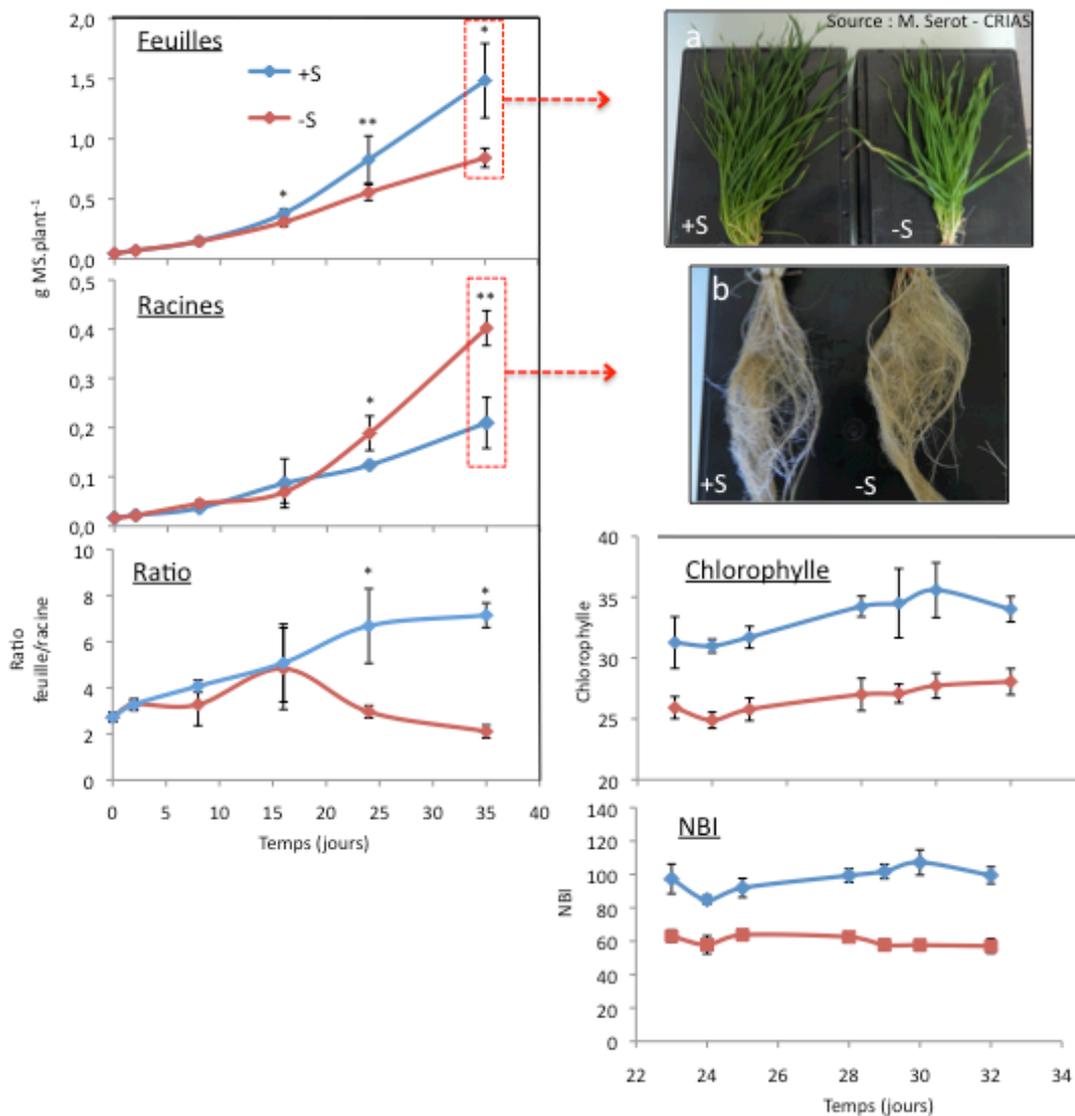


Figure 25 : Evolution des biomasses moyennes de matière sèche racinaires et foliaires, du ratio biomasse foliaire/racinaire, des teneurs en chlorophylles et du « Nitrogen Balance index » (NBI) par plant de blé (*Triticum aestivum L.*) sur 35 jours de carence en soufre. a et b : Photos des biomasses fraîches racinaires et foliaires de blé à 35 jours. +S= modalité témoin ; -S = modalité carencée. Les barres verticales représentent l'écart type de la moyenne pour n=4 (moyennes de biomasses) et n=10 (moyennes des teneurs en chlorophylle et NBI). Les astérisques représentent les différences significatives (à 95%) entre les plants témoins et carencés P<0.05 (*), P<0.01 (**), P<0.001 (***)



IV-RESULTATS

A. Etude de la carence en soufre chez le blé

Dans l'objectif d'identifier des indicateurs précoces de la nutrition soufrée pour le pilotage de la fertilisation au champ, une étude a été menée en conditions contrôlées pour étudier les effets d'une carence en soufre chez le blé tendre d'hiver (*Triticum aestivum* L.). Plusieurs mesures ont été réalisées : production de biomasse racinaire et foliaire, analyse des teneurs en N, S, SO_4^{2-} , NO_3^- et Cl^- au sein des feuilles et des racines à différents stades de croissance, ainsi que l'évolution des teneurs en chlorophylle et l'activité de la nitratre réductase.

A-1. Effet d'une carence en soufre sur la physiologie de la plante

Effet sur la croissance

Les biomasses racinaires et aériennes des plants de blé ont été mesurées sur plusieurs points de cinétiques. Les plantes ont été cultivées en présence (témoin, +S) ou en absence (-S) de soufre pendant 35 jours à partir de l'application de la carence.

Les résultats montrent que les plants de blé suivent une croissance exponentielle au cours des 35 jours de culture, pour les deux modalités (+S) et (-S ; Figure 25). Par ailleurs, les plantes cultivées en absence de soufre (-S) présentent des biomasses foliaires plus faibles (-45%) par rapport aux plantes carencées. Cette diminution de la croissance débute principalement au 16^{ème} jour de traitement où les symptômes d'une carence en soufre se manifestent sur la croissance (Figure 25).

Inversement à la croissance des parties aériennes, les biomasses racinaires des plantes carencées augmentent de 92% par rapport aux plantes témoins après 35 jours de traitement (Figure 25). Après 24 jours de carence, la différence entre les deux modalités devient significative et une plus forte production de racines latérales chez les plants carencées est visible à l'œil nu (Figure 25.a.b.).

L'application d'une carence en soufre, induit une diminution de la production des biomasses foliaires et une augmentation de la production des biomasses racinaires et modifie donc le ratio « biomasses foliaires/biomasses racinaires » (Figure 25). En effet, les résultats montrent que ce ratio diminue fortement lorsque les plantes sont cultivées en absence de soufre (-S), alors que les plantes témoin (+S) présentent un ratio trois fois plus élevé à partir du 24^{ème} jour de traitement.

Effet sur la photosynthèse et le Nitrogen Balance Index (NBI)

Les mesures ont été effectuées avec l'appareil Dualex[®] à partir du 23^{ème} jour de traitement. Les résultats montrent que les teneurs en chlorophylle et NBI restent relativement constantes au cours du temps pour les deux modalités, témoin et carencée (Figure 25). Les teneurs en chlorophylles des plantes carencées sont en moyenne inférieures de 13% à celles des plantes témoins (Figure 25). Cette différence de teneurs entre les modalités est significative sur



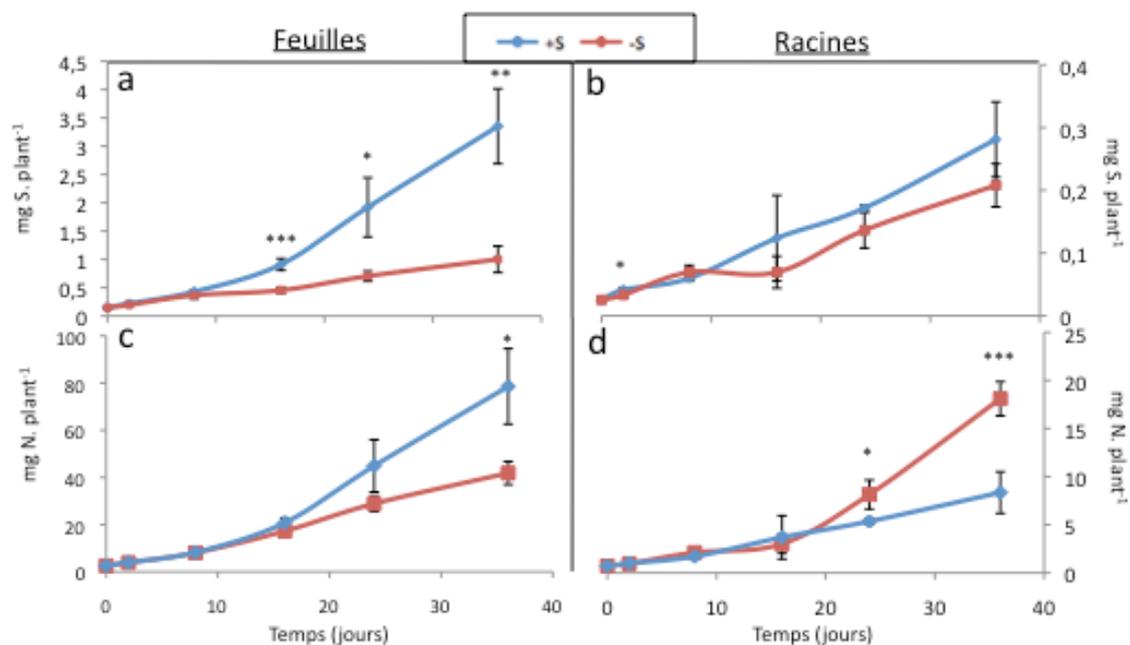


Figure 26 : Evolution des quantités de soufre et d'azote total foliaire (a, c) et racinaire (b, d) chez le blé (*Triticum aestivum* L.) sur 35 jours. +S= modalité témoin ; -S = modalité carencée. Les barres verticales représentent l'écart type de la moyenne pour n=4. Les astérisques représentent les différences significatives (à 95%) entre les plants témoins et carencés P<0.05 (*), P<0.01 (**), P<0.001 (***)



l'ensemble des mesures. Les valeurs NBI sont également plus faibles chez les plantes n'ayant pas reçu de soufre (Figure 25).

La diminution des teneurs en chlorophylle pour la modalité carencée devient plus visible à l'œil nu à partir du 16^{ème} jour de carence et devient plus nette au 35^{ème} jour (Figure 25).

A-2. Effet d'une carence en soufre sur le métabolisme de la plante

Effet sur les quantités de soufre et azote total

Pour l'ensemble des résultats obtenus, le contenu en soufre et en azote des plantes augmente au cours du temps et suit la même tendance que l'augmentation des biomasses foliaires et racinaires (Figure 26).

Chez les plantes témoins (+S), les quantités de soufre dans les feuilles augmentent pour atteindre 3,4 mg.plant⁻¹ après 35 jours de traitement, contre 1 mg.plant⁻¹ chez les plantes carencées (-S ; Figure 26.a.). Cette différence devient significative après 16 jours de traitement. A partir de ce point de cinétique, les quantités de soufre dans les feuilles (+S) continuent d'augmenter alors que celles des feuilles (-S) restent quasiment stables.

Au niveau racinaire (Figure 26.b.) et comparativement aux plantes témoin, le contenu en soufre chez les plantes carencées n'est pas affecté de manière significative. Par ailleurs, les résultats montrent que les plantes carencées (-S) présentent des quantités de soufre 1,5 fois plus faibles à partir du 10^{ème} jour de traitement. Elles atteignent 0,2 mg.plant⁻¹ après 35 jours de traitement contre 0,3 mg.plant⁻¹ pour les plantes témoin (Figure 26.b.).

Les résultats sur les analyses de l'azote des feuilles, montrent une augmentation des quantités en cet élément en fonction du temps (Figure 26.c.). Entre T0 (application de la carence) et T=16 jours, aucune différence significative n'est observée entre la modalité témoin (+S) et la modalité carencée (-S). A partir du 16^{ème} jour et jusqu'à 35 jours de traitement, les quantités d'azote augmentent de 20 à 78 mg N.plant⁻¹ chez le témoin et de 20 à 40 mg N.plant⁻¹ chez les plantes carencées, soit une réduction de 48% du contenu en azote des feuilles lors d'une carence en soufre (Figure 26.c.).

Inversement aux tissus foliaires, les quantités d'azote dans les racines, au 35^{ème} jour de traitement, sont 2,5 fois inférieures chez les plantes témoin (7 mg N.plant⁻¹) que chez les plantes carencées en soufre (18 mg N.plant⁻¹ ; Figure 26.d.). Les résultats ne montrent également aucune différence dans le contenu en azote des racines de T0 (application de la carence) à T=16 jours (Figure 26.d.).

Effet sur les teneurs en sulfates, phosphates, nitrates et chlorures

Les sulfates (SO₄²⁻) : Les résultats montrent que dès l'application de la carence en soufre (T=0), les teneurs en sulfates des feuilles chutent fortement pour devenir quasiment nulles à partir du 16^{ème} jour de traitement (Figure 27.a.). Les plantes témoin (+S) montrent des teneurs



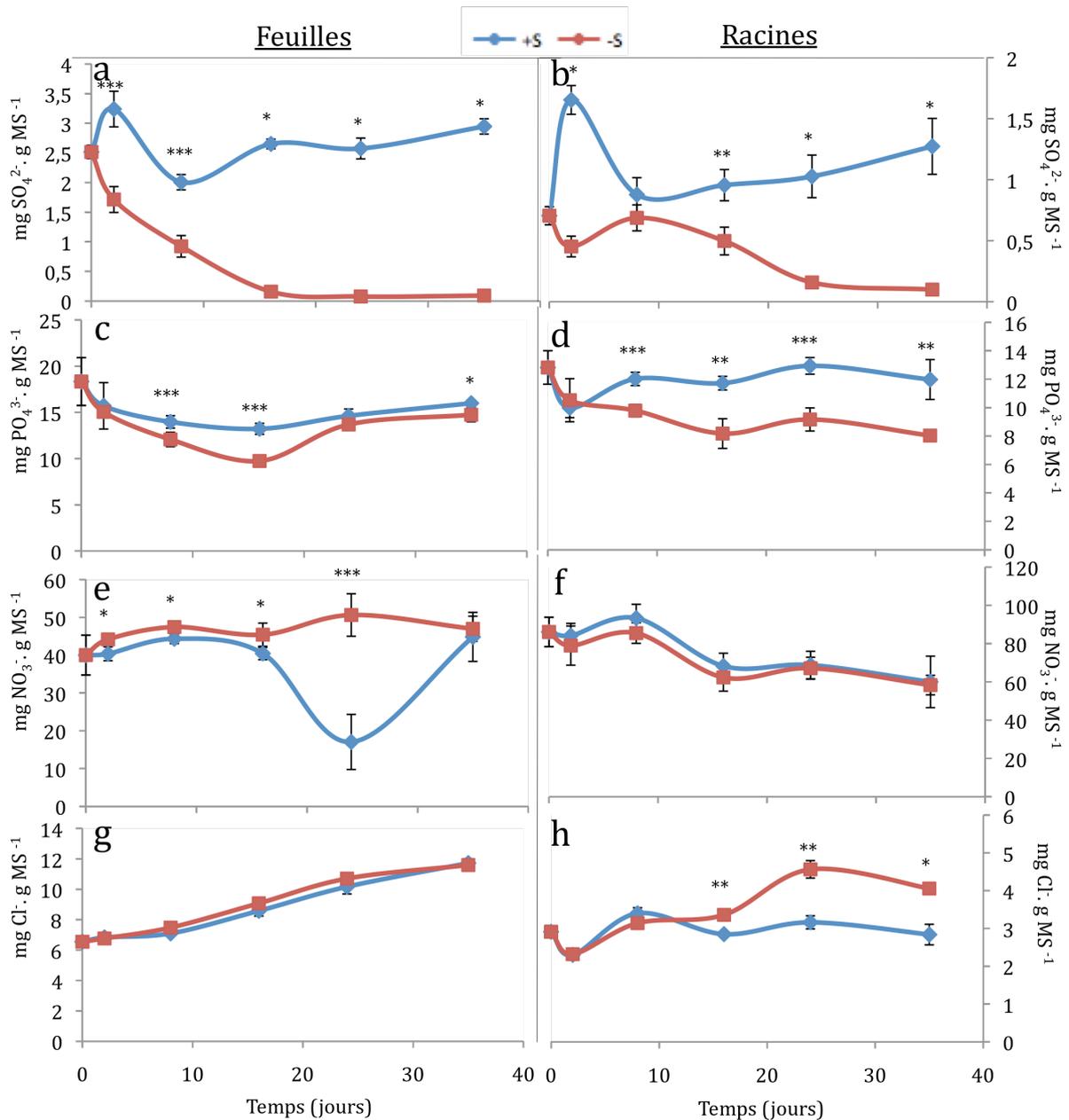


Figure 27 : Evolution des teneurs en sulfate, phosphate, nitrate et chlorure dans les racines et les feuilles de blé (*Triticum aestivum L.*) sur 35 jours. a, c, e, g : teneurs foliaires respectives en sulfate, phosphate, chlorure et nitrate. b, d, f, h : teneurs racinaires respectives en sulfate, phosphate, chlorure et nitrate. +S= modalité témoin ; -S = modalité carencée. Les barres verticales représentent l'écart type de la moyenne pour n=4. Les astérisques représentent les différences significatives (à 95%) entre les plants témoins et carencés P<0.05 (*), P<0.01 (**), P<0.001 (***)



en sulfates plus importantes, elles présentent une variation entre T=0 et T=16 jours, puis deviennent stables ($3 \text{ mg SO}_4^{2-} \cdot \text{g MS}^{-1}$), jusqu'au 35^{ème} jour de traitement.

Au niveau des racines, les teneurs en sulfates chez les plantes carencées diminuent entre T=0 et T=2 jours. Elles augmentent ensuite pour atteindre un pic à 8 jours ($0,7 \text{ mg SO}_4^{2-} \cdot \text{g MS}^{-1}$), puis diminuent progressivement au cours du temps (Figure 27.b.). Chez les plantes témoin (+S), les résultats montrent un pic des teneurs en SO_4^{2-} au 2^{ème} jour de traitement ($1,6 \text{ mg SO}_4^{2-} \cdot \text{g MS}^{-1}$), puis elles diminuent fortement entre le 2^{ème} et le 8^{ème} jour. Les teneurs en SO_4^{2-} augmentent ensuite progressivement et atteignent $1,4 \text{ mg SO}_4^{2-} \cdot \text{g MS}^{-1}$ après 35 jours de traitement (Figure).

Les phosphates (PO_4^{3-}) : Les teneurs en phosphate des feuilles restent relativement stables au cours du temps quelque soit la modalité (Figure 26.c.). Par ailleurs, comparativement aux plantes ayant reçu du soufre, les teneurs en PO_4^{3-} des plantes carencées sont plus faibles entre le 8^{ème} et le 24^{ème} jour de traitement, puis deviennent similaire avec le témoin.

Au niveau racinaire, les teneurs en PO_4^{3-} restent également relativement stables au cours du développement de la plante, pour les deux modalités +S et -S (Figure 26.d.). Les résultats montrent également une plus faible absorption de PO_4^{3-} lors d'une carence en S. En effet, après 35 jours de traitement, les teneurs en PO_4^{3-} chez les plantes -S sont réduites de 33% par rapport au témoin (Figure 26.d.).

Les nitrates (NO_3^-) : Entre T=0 et T=16 jours, les teneurs en NO_3^- des feuilles restent stables ($40 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{g MS}^{-1}$). Elles diminuent ensuite chez les plantes témoin pour atteindre $40 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{g MS}^{-1}$ au 24^{ème} jour de traitement avant de remonter progressivement et rejoindre la même teneur que celle des plantes carencées, à T=35 jours (Figure 26.e.).

Les teneurs en NO_3^- dans les racines des plantes témoin ou carencées, ne présentent aucune différence. En effet, les résultats de la figure 26.f. montrent que les deux courbes se confondent au cours du temps et les teneurs diminuent progressivement lors du développement des plantes.

Les chlorures (Cl^-) : Les teneurs en chlorures des feuilles augmentent de $6 \text{ mg Cl}^- \cdot \text{g MS}^{-1}$ à T=0, jusqu'à $11 \text{ mg Cl}^- \cdot \text{g MS}^{-1}$ à T=35 jours pour les deux modalités +S et -S (Figure 26.g.). Les résultats ne montrent aucune différence de teneurs en Cl^- entre ces deux modalités.

Par ailleurs, comparativement au témoin +S, les teneurs en Cl^- racinaire sont plus importantes lors d'une carence en soufre, principalement à partir de 16 jours de traitement (Figure 26.h.). En effet, les résultats montrent une augmentation de 30% du contenu en Cl^- chez les plantes carencées à T=35 jours.

Effet sur l'activité nitrate réductase (NR)

L'activité nitrate réductase (NR) montre une variation au cours du temps entre les deux modalités +S et -S (Figure 28). En effet, sur les deux premiers jours, l'activité NR est stimulée en conditions normales, alors qu'elle diminue lors d'une carence en soufre. A partir du 2^{ème} jour, l'activité augmente fortement dans les feuilles carencées, pour atteindre un pic



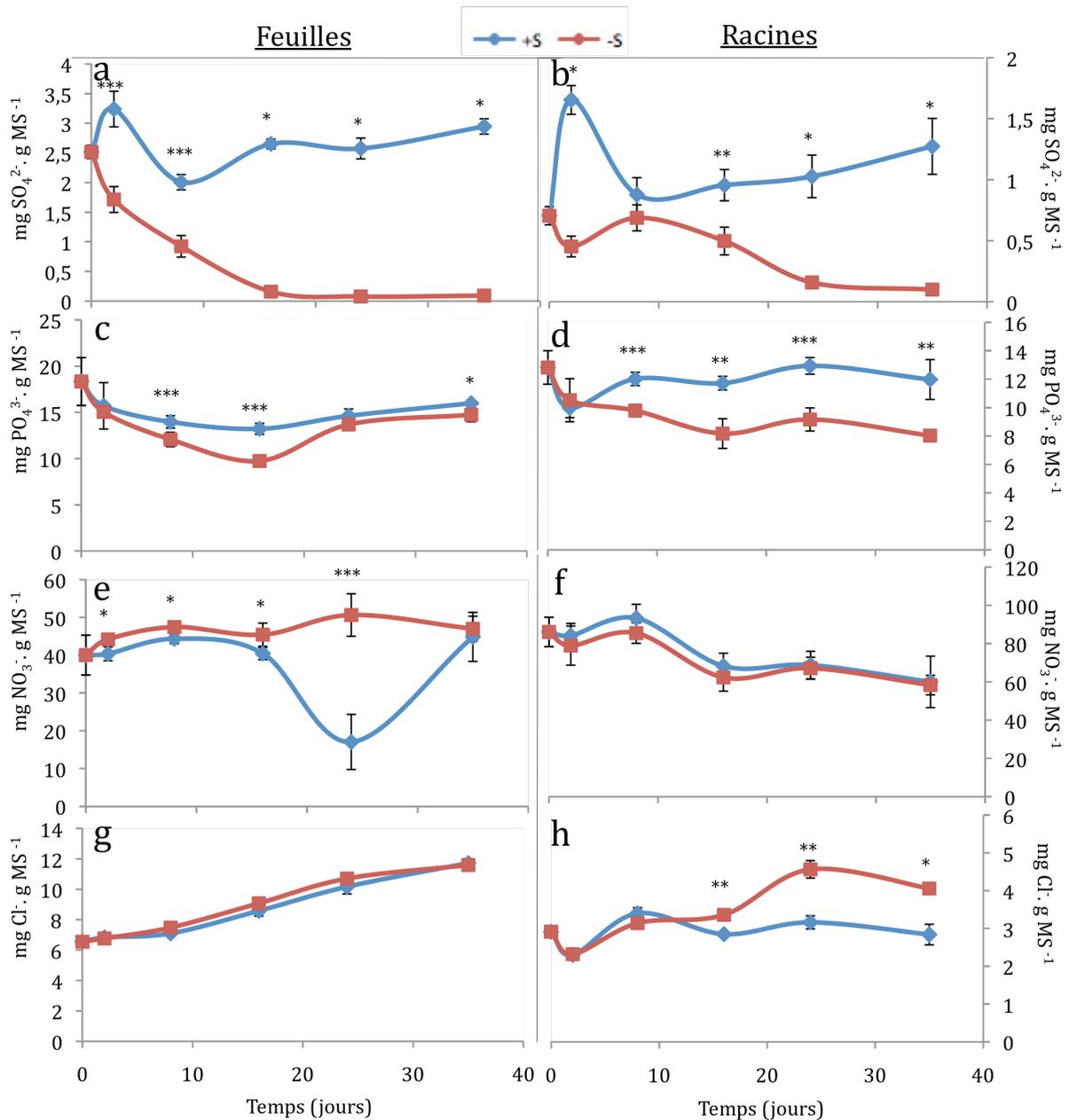


Figure 27 : Evolution des teneurs en sulfate, phosphate, nitrate et chlorure dans les racines et les feuilles de blé (*Triticum aestivum L.*) sur 35 jours. a, c, e, g : teneurs foliaires respectives en sulfate, phosphate, chlorure et nitrate. b, d, f, h : teneurs racinaires respectives en sulfate, phosphate, chlorure et nitrate. +S= modalité témoin ; -S = modalité carencée. Les barres verticales représentent l'écart type de la moyenne pour n=4. Les astérisques représentent les différences significatives (à 95%) entre les plants témoins et carencés P<0.05 (*), P<0.01 (**), P<0.001 (***)



de $4 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot (\text{h.g.MS})^{-1}$ à T=8 jours, puis diminue progressivement pour atteindre $1,2 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot (\text{h.g.MS})^{-1}$ après 35 jours de traitement (Figure 28). Chez le témoin, l'activité NR diminue après le 2^{ème} jour de traitement ($1,1 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot (\text{h.g.MS})^{-1}$) et augmente ensuite progressivement pour rejoindre la même activité que les feuilles carencées à T=35 jours.

Les résultats montrent également que l'activité NR des plantes +S est légèrement supérieure à celle des plantes -S entre 16 et 24 jours de traitement (Figure 28).

A-3. Evolution de différents ratios au cours du temps

A l'échelle des feuilles, une carence en soufre induit des variations dans leur contenu en anions ainsi qu'en soufre et azote total (Figures 26 et 27). Ceci se traduit par des variations au niveau de différents ratios.

La figure 29 montre que les ratios $\text{Cl}^-/\text{SO}_4^{2-}$, $\text{NO}_3^-/\text{SO}_4^{2-}$, $(\text{Cl}^-+\text{NO}_3^-)/\text{SO}_4^{2-}$ et N/S évoluent différemment en fonction du traitement. Ces différents ratios ne présentent aucune variation chez le témoin +S et restent constants au cours du développement des plantes. Par ailleurs, lors d'une carence en soufre, les trois premiers ratios présentent une évolution en trois phases : la première phase linéaire, entre T=0 et 8 jours, avec de faibles différences avec le témoin, la deuxième phase exponentielle entre le 8^{ème} et le 24^{ème} jour de traitement. Enfin, une troisième phase qui montre un plateau entre le 24^{ème} et le 35^{ème} jour de traitement (Figure 29)

B. Criblage des extraits d'algue

Dans l'objectif de rechercher des molécules d'origine naturelle à base d'algues permettant d'optimiser la nutrition soufrée du blé, des criblages d'extraits ont été réalisés en conditions hydroponiques. Deux criblages successifs ont été effectués, le premier pour tester les extraits d'*Ulva* et *Undaria* apportés à 70 mg.L^{-1} dans la solution hydroponique (Ulva70 et Undaria70), le second pour évaluer les effets des extraits d'*Ulva* et *Laminaria* apportés respectivement à 140 et 70 mg.L^{-1} (Ulva140 et Laminaria70). Les paramètres de croissance (production de biomasse racinaire et foliaire), et de physiologie (absorption et assimilation du soufre) ont été suivis pendant 10 jours de traitement.

B-1. Effet des extraits sur la production de biomasse du blé

Les biomasses totales, racinaires et aériennes des plants de blé ont été mesurées après 10 jours de contact avec l'extrait (apporté dans la solution nutritive) et comparées aux biomasses des plantes témoins (cultivées sans apport d'extraits). L'ensemble des résultats obtenus est présenté au sein de la figure 30.

Le 1^{er} criblage (Ulva70 et Undaria70 ; Figure 30) montre que les plantes traitées avec des extraits présentent des biomasses foliaires et racinaires supérieures aux plantes témoins. *Ulva* entraîne une augmentation des biomasses foliaires de +3,5% et racinaire de +7% (Figure 30), alors que *Undaria* entraîne une augmentation respective des biomasses foliaires et racinaires



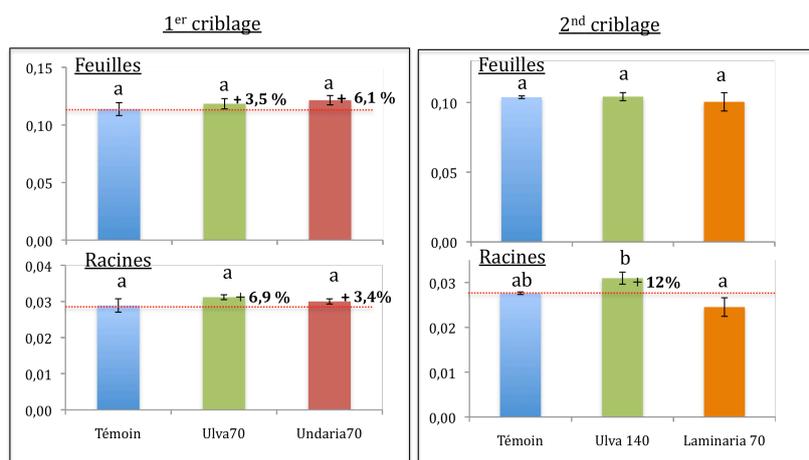


Figure 30 : Biomasses sèches racinaires et foliaires de blé (*Triticum aestivum L*) traités avec les extraits d'*Ulva spp.* (à 70 et 140 mg.L⁻¹), *Undaria pinnatifida* (à 70 mg.L⁻¹) et *Laminaria digitata* (à 70 mg.L⁻¹) au 10^{ème} jour de culture. Les barres verticales représentent l'écart type de la moyenne pour n=4. Deux lettres différentes indiquent deux moyennes significativement différentes à p<0.05

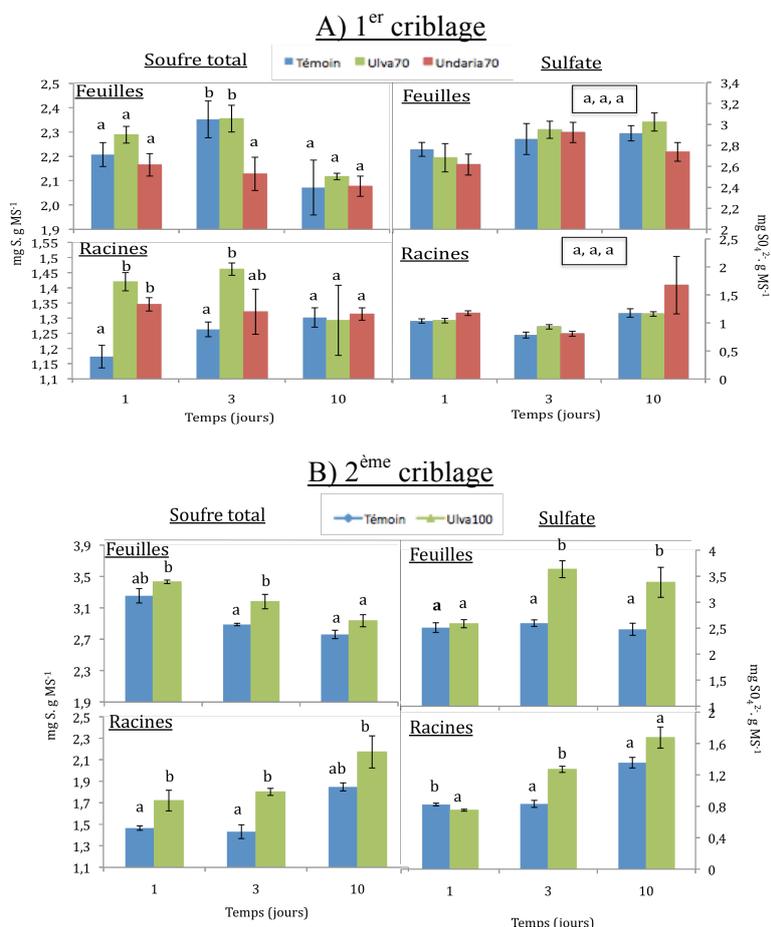


Figure 31 : Evolution des teneurs racinaire et foliaires en sulfate et soufre totale par gramme de matière sèche de blé (*Triticum aestivum L.*) traité avec les extraits d'*Ulva spp.* (à 70 et 140 mg.L⁻¹), *Undaria pinnatifida* (à 70 mg.L⁻¹) et *Laminaria digitata* (à 70 mg.L⁻¹) au 10^{ème} jour de culture. Les barres verticales représentent l'écart type de la moyenne pour n=4. Deux lettres différentes indiquent deux moyennes significativement différentes à p<0.05



de +3,5% et +7% (Figure 30). Cependant, les deux extraits n'affectent pas la croissance de manière significative.

Le 2^{ème} criblage (Ulva140 et Laminaria70 ; Figure 30) montre que l'application de l'extrait d'*Ulva* à 140 mg.L⁻¹ entraîne une augmentation de la biomasse racinaire de 12% par rapport au témoin non traité (Figure 30). Par ailleurs, l'apport d'extrait de *Laminaria*, entraîne un effet délétère sur la croissance du blé (Figure 30).

Pour les analyses suivantes, ne seront retenues que les modalités présentant une augmentation de la biomasse par rapport aux plantes témoins, à savoir : Ulva70, Ulva140 et Undaria70.

B-2. Effet des extraits sur l'absorption et l'assimilation du soufre

1^{er} criblage : Les teneurs en soufre et sulfate dans les feuilles ne présentent pas de différences significatives entre les différents traitements (Figure 31.A.). Cependant, des tendances sont observées. En effet, après un et 3 jours de traitement, les teneurs en soufre foliaire des plantes cultivées en présence d'*Undaria* sont inférieurs au témoin (Figure 31.A.).

Au niveau des racines, l'apport de l'extrait d'*Ulva* induit une augmentation des teneurs en soufre dans la plante de 20% après 1 et 2 jours de traitement (Figure 31.A.). Les résultats montrent également que l'apport d'*Undaria* induit une augmentation des teneurs en soufre des racines, uniquement au premier jour de traitement.

Concernant les teneurs en sulfates des feuilles et des racines, les résultats ne montrent aucun effet des extraits sur ce paramètre (Figure 31.A.).

2^{ème} criblage : Les résultats de la Figure 31.B. montrent que l'apport de l'extrait d'*Ulva* à 140 mg.L⁻¹ dans le milieu de culture induit une augmentation des teneurs en soufre et en sulfates des plantes.

Comparativement aux plantes témoins, les teneurs en soufre total dans les racines augmentent significativement de 21, 28 et 15% après respectivement 1, 3 et 10 jours de traitement (Figure 31.B.). Les mêmes tendances sont observées au niveau des feuilles. Cependant les effets ne sont pas significatifs (Figure 31.B.).

Les résultats montrent également que les plantes traitées à l'extrait d'*Ulva* présentent des teneurs en SO₄²⁻ supérieures à celles des plantes témoins, principalement à T=3 et 10 jours (Figure 31.B.). En effet, au niveau foliaire, ces teneurs sont 1,5 fois supérieures au témoin. Au niveau racinaire, elles sont 1,6 et 1,3 fois supérieures au témoin après 3 et 10 jours de traitement, respectivement (Figure 31.B.).





V- Discussion

Dans le contexte d'une agriculture raisonnée, il devient impératif de développer de nouvelles stratégies qui optimisent la fertilisation des cultures. Cela requiert des améliorations de pratiques culturales, et en particulier des modes d'apport d'engrais soufrés et de leur efficacité. L'utilisation d'un indicateur de carence en soufre précoce et d'un biostimulant de la nutrition soufrée constitue l'une des voies privilégiées permettant de réduire les pertes et d'optimiser le rendement. L'identification d'un indicateur de carence et le criblage d'extraits d'algues pour leurs capacités biostimulantes de la nutrition soufrée représentent les deux objectifs de ce stage.

A. Les indicateurs potentiels de carence en soufre chez le blé (*Triticum aestivum* L.)

A-1. Impact d'une carence en soufre sur la croissance du blé

L'ensemble des résultats obtenus montre que la réponse phénotypique de la plante à une carence en soufre n'est observée qu'après 16 jours de traitement (application de la carence). En effet, les plants de blé se développent correctement pendant les deux premières semaines de carence (Figure 25). Cette réponse adaptative ferait intervenir potentiellement les voies d'assimilation du sulfate, en augmentant l'absorption et l'allocation du soufre des racines vers les feuilles ainsi que l'efflux vacuolaire (Hoefgen and Nikiforova, 2008). Ceci permettant à la plante d'utiliser le soufre endogène pour son métabolisme.

Au-delà de 16 jours de carence, la production de biomasse, principalement foliaire, est fortement affectée. Comparativement aux plantes témoin (+S), elle présente une diminution de 43 % au 35^{ème} jour de traitement (Figure 25). Ces résultats corroborent ceux de Parmar *et al.* (2007) et Buchner *et al.* (2010), qui observent respectivement une diminution de 40 % et 50 % des biomasses aériennes chez *Brassica Napus* et *Triticum aestivum* cv *Paragon*.

Une carence en soufre provoque également une baisse de 13% des teneurs en chlorophylle des feuilles, principalement à partir du 23^{ème} jour de carence (Figure 25). Ceci indiquerait également une perturbation du métabolisme carboné lors d'une restriction en soufre chez le blé (Zhao *et al.*, 1996). Des résultats similaires sont rapportés chez le blé n'ayant pas reçu de soufre pendant une période de 15 jours (Burke *et al.*, 1986).

Par ailleurs, la carence induit une plus forte production de biomasses racinaires accompagnée d'une prolifération de racines latérales, observées à partir du 24^{ème} jour de carence (Figure 25). Carfagna *et al.* (2011) et Lopez-Bucio *et al.* (2003) observent également les mêmes résultats chez l'orge (*Hordeum vulgare*) et chez *Arabidopsis thaliana*. Cette prolifération serait associée à une synthèse d'auxines permettant d'augmenter la surface d'absorption des racines (Lopez-Bucio *et al.*, 2003). Ceci explique également la baisse du ratio feuilles/racines observée à partir du 24^{ème} jour de carence (Figure 25). Cette observation est corroborée par l'étude de Carfagna *et al.* (2011) chez l'orge (*Hordeum vulgare*) cultivé en conditions hydroponiques.





A-2. Impact d'une carence en soufre sur le métabolisme soufré et azoté

La diminution des biomasses aériennes lors d'une carence en soufre entraîne un faible contenu en soufre et en azote dans les feuilles (Figure 26.a.) indiquant une perturbation du métabolisme soufré et azoté à partir du 16^{ème} jour de traitement. Au niveau racinaire, les quantités de soufre de la modalité carencées restent proches de celles du témoin (Figure 26.b.). Ceci peut être expliqué par l'augmentation de la biomasse racinaire observée dans ces conditions, et qui se traduit par un maintien d'une plus forte capacité d'absorption du soufre. Le prélèvement de l'azote par le blé augmente également lors d'une carence en soufre (Figure 26.d.). La forte production de biomasse racinaire pourrait également être à l'origine d'une plus forte capacité du blé à absorber l'azote. Par ailleurs, une allocation de l'azote foliaire vers les racines peut avoir lieu (Abdallah *et al.*, 2010), ce qui expliquerait les faibles quantités d'N présent dans les feuilles carencées (Figure 26.c.).

Globalement, les plantes carencées présentent une forte production racinaire afin d'explorer les ressources en sulfate du milieu. Cette croissance entraînerait une absorption de l'azote et du soufre plus importante, mais sans capacité de remobilisation vers les parties aériennes.

Au niveau physiologique, les symptômes d'une carence en soufre apparaissent précocement, juste après l'application de la carence. En effet, les fortes variations de l'activité nitrate réductase (NR), enzyme impliquée dans l'assimilation du nitrate, indiquent une perturbation du métabolisme azoté dès le deuxième jour de traitement, (Figure 28). Chez les plantes carencées, l'activité NR diminue durant les 2 premiers jours de traitement puis à partir du 8^{ème} jour de carence. D'autres travaux rapportent les mêmes résultats chez le tabac (*Nicotiana tabacum* ; Reuveuny *et al.*, 1980) et l'épinard (*Spinacia oleracea* ; Prosser *et al.*, 2001). Selon ces auteurs, cette diminution serait liée à une régulation de l'assimilation de l'azote pour maintenir un équilibre entre les métabolismes N et S mais aussi à une diminution générale de la synthèse de protéines (dont la nitrate réductase). L'augmentation de l'activité NR au 8^{ème} jour de carence serait, par ailleurs, associée à une assimilation des nitrates pour des besoins de synthèse de protéines induites par une carence en soufre.

A-3. Impact d'une carence en soufre sur le contenu en anions

La diminution des teneurs en ions sulfates dans les feuilles et les racines, dès l'application de la carence, indique l'absence de soufre dans la solution nutritive. Des résultats similaires sont observés chez le colza (*Brassica napus* ; Abdallah *et al.*, 2010) et chez l'épinard (*Spinacia oleracea* ; Prosser *et al.*, 2001). Par ailleurs, cette chute des teneurs en sulfate s'expliquerait également par un efflux du sulfate, stocké dans les vacuoles, pour être assimilé dans la plante en réponse à une carence. En effet, Shinmachi *et al.* (2010) et Koralewska *et al.* (2009) observent, lors d'une carence en soufre, une surexpression du gène de type SULTR4 et du gène codant pour l'APR, impliqués dans l'efflux vacuolaire et l'assimilation du sulfate, respectivement. Le déstockage et l'assimilation du sulfate endogène permettraient, par ailleurs, un développement optimal de la plante sur les 16 premiers jours d'une carence (Figure 25).



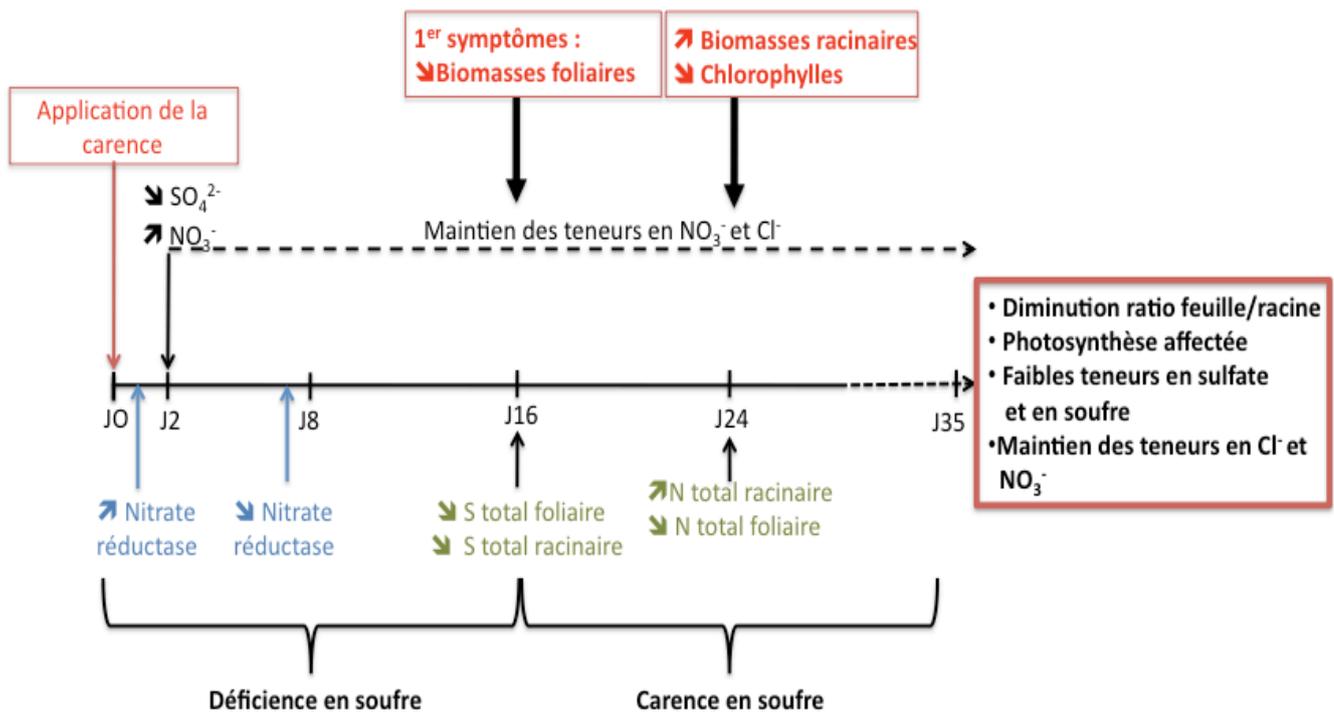


Figure 32 : Schéma récapitulatif de la cinétique de réponse du blé (*Triticum aestivum L*) à une carence en soufre sur 35 jours



De ce fait, l'hypothèse posée serait que d'autres anions jouerait un rôle osmotique en remplaçant les ions sulfates dans la vacuole. Or, seuls les nitrates (NO_3^-) restent accumulés au niveau des feuilles lors d'une carence en soufre, entre 16 et 35 jours de traitement (Figure 27.e.). Ce résultat validerait l'hypothèse du maintien du potentiel osmotique par les nitrates chez les plantes carencées (Koralewska *et al.*, 2008). Cependant, cette accumulation des nitrates pourrait s'expliquer par une perturbation du métabolisme azoté plutôt qu'à un rôle osmotique (Prosser *et al.*, 2001).

Les teneurs des autres anions (chlorure Cl^- et phosphate PO_4^{3-}), ne semblent pas être affectés au niveau foliaire (Figure 27c.g.). Néanmoins, une carence en soufre entraîne une plus faible absorption des phosphates et une plus forte absorption des chlorures par le blé, suggérant un effet synergique S/P et S/Cl.

A-4. Quels indicateurs pour la nutrition soufrée chez le blé ?

Les indicateurs les plus pertinents permettent une détection précoce de la carence en soufre. En effet, il est important de détecter une carence avant l'apparition des premiers symptômes, tels que la diminution des teneurs en chlorophylle ou le ralentissement de la production de biomasses foliaires qui pourraient impacter le rendement final. De plus, pour des raisons pratiques, une mesure de cet indicateur ne doit pas entraîner la destruction de la plante entière et doit donc s'effectuer au niveau des feuilles. Ainsi, le choix des indicateurs les plus pertinents se fera en priorité sur les réponses à une carence précoces et localisées au niveau des feuilles.

La figure 32 présente les différentes réponses du blé observées au cours des stades de croissance végétative. Globalement, des carences croissantes en S se traduisent dans un premier temps par une disparition du sulfate dans les tissus aériens et, dans un deuxième temps, par un ralentissement de la croissance associé à un défaut d'assimilation du nitrate. Ce dernier s'accumule alors au niveau vacuolaire.

La Figure 32 indique une réponse précoce de l'activité nitrate réductase ainsi que des teneurs foliaires en sulfates, nitrates et chlorures, sur les premiers jours de la carence. Ces derniers pourraient donc s'avérer être des indicateurs précoces de la nutrition soufrée chez le blé. Cependant, l'utilisation de valeurs absolues des teneurs en SO_4^{2-} , NO_3^- et Cl^- peut induire une dépendance de la mesure aux stades phénologiques de la plante. A l'inverse, un ratio des teneurs représente un indicateur stable (Zhao *et al.*, 1996). En effet, comme le montrent les Figures 27.a. et 27.e., les valeurs absolues de nitrate et sulfate des feuilles témoins évoluent avec le temps, contrairement au ratio $\text{NO}_3^- / \text{SO}_4^{2-}$ de ces mêmes feuilles qui reste stable au cours du développement de la plante, sur les 35 jours de culture (Figure 29).

Ainsi, ces ratios ioniques se présentent comme les indicateurs les plus fiables parmi l'ensemble des réponses de la plante observées dans cette étude. Les ratios $\text{NO}_3^- / \text{SO}_4^{2-}$, $\text{Cl}^- / \text{SO}_4^{2-}$ et $(\text{NO}_3^- + \text{Cl}^-) / \text{SO}_4^{2-}$ seraient les plus pertinents et peuvent indiquer trois phases de réponse en fonction de la disponibilité du soufre dans le milieu : une phase linéaire indiquant une suffisance en soufre dans le milieu, une phase exponentielle représentant le début d'une





carence en soufre et un plateau signifiant une carence plus sévère et prolongée en soufre (Figure 29).

Le ratio N/S pourrait être également intéressant. Cependant les phases de réponses ne sont pas clairement distinguées. En outre, il pourrait présenter une réponse plus tardive que les ratios ioniques. En effet, les concentrations en ions changent plus rapidement que les quantités totales de N et S lors d'une carence en soufre (Zhao *et al.*, 1996).

B. Biostimulation de la nutrition soufrée chez le blé (*Triticum aestivum* L.)

Trois extraits d'algues, dont un extrait à deux concentrations différentes, ont été testés pour leurs effets sur la croissance et la nutrition soufrée. L'approche de criblage utilisée est basée sur des paramètres de mesure simples (biomasses, teneurs en soufre et sulfate).

Les deux criblages successifs ont permis de mettre en évidence des tendances d'augmentation de la production de biomasse suite à l'application des extraits d'*Ulva* à 70 et 140 mg.L⁻¹ (Ulva 140 et Ulva70) et d'*Undaria* à 70 mg.L⁻¹ (Undaria70). A l'inverse, une application d'extrait de *Laminaria* à 70 mg.L⁻¹ entraîne une diminution de la biomasse. Cet effet négatif peut s'expliquer par l'effet délétère d'une concentration trop forte ou trop faible de biostimulant appliqués sur la plante, comme l'ont observé Kumar *et al.* (2011) chez le blé. L'effet concentration est également observé sur les plantes traitées par l'extrait d'*Ulva* à 70 mg.L⁻¹ et celles traitées à 140 mg.L⁻¹. En effet, l'application d'Ulva140 induit une augmentation des biomasses racinaires uniquement alors que l'application d'Ulva70 induit une augmentation des biomasses racinaires et foliaires. De plus, une application d'Ulva140 entraîne une augmentation des teneurs en soufre et sulfate dès le premier jour après l'application du traitement. En revanche, l'application de ce même extrait à 70 mg.L⁻¹ n'induit pas d'augmentation des teneurs en sulfate et entraîne uniquement une augmentation des teneurs en S dans les racines sur les premiers jours.

Nos résultats ont également mis en évidence l'intérêt de l'application de l'extrait Undaria70. Celui-ci induit une augmentation significative des teneurs en soufre dans les racines après un jour de traitement, mais n'entraîne pas d'augmentation des teneurs en sulfate dans la plante.

Globalement, l'extrait d'*Ulva* appliqué à 140 mg.L⁻¹ semble donc le plus intéressant parmi les extraits criblés vis à vis du développement de la plante et de la stimulation de la nutrition soufrée. Selon Jannin *et al.* (2013) une application de l'extraits algal AZAL5 induit dans la plante une perception d'une absence de soufre dans le milieu extérieur, conduisant à une surexpression des transporteurs racinaires et tonoplastiques (Sultr1.1, Sultr1.2, Sultr 4, 1 et Sultr 4,2). Une étude des transporteurs de sulfate racinaires et tonoplastiques permettrait de confirmer les effets induits par l'extrait d'*Ulva*140 sur la régulation de l'absorption du S. Il serait également intéressant de tester cet extrait sur une plus longue période de culture afin de déterminer s'il entraîne un meilleur développement de la plante à long terme. En effet, Mancuso *et al.* (2006) observent, après application d'extraits algaux, des effets significatifs sur la biomasse après 30 jours de culture chez *Vitis vinifera*. Enfin, il serait intéressant de tester cet extrait à des concentrations intermédiaires à 140 et 70 mg.L⁻¹ ou supérieures à 140 mg.L⁻¹ afin de cibler une concentration optimale pour le développement de la plante et





l'amélioration de la nutrition soufrée. De la même manière, un criblage des extraits de *Laminaria* et *Undaria* à d'autres concentrations pourrait également apporter de meilleurs résultats sur la nutrition soufrée et le développement de la plante.





VI- Conclusion et perspectives

Le soufre est un élément indispensable pour le développement de la plante. Or, les apports en soufre dans les parcelles de culture diminuent et les méthodes de fertilisation demeurent empiriques. Il est donc important d'optimiser la fertilisation soufrée afin de répondre à l'évolution récente des contraintes économiques et environnementales agricoles. L'étude présentée ici s'insère dans cet objectif d'optimisation de la gestion du soufre à travers une contribution au développement d'indicateurs de carence en soufre et de fertilisants innovants chez le blé tendre d'hiver (*Triticum aestivum L.*)

Ce travail, qui reste préliminaire et qui constitue une première approche pour le développement d'un Outil d'Aide à la Décision (OAD), a néanmoins mis en évidence des indicateurs potentiels de carence en soufre. Cette étude s'est basée sur des éléments de réponses physiologiques des plants de blé observés à différents stades de carence. En parallèle, et dans les mêmes conditions contrôlées, ce travail a également mis en avant la possibilité d'utiliser un extrait d'algue susceptible d'entraîner une amélioration de la croissance et de la nutrition soufrée chez le blé.

Cette étude a donc permis d'identifier des indicateurs de carence sensibles et utilisables à des stades précoces de croissance du blé, notamment les ratios $\text{NO}_3^- / \text{SO}_4^{2-}$, $\text{Cl}^- / \text{SO}_4^{2-}$ et $(\text{NO}_3^- + \text{Cl}^-) / \text{SO}_4^{2-}$; ainsi que des extraits algaux stimulant rapidement la nutrition soufrée, en particulier l'extrait à base d'*Ulva spp.*

Par ailleurs, 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 indicateurs et ces extraits d'algue en agriculture; que sur un aspect plus fondamental, visant à caractériser les signaux et les voies de régulation affectés par une carence en soufre.

Afin de valider l'hypothèse de remplacement des ions sulfates par d'autres ions, il serait intéressant de suivre le potentiel osmotique des plantes au cours du temps. Les protocoles de collecte de jus cellulaire chez le blé et de mesure du potentiel osmotique ont été mis en place durant mon stage. Les échantillons sont conservés à -80°C et seront analysés prochainement à l'INRA de Caen (UMR EVA 950-Nutrition N, C, S).

Lors de cette étude, nous avons observé un effet de la carence sur le développement racinaire du blé. Cette constatation pourrait être approfondie en étudiant l'architecture du système racinaire par l'utilisation de Rhizotrons et du scanne WinRHIZO. A cela, sera associé le suivi moléculaire du prélèvement de l'azote et du soufre, en s'intéressant notamment à l'expression des gènes intervenants dans l'absorption de ces éléments (transporteurs de nitrate et soufre déjà caractérisés chez le blé). Enfin, une analyse des phytohormones, au niveau foliaire et racinaire, est programmée dans la suite de ce projet afin de mieux appréhender les mécanismes de réponse du blé à une carence en soufre. Pour cela, des échantillons de plantes ont été envoyés durant mon stage au laboratoire espagnol du groupe Roullier (CIPAV de Pampelune) pour doser les teneurs hormonales des tissus.

Bien que nos résultats soient focalisés sur la caractérisation d'indicateurs ioniques, d'autres types d'indicateurs pourraient également être envisagés, notamment au niveau biochimique



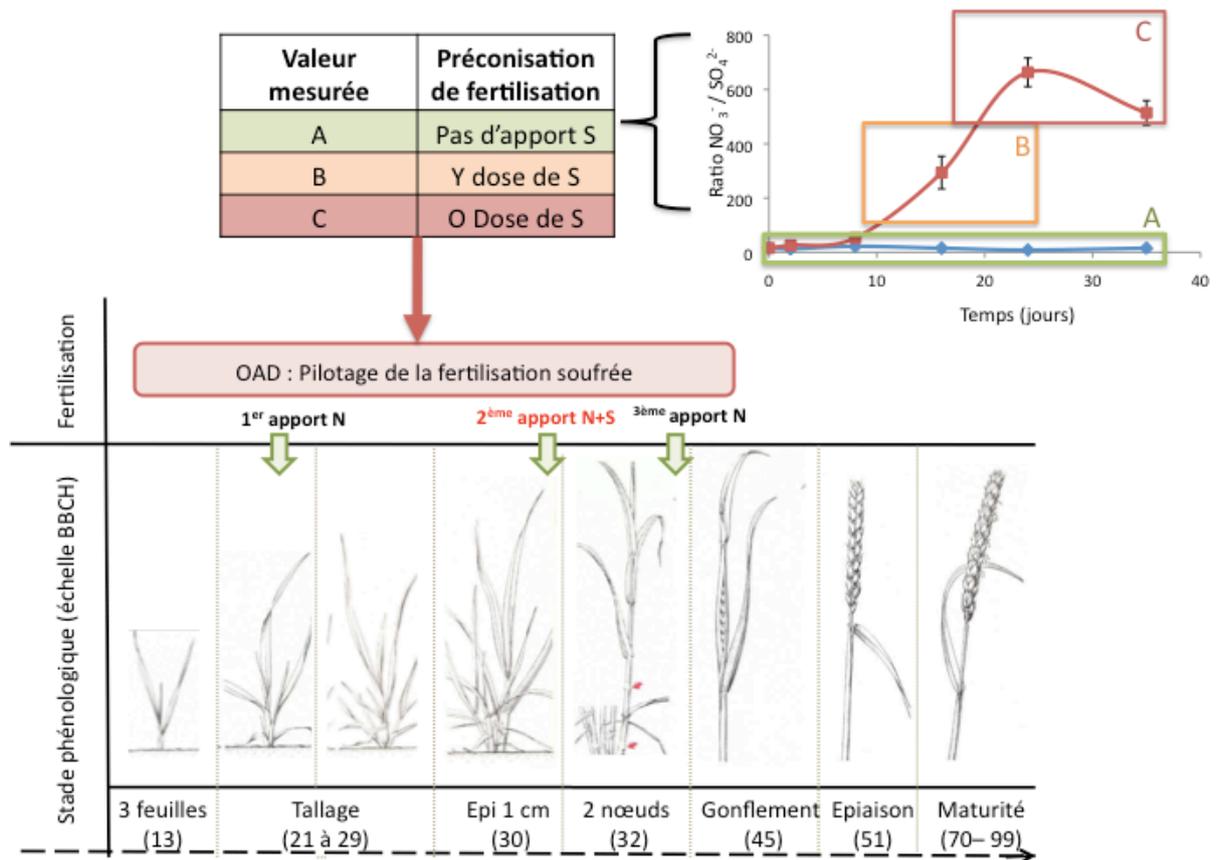


Figure 33 : Perspective d'utilisation du ratio $\text{NO}_3^- / \text{SO}_4^{2-}$ en tant qu'indicateur de la nutrition soufrée chez le blé (*Triticum aestivum* L)



(sucres, protéines, acides aminés, métabolites soufrés) ou moléculaires (expression des gènes intervenants dans le métabolisme soufré). Pour ce faire, l'acquisition d'une UPLC-MS (MS/MS), Q TOF haute résolution par le CRIAS, devrait permettre l'analyse d'un certain nombre de métabolites soufrés, qui viendront appuyer cette étude.

En termes de recherche appliquée, et pour aller vers un OAD utilisable au champ, des essais agronomiques peuvent être mis en place en envisageant une fertilisation soufrée contrastée (avec ou sans apport de soufre) afin de tester la fiabilité des indicateurs. Un système de lecture de données (types bandelettes), permettant de quantifier la teneur de certains anions dans les feuilles, devrait être suivi lors de prochaines expérimentations. Un travail de modélisation est, de ce fait, nécessaire ; l'objectif *in fine* étant d'établir un diagramme de décision permettant le pilotage de la fertilisation soufrée en temps réel (Figure 33).

Concernant les extraits d'algues, un effet dose peut être envisagé afin de mieux définir les effets sur la croissance de la plante. Par ailleurs, une étude à long terme (culture sur 30 jours au lieu de 10 jours) donnerait des éléments plus précis sur la croissance. D'autres criblages sont également en cours et les applications foliaires de ces extraits seront testées.





VII. Bibliographie et sitographie

Abdallah, M., Dubousset, L., Meuriot, F., Etienne, P., Avice, J.C., Oury, A. 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 (2010).

Ahmad, A. & Abdin, M. Z. Photosynthesis and its related physiological variables in the leaves of *Brassica* genotypes as influenced by sulphur fertilization. *Physiologia Plantarum* **110**, 144–149 (2000).

Ayala-Silva, T. & Beyl, C. A. Changes in spectral reflectance of wheat leaves in response to specific macronutrient deficiency. *Advances in Space Research* **35**, 305–317 (2005).

Barroso, C., Romero, L. C., Cejudo, F. J., Vega, J. M. & Gotor, C. Salt-specific regulation of the cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase gene from *Arabidopsis thaliana* is dependent on abscisic acid. *Plant molecular biology* **40**, 729–736 (1999).

Blake-Kalff, M., Hawkesford, M. J., Zhao, F. J. & McGrath, S. P. Diagnosing sulfur deficiency in field-grown oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and soil* **225**, 95–107 (2000).

Blake-Kalff, M., Zhao, F. J. & McGrath, S. P. Sulphur deficiency diagnosis using plant tissue analysis. (2002).at <<http://www.opengrey.eu/item/display/10068/370780>>

Blake-Kalff, M., Zhao, F. J. ., Hawkesford, M. J & McGrath, S. P. Using plant analysis to predict yield losses caused by sulphur deficiency. *Annals of applied biology* **138**, 123–127 (2001).

Buchner, P., Parmar, S., Kriegel, A., Carpentier, M. & Hawkesford, M. J. The sulfate transporter family in wheat: tissue-specific gene expression in relation to nutrition. *Molecular plant* **3**, 374–389 (2010).

Burke, J. J., Holloway, P. & Dalling, M. J. The effect of sulfur deficiency on the organisation and photosynthetic capability of wheat leaves. *Journal of plant Physiology* **125**, 371–375 (1986).

Carfagna, S., Vona, V., Di Martino, V., Esposito, S. & Rigano, C. Nitrogen assimilation and cysteine biosynthesis in barley: evidence for root sulphur assimilation upon recovery from N deprivation. *Environmental and Experimental Botany* **71**, 18–24 (2011).

Colavita, G. M., Spera, N., Blackhall, V. & Sepulveda, G. M. Effect of Seaweed Extract on Pear Fruit Quality and Yield. *XI International Pear Symposium 909* 601–607 (2010).at <http://www.actahort.org/books/909/909_72.htm>

Droux, M. Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynthesis Research* **79**, 331–348 (2004).





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

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

Gharmakher, H. N., Machet, J. M., Beaudoin, N. & Recous, S. Estimation of sulfur mineralization and relationships with nitrogen and carbon in soils. *Biology and Fertility of Soils* **45**, 297–304 (2009).

Haneklaus, S., Murphy, D. P. L., Nowak, G. & Schnug, E. Effects of the timing of sulphur application on grain yield and yield components of wheat. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **158**, 83–85 (1995).

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

Hawkesford, M. J. Transporter gene families in plants: the sulphate transporter gene family—redundancy or specialization? *Physiologia Plantarum* **117**, 155–163 (2003).

Hawkesford, M. J., Davidian, J.-C. & Grignon, C. Sulphate/proton cotransport in plasma-membrane vesicles isolated from roots of *Brassica napus* L.: increased transport in membranes isolated from sulphur-starved plants. *Planta* **190**, 297–304 (1993).

Hawkesford, M. J. & De Kok, L. L. J. *Sulfur in Plants: An Ecological Perspective*. **6**, (Springer: 2007).

Heidari, M., Galavi, M. & Hassani, M. Effect of sulfur and iron fertilizers on yield, yield components and nutrient uptake in sesame (*Sesamum indicum* L.) under water stress. *Afr. J. Biotechnol* **10**, 8695–8702 (2011).

Hoefgen, R. & Nikiforova, V. J. Metabolomics integrated with transcriptomics: assessing systems response to sulfur-deficiency stress. *Physiologia Plantarum* **132**, 190–198 (2008).

Honsel, A., Kojima, M., Haas, R., Frank, W., Sakakibara, H., Herschbach, C., Rennenberg, H. Sulphur limitation and early sulphur deficiency responses in poplar: significance of gene expression, metabolites, and plant hormones. *Journal of experimental botany* **63**, 1873–1893 (2012).

Jannin, L., Arkoun, M., Etienne, P., Laîné, P., Goux, D., Garnica, M., Fuentes, M., San Francisco, S., Baigori, R., Cruz, F., Houdusse, F., Garcia-Mina, J.M., Yvin, J.C., Ourry, A. Brassica napus Growth is Promoted by *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. Seaweed Extract: Microarray Analysis and Physiological Characterization of N, C, and S Metabolisms. *Journal of Plant Growth Regulation* **32**, 31–52 (2013).





- Kataoka, T., Watanabe-Takahashi, A., Hayashi, N., Ohnishi, M., Mimura, T., Buchner, P., Hawkesford, J.M., Yamaya, T., Takahashi, H. Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **16**, 2693–2704 (2004).
- Khan, W., Hiltz, D., Critchley, A. T. & Prithiviraj, B. Bioassay to detect Ascophyllum nodosum extract-induced cytokinin-like activity in Arabidopsis thaliana. *Journal of Applied Phycology* **23**, 409–414 (2011).
- Kopriva, S. Regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis and beyond. *Annals of Botany* **97**, 479–495 (2006).
- Kopriva, S. & Rennenberg, H. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1831–1842 (2004).
- Koprivova, A., Suter, M., den Camp, R. O., Brunold, C. & Kopriva, S. Regulation of sulfate assimilation by nitrogen in Arabidopsis. *Plant Physiology* **122**, 737–746 (2000).
- Koralewska, A, Buchner, P., Elisabeth, C., Stuiver, E., Freek, S., Kopriva, S., Hawkesford, J.M., De Kok, L.J. . Expression and activity of sulfate transporters and APS reductase in curly kale in response to sulfate deprivation and re-supply. *Journal of plant physiology* **166**, 168–179 (2009).
- Kumar, G. & Sahoo, D. Effect of seaweed liquid extract on growth and yield of Triticum aestivum var. Pusa Gold. *Journal of Applied Phycology* **23**, 251–255 (2011).
- Leustek, T., Martin, M. N., Bick, J.-A. & Davies, J. P. Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual review of plant biology* **51**, 141–165 (2000).
- Leustek, T. & Saito, K. Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiology* **120**, 637–644 (1999).
- Lewandowska, M. & Sirko, A. Recent advances in understanding plant response to sulfur-deficiency stress. *Acta Biochimica Polonica* **55**, 457–471 (2008).
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A. & Herrera-Estrella, L. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current opinion in plant biology* **6**, 280–287 (2003).
- Mancuso, S., Azzarello, E., Mugnai, S. & Briand, X. Marine bioactive substances (IPA extract) improve foliar ion uptake and water stress tolerance in potted Vitis vinifera plants. *Advances in Horticultural Science* **2**, 156–161 (2006).
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Yamaya, T. & Takahashi, H. Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signalling and regulation. *Journal of experimental botany* **55**, 1843–1849 (2004).





- Morot-Gaudry, J.-F., Moreau, F., Prat, R., Maurel, C. & Sentenac, H. *Biologie végétale: Nutrition et métabolisme-2e édition*. (Hachette, 2012).
- Mugnai, S., Azzarello, E., Pandolfi, C., Salamagne, S., Briand, X., Mancuso, S. 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 (2008).
- Nikiforova, V., Freitag, J., Adamik, M., Hesse, H., Hoefgen, R. Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *The Plant Journal* **33**, 633–650 (2003).
- Parmar, S., Buchner, P. & Hawkesford, M. J. Leaf developmental stage affects sulfate depletion and specific sulfate transporter expression during sulfur deprivation in *Brassica napus* L. *Plant Biology* **9**, 647–653 (2007).
- Prosser, I. M., Purves, J. V., Saker, L. R. & Clarkson, D. T. Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. *Journal of experimental botany* **52**, 113–121 (2001).
- Rasmussen, P. E., Ramig, R. E., Skin, L. G. & Rohde, C. R. Tissue analyses guidelines for diagnosing sulfur deficiency in white wheat. *Plant and Soil* **46**, 153–163 (1977).
- Rathore, S. S. *et al.* Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (<i>Glycine max</i>) under rainfed conditions. *South African Journal of Botany* **75**, 351–355 (2009).
- Rayorath, P., Chaudhary, D.R., Boricha, G.N., Ghosh, A., Bhatt, B.P., Zodape, S.T., Patolia, J.S. Rapid bioassays 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 (2008).
- Reuveny, Z., Dougall, D. K. & Trinity, P. M. Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **77**, 6670–6672 (1980).
- Rubio, V., Bustos, R., Irigoyen, M.L., Cardona-Lopez, X., Roja-Triana, M, Ares, P.J. Plant hormones and nutrient signaling. *Plant molecular biology* **69**, 361–373 (2009).
- SARDA, X., Diquelou, S., Abdallah, M., Nesi, N, Cantat, O., Le Gouee, P, Avice, J.C., Ourry, A. Assessment of sulphur deficiency in commercial oilseed rape crops from plant analysis. *The Journal of Agricultural Science* 1–18
- Scherer, H. W. Sulphur in crop production—invited paper. *European Journal of agronomy* **14**, 81–111 (2001).





Schung, E. Physiological functions and environmental relevance of sulfur-containing secondary meta-Таблица 2 bolites. *Sulfur nutrition and assimilation in higher plants: regulatory agricultural and environmental aspects.*—The Hauge: SPB Academic Publishing bv, The Hauque 179–190 (1993).

Shinmachi, F., Buchner, P., Stroud, J.L., Parmar, S., Zhao, F.J., McGrath, S.P., Hawkesford, M.J. Influence of sulfur deficiency on the expression of specific sulfate transporters and the distribution of sulfur, selenium, and molybdenum in wheat. *Plant physiology* **153**, 327–336 (2010).

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

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

Zhao, F. J., Hawkesford, M. J. & McGrath, S. P. Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. *Journal of Cereal Science* **30**, 1–17 (1999).

Zhao, F. J., Hawkesford, M. J., Warrilow, A. G. S., McGrath, S. P. & Clarkson, D. T. Responses of two wheat varieties to sulphur addition and diagnosis of sulphur deficiency. *Plant and soil* **181**, 317–327 (1996).

Sitographie :

CITEPA. Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique <http://www.citepa.org/fr/inventaires-etudes-et-formations/26-inventaires-d-emissions> (consulté le 03/04/2013)

UNIFA (2010). Eléments des bilans soufre et azote et indicateur d'efficacité de l'azote minéral sur blé tendre. <http://www.unifa.fr/fichiers/uploads/Rapport%20Bilans%20S%20et%20N%20et%20efficacité%20azote%20sur%20blé.pdf> (consulté le 17/04/2013)

ARVALIS (2013). Evaluer le risque de carence en soufre. <http://www.arvalis-infos.fr/evaluer-le-risque-de-carence-en-soufre-@/12302/view.jspz?obj=arvarticle&id=12302&syndtype=null&hasRedirected=true> (consulté le 37/03/2013)

Force A (2013) : Mesure et indicateurs. <http://www.force-a.eu/fr/mesure.html> (consulté le 22/08/2013)

