

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON  
ÉCOLE DOCTORALE ABIES

# THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

Présentée par

**PATRICIA MÉRIGOUT**

Soutenue le 23 novembre 2006

Étude du métabolisme de la plante en réponse à l'apport de différents  
fertilisants et adjuvants culturaux.  
Influence des phytohormones sur le métabolisme azoté.

## JURY

**Alain OURRY**  
**Nicolaus von WIRÉN**  
**Sylvie RECOUS**  
**Sylvain CHAILLOU**  
**Xavier BRIAND**  
**Françoise DANIEL-VEDELE**

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Tuteur industriel  
Directrice de thèse



# ABBREVIATIONS

## A

AA	Acides Aminés
AAT	Aspartate aminotransférase
ABA	Acide abscissique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AE	Extrait d'algue riche en auxines (EXT 1208)
AIA (IAA)	Acide indole-3-acétique
AL	Arginosuccinate lyase
AMT	Ammonium transporter
AN	Ammonium nitrate
ARF	Auxin response factor
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARR	Arabidopsis response regulator
AS	Ammonium sulfate
AS	Arginosuccinate synthetase
ASN	Asparagine synthétase
ATP	Adénosine triphosphate

## C

CATMA	Complete Arabidopsis transcriptome microarray
CIFRE	Convention industrielle de formation par la recherche
CL	Coïc-Lesaint
CTP	Cytosine triphosphate

## D

DW Dry weight

## E

EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
ERF	Ethylene responsive factor
EST	Expressed sequence tag
EXT	Extrait

## F

FAO	Food and agriculture organization
Fd	Ferrédoxine
FW	Fresh weight

## G

GA	Acide gibbérellique
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
GDH	Glutamate deshydrogénase
GOGAT	Glutamate synthase
GS	Glutamine synthétase
GST	Gene sequence tag
GTP	Guanosine triphosphate

## H

HAT	High affinity transporter
HPLC	High pression liquid chromatography

## I

IPT	Adénosine isopentenyltransférase
-----	----------------------------------

## L

LAT	Low affinity transporter
-----	--------------------------

## M

MIP	Membrane intrinsic protein
-----	----------------------------

## N

N	Azote
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADHP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NiR	Nitrite réductase
NIT	Nitrilase
NR	Nitrate réductase
NRT	Nitrate transporter
NUE	Nitrogen use efficiency
NUpE	Nitrogen uptake efficiency
NUtE	Nitrogen utilization efficiency

## O

OCT	Ornithine carbamyl transférase
-----	-----------------------------------

## P

PCR	Polymerase chain reaction
PF	Poids frais
PS	Poids sec

## R

RT	Reverse transcription
----	--------------------------

## S

S	Starvation (carence en azote)
---	-------------------------------

## T

TIP	Tonoplast intrinsic protein
-----	-----------------------------

## U

U	Urée
---	------



## AVANT-PROPOS

Les travaux décrits dans ce manuscrit ont été réalisés dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE) associant trois partenaires autour du projet de recherche: (i) la société BiotechMarine, implantée sur la côte nord de la Bretagne (Pontrieux, Côtes d'Armor), produit et commercialise des substances d'origine algale ainsi que des engrais azotés chimiques; (ii) le laboratoire de Nutrition Azotée des Plantes (NAP) à l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) de Versailles, où les expérimentations ont été effectuées; (iii) et moi-même, la doctorante.

**EN CONSÉQUENCE, LES RÉSULTATS PRÉSENTÉS DANS CE MÉMOIRE SONT SOUMIS À CONFIDENTIALITÉ.**



# INTRODUCTION

## I. Azote & agriculture.

### I.A. Le rôle essentiel de l'azote dans la fertilisation.

Une fertilisation adéquate est un préalable pour l'agriculture moderne afin de pouvoir satisfaire à de forts rendements et à une qualité optimale des récoltes. La grande majorité des éléments minéraux essentiels au développement de la plante, n'est nécessaire qu'en quantités infimes, qui peuvent être fournies par la plupart des sols sans suppléments. Cependant quelques éléments clés, que sont le phosphore (P), le potassium (K), le soufre (S) et l'azote (N), sont fréquemment en quantités insuffisantes dans le sol pour permettre la croissance optimale des cultures. Malgré son abondance, l'azote atmosphérique est inutilisable pour la plupart des plantes. Les seules plantes capables d'utiliser l'azote de l'air sont celles qui développent une symbiose avec des microorganismes au sein des nodosités sur les racines des plantes. À la différence du phosphore et du potassium, les plantes ont besoin d'importantes quantités d'azote, l'azote représentant 3 à 4% de leur matière sèche. En outre l'efficacité de la fertilisation azotée sur le rendement des cultures a contribué au développement d'une agriculture moderne de plus en plus gourmande en azote. En plus des charges lourdes occasionnées par ce poste de dépenses, l'apport massif d'engrais azotés initié au milieu du siècle dernier affecte le cycle naturel de l'azote (Figure 1), ce qui n'est pas sans conséquence sur l'environnement et la santé.

### I.B. Les conversions de l'azote et le problème du nitrate.

Le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et l'urée ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ) sont les formes d'engrais azotés les plus utilisées.

Le nitrate constitue la source d'azote majoritaire dans les sols (Marschner, 1995). Le nitrate est un ion chargé négativement, et ainsi, il n'est pas retenu par le complexe argilo-humique du sol, qui porte aussi une puissante charge négative. Très soluble, le nitrate apporté en excédent dans le sol, est entraîné par lessivage et contribue à la pollution des nappes phréatiques (Figure 1). Des fortes concentrations de nitrates dans les cours d'eau entraînent des





phénomènes d'eutrophisation, se traduisant par un important développement de microorganismes et d'algues, perturbant les équilibres écologiques naturels. La dénitrification est un autre processus de pertes de l'azote apporté au sol (Figure 1). Ainsi les bactéries du sol soumises à des conditions d'anaérobiose convertissent le nitrate en azote gazeux  $N_2$ . Sous certaines conditions (forte concentration en nitrate, sol acide), les produits finaux de la dénitrification sont les oxydes nitriques ( $N_2O$ ). Ces composés sont des gaz à fort « effet de serre » et sont aussi destructeurs de la couche d'ozone, provoquant d'importants dommages environnementaux. Aussi le nitrate fait-il l'objet de nombreux débats et est remis en question par les vives inquiétudes qu'il fait naître quant à son effet néfaste sur l'environnement et ses risques de toxicité pour l'homme. Aussi limiter l'excès de cet anion dans les sols et les végétaux est devenu l'un des enjeux majeurs de l'agriculture actuelle.

Contrairement au nitrate, l'ion ammonium est bien retenu par le sol grâce à la charge positive qu'il porte. Cependant une grande partie de l'ammonium apporté au sol est rapidement convertie en nitrate par les microorganismes du sol (nitrification, Figure 1). En outre, les ions ammonium qui pourraient être présents par exemple juste après fertilisation, sont sujets aux pertes dans l'atmosphère par le processus de volatilisation (Figure 1). L'ion ammonium est en équilibre chimique avec le gaz ammoniacal ( $NH_3$ ), et plus le sol est alcalin, plus l'équilibre se déplace vers l'ammoniac, et plus les pertes par volatilisation sont importantes.

L'urée est largement utilisée en pulvérisation foliaire mais aussi incorporée dans les sols, où elle est toutefois rapidement hydrolysée. Aussi, l'hydrolyse de l'urée en ammonium par les uréases du sol conduit à des pertes d'azote par volatilisation ammoniacale, et des inhibiteurs d'uréases sont couramment ajoutés aux engrais uréiques afin de limiter ce phénomène.

## II. Le métabolisme de l'azote chez les plantes.

Dans le sol, nitrate et ammonium sont les deux principales formes d'azote inorganique disponibles pour la plante (Raven et al., 1992). Dans les sols bien aérés, la nitrification est rapide: il en résulte une faible concentration en ammonium, et le nitrate est la principale source d'azote disponible pour les plantes. Dans les sols détrempés ou acides, l'ammonium s'accumule (Crawford & Forde, 2002). Les plantes non fixatrices de l'azote atmosphérique absorbent et assimilent ces deux formes d'azote anionique ( $NO_3^-$ ) et cationique ( $NH_4^+$ ). L'absorption du nitrate et de l'ammonium est prise en charge par des transporteurs au niveau



de la racine (NRT: nitrate transporter et AMT: ammonium transporter). Le nitrate est alors réduit en nitrite par la nitrate réductase (NR ; EC 1.6.6.1), puis en ammonium par la nitrite réductase (NiR; EC 1.7.7.1) dans les cellules racinaires, stocké dans les vacuoles, ou encore exporté vers le xylème pour rejoindre la partie feuillée où il sera réduit ou stocké. Contrairement au nitrate, l'ammonium est principalement assimilé dans les racines. L'ammonium est alors incorporé dans les acides aminés par la glutamine synthétase (GS; EC 6.3.1.2) et la glutamate synthase présente sous les deux formes Fd et NADH dépendantes (Fd-GOGAT; EC 1.4.7.1 et NADH-GOGAT; EC 1.4.1.14). L'ensemble de ces étapes de l'assimilation de l'azote est finement régulé et interagit avec d'autres voies métaboliques, notamment celle du carbone (Krapp & Truong, 2005).

## II.A. Absorption de l'azote minéral: nitrate et ammonium.

Selon le degré de minéralisation et de nitrification, les concentrations en nitrate et ammonium dans les sols sont très variables (quelques micromolaire à plusieurs millimolaire) (Marschner, 1995). Les plantes se sont adaptées et ont ainsi développé des systèmes spécifiques de transport de nitrate ou d'ammonium: un système de transport à haute affinité ou HATS pour High Affinity Transport System, et un système de transport à basse affinité ou LATS pour Low Affinity Transport System (Crawford & Forde, 2002). Par définition, les transporteurs de type HATS interviennent dans le transport d'azote présent en faible concentration dans le milieu ( $< 0,5$  mM), et les transporteurs de type LATS sont particulièrement actifs pour de fortes concentrations externes ( $> 0,5$  mM). Les protéines responsables de chacun de ces deux systèmes de transport appartiennent à une famille multigénique de transporteurs (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; von Wirén et al., 2000; Orsel et al., 2002), et sont finement régulées en fonction de la source d'azote disponible et du statut nutritionnel de la plante.

Les modalités du transport de l'urée chez les plantes sont beaucoup moins connues: elles seront développées dans la quatrième partie de cette introduction (IV.C.3.)



### II.A.1. Absorption du nitrate.

L'assimilation de l'azote du sol implique tout d'abord le franchissement de la membrane plasmique des cellules racinaires. Dans le cas du nitrate, le potentiel négatif de la membrane ainsi que le gradient de concentration ne permettent pas, en général, l'entrée passive du nitrate dans le cytoplasme, et un système de transport actif couplé à une H<sup>+</sup>/ATPase est donc nécessaire (Glass & Siddiqi, 1995). Les transporteurs de nitrate sont codés par deux familles de gènes: les gènes *NRT1* impliqués dans le transport à faible affinité et les gènes *NRT2* responsables du transport à haute affinité (Forde, 2000). Cette classification est toutefois simplifiée car le gène *AtNRT1.1* initialement identifié comme un transporteur de nitrate à basse affinité (Tsay et al., 1993), est également impliqué dans le transport à haute affinité (Liu et al., 1999; Liu et Tsay, 2003). Le séquençage complet d'Arabidopsis a révélé 52 gènes *NRT1* et 7 gènes *NRT2* (*NRT2.1-7*) (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Chez Arabidopsis, les premiers gènes de la famille NRT2 ont été isolés sur la base d'une forte induction par le nitrate par rapport à la glutamine (*AtNRT2.1*; Filleur & Daniel-Vedele, 1999), ou par leur homologie de séquence avec le transport à haute affinité pour le nitrate chez le champignon *Aspergillus nidulans* *CRNA* (*AtNRT2.1* et *AtNRT2.2*; Zhuo et al., 1999). Actuellement sept gènes appartenant à la famille NRT2, *AtNRT2.1* à *AtNRT2.7*, sont décrits (Orsel et al., 2002). Les transporteurs NRT2 d'Arabidopsis sont principalement exprimés dans la racine, excepté le gène *AtNRT2.7* qui est préférentiellement exprimé dans les feuilles. Deux autres gènes, *AtNRT2.3* et *AtNRT2.5*, sont aussi exprimés dans les parties aériennes. Le gène *AtNRT2.1* est le plus abondamment transcrit dans les racines (Orsel et al., 2002).

Les gènes *AtNRT1* constitue une famille de transporteur du nitrate beaucoup plus grande (52 membres) que les gènes *AtNRT2*. Le premier gène de la famille, *AtNRT1.1*, a été isolé grâce à un mutant d'insertion résistant au chlorate (*chl1*), analogue toxique structural du nitrate (Tsay et al., 1993). Les transporteurs *AtNRT1.1*, *AtNRT1.2* et *AtNRT1.4* sont les seuls transporteurs de nitrate de la famille *AtNRT1* à être caractérisés au niveau physiologique et confirmés comme étant des protéines contribuant au LATS (Tsay et al., 1993; Huang et al., 1996, 1999; Chiu et al., 2004). Le gène *AtNRT1.5* serait impliqué dans la sécrétion du nitrate au niveau du xylème (Canivenc, 2005). Le transporteur *AtNRT1.1* reste le plus étudié. Il est fortement exprimé dans les jeunes organes en formation, avec un possible rôle dans le développement de la plante et en particulier dans celui des racines primaires et secondaires (Guo et al., 2001). L'absorption du nitrate par les plantes est un processus fortement régulé tout d'abord par la disponibilité en substrat, mais aussi par le statut nutritionnel de la plante, coordonné avec les



fluctuations de son environnement physique. En effet, l'influx à haute affinité du nitrate est transitoirement augmenté lorsque les plantes sont mises en présence de nitrate (Daniel-Vedele et al., 1998; Crawford & Glass, 1998). Le gène *AtNRT1.1* est également inductible par le nitrate, et il est réprimé lors d'une période de carence en nitrate (Lejay et al., 1999). L'expression des gènes *AtNRT2.1*, *AtNRT2.4*, et *AtNRT2.5* est très fortement induite lorsque les plantes sont cultivées en conditions de nitrate limitant, alors que l'expression des gènes *AtNRT2.6* et *AtNRT2.7* semble beaucoup plus constitutive vis-à-vis du statut azoté des plantes (Orsel et al., 2002). L'ammonium interagit également avec les systèmes d'absorption du nitrate. A faible concentration, l'ammonium a un effet inducteur rapide (Bloom & Sukrapanna, 1990). Par contre, à concentration plus élevée, l'ammonium inhibe rapidement et réversiblement l'absorption du nitrate (Lee & Drew, 1989). Plus généralement, une régulation négative de type *feedback* serait imposée par les produits de l'assimilation de l'ammonium comme les acides aminés (Muller et al., 1995).

Le cycle jour/nuit constitue un autre niveau de régulation qui permet de coordonner l'absorption du nitrate avec la photosynthèse et le métabolisme carboné. L'absorption nette du nitrate augmente continuellement au cours de l'éclairement et décroît à l'obscurité (Lejay et al., 1999). Les glucides, produits de la photosynthèse, seraient les acteurs de cette régulation de l'absorption du nitrate (Delhon et al., 1996). L'addition de saccharose dans le milieu de culture au cours de la période nocturne induit notamment les gènes *AtNRT1.1* et *AtNRT2.1* (Lejay et al., 1999, 2003).

### II.A.2. Absorption de l'ammonium.

Le transport actif de l'ammonium chez *Arabidopsis* est assuré par un uniport d'ammonium voltage dépendant, piloté par la famille de transporteurs *AtAMT* (Ludewig et al., 2002). La complémentation fonctionnelle d'un mutant de levure déficient pour le transport de l'ammonium a permis d'identifier le premier gène *AMT1* de plante chez *Arabidopsis*: *AtAMT1.1* (Ninnemann et al., 1994). Depuis, l'analyse du séquençage complet du génome d'*Arabidopsis* a révélé cinq autres séquences homologues (Gazzarrini et al., 1999; Sohlenkamp et al., 2000). Les gènes *AtAMT1.1* à *AtAMT1.5* sont fortement homologues entre eux, et forment la sous-famille *AtAMT1* des transporteurs d'ammonium. Le gène *AtAMT2* se révèle plus proche des transporteurs d'ammonium des procaryotes que des transporteurs *AMT1* de plantes (Ludewig et al., 2001). Contrairement aux membres de la famille *AMT1*, le gène *AtAMT2* est préférentiellement exprimé dans la partie aérienne de la plante. Cette





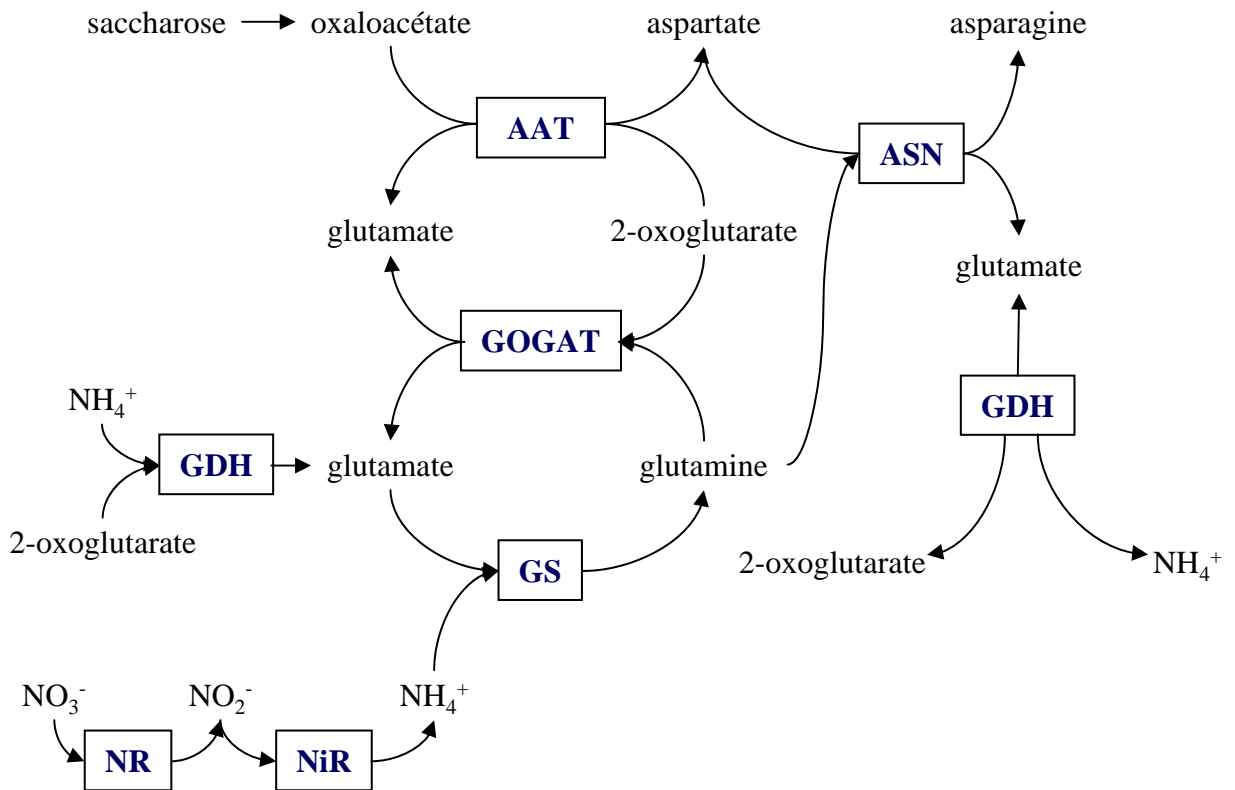
caractéristique laisse envisager un possible rôle de ce gène dans le recyclage de l'ammonium issu du métabolisme photorespiratoire (Sohlenkamp et al., 2002).

Le gène *AtAMT1.1* est fortement exprimé dans la racine, suggérant une contribution majoritaire de ce gène dans la capacité totale d'absorption de l'ammonium par la racine (Gazzarrini et al., 1999; Loqué & von Wirén, 2004). En outre, *AtAMT1.1* est le transporteur qui a le plus d'affinité pour son substrat (Loqué & von Wirén, 2004). *AtAMT1.1* est aussi fortement induit par la diminution des ressources azotées du milieu. De la même façon, le gène *AtAMT1.3* est rapidement induit par la carence en azote alors que les gènes *AtAMT1.2* et *AtAMT2.1* ne sont induits qu'après une longue période de carence (Gazzarrini et al., 1999; Sohlenkamp et al., 2000). Les mécanismes régulant le transport de l'ammonium par les AtAMTs en condition d'azote limitant sont encore mal connus. L'absorption d'ammonium serait principalement régulée par le statut azoté régnant localement autour de la racine, à la différence de la régulation par le statut azoté de la plante entière dans le cas de l'absorption du nitrate (Gansel et al., 2001). La glutamine exercerait aussi un rétro-contrôle négatif sur la transcription du gène *AtAMT1.1* (Rawat et al., 1999).

L'absorption d'ammonium par les racines varie aussi en fonction du rythme diurnal. Après une augmentation continue durant la période lumineuse, l'absorption de l'ammonium diminue à l'obscurité (Ourry et al., 1996; Gazzarrini et al., 1999). Ces variations diurnales sont corrélées avec le niveau d'expression des gènes *AtAMT1.2* et *AtAMT1.3*. Aussi, ces gènes seraient-ils plutôt impliqués dans l'absorption d'ammonium au cours de la période d'éclairement (Gazzarrini et al., 1999). Les photoassimilats seraient responsables de cette régulation au cours du cycle jour/nuit, comme nous l'avons déjà mentionné dans le cas de l'absorption du nitrate. L'ajout de saccharose en période nocturne inhibe la baisse des taux de transcrits des gènes *AtAMT1.1*, *AtAMT1.2* et *AtAMT1.3*, et maintient ainsi un influx d'ammonium comparable à celui mesuré au cours de la période lumineuse (Lejay et al., 2003).

## II.B. Réduction du nitrate en ammonium.

Le nitrate métaboliquement actif disponible dans le cytosol doit nécessairement être réduit en ammonium pour être assimilé. La réduction du nitrate est assurée par l'action successive de deux enzymes, la nitrate (NR) et la nitrite (NiR) réductase. Dans le cytosol, la NR catalyse la



**Figure 2. Voie d'assimilation de l'azote** (d'après Coruzzi, 2003).

GS, glutamine synthetase; GOGAT, glutamate synthase; AAT, aspartate aminotransferase; ASN, asparagine synthetase; GDH, glutamate dehydrogenase; NiR, nitrite reductase; NR, nitrate reductase.

réduction du nitrate en nitrite. Toxique, le nitrite est immédiatement transféré dans les plastes où il est pris en charge par la NiR et réduit en ammonium (Figure 2).

La NR est une enzyme soluble localisée dans le cytosol, qui nécessite deux électrons pour réduire le nitrate en nitrite. Le pouvoir réducteur nécessaire à la réaction est apporté par le NADH. Chez *A. thaliana*, la NR est codée par deux gènes, *NIA1* et *NIA2*, *NIA2* assurant 90% de l'activité totale de la NR (Cheng et al., 1988; Crawford et al., 1988; Wilkinson & Crawford, 1991).

La NiR est localisée dans le chloroplaste des feuilles et les plastes des racines (Kleinhofs & Warner, 1990), et le pouvoir réducteur est assuré par les ferrédoxines. Chez *Arabidopsis*, la NiR est codée par le gène *NII*.

L'ensemble de la voie de réduction du nitrate en ammonium est très contrôlé et s'illustre par une forte régulation des enzymes clés répondant à la fois aux stimuli externes et au statut interne des plantes. D'une part, l'accumulation du nitrite dans la cellule doit être empêchée. Et d'autre part, les métabolismes carboné et azoté doivent être coordonnés afin d'assurer le maintien du pouvoir réducteur et la production des acides organiques, accepteurs de l'ammonium pour la synthèse des acides aminés. Les deux étapes de la réduction du nitrate sont induites par le nitrate et rétro-contrôlées par les composés azotés réduits. En présence d'ammonium ou en condition de nitrate limitant, les niveaux d'expression des gènes *NIA* et la quantité de protéine NR sont faibles (Meyer & Stitt, 2001). Quelques heures de réinduction par le nitrate suffisent à augmenter le taux des transcrits des gènes *NIA* (Crawford, 1995).

Le rythme circadien régule également l'activité de la NR et de la NiR. L'expression des gènes *NIA* augmente au cours des premières heures d'illumination puis diminue en relation avec l'accumulation de glutamine au cours de la journée (Stitt et al., 2002). Le gène *NII* codant pour la NiR est régulé de la même façon que les gènes *NIA*.

### II.C. Incorporation de l'ammonium dans les acides aminés.

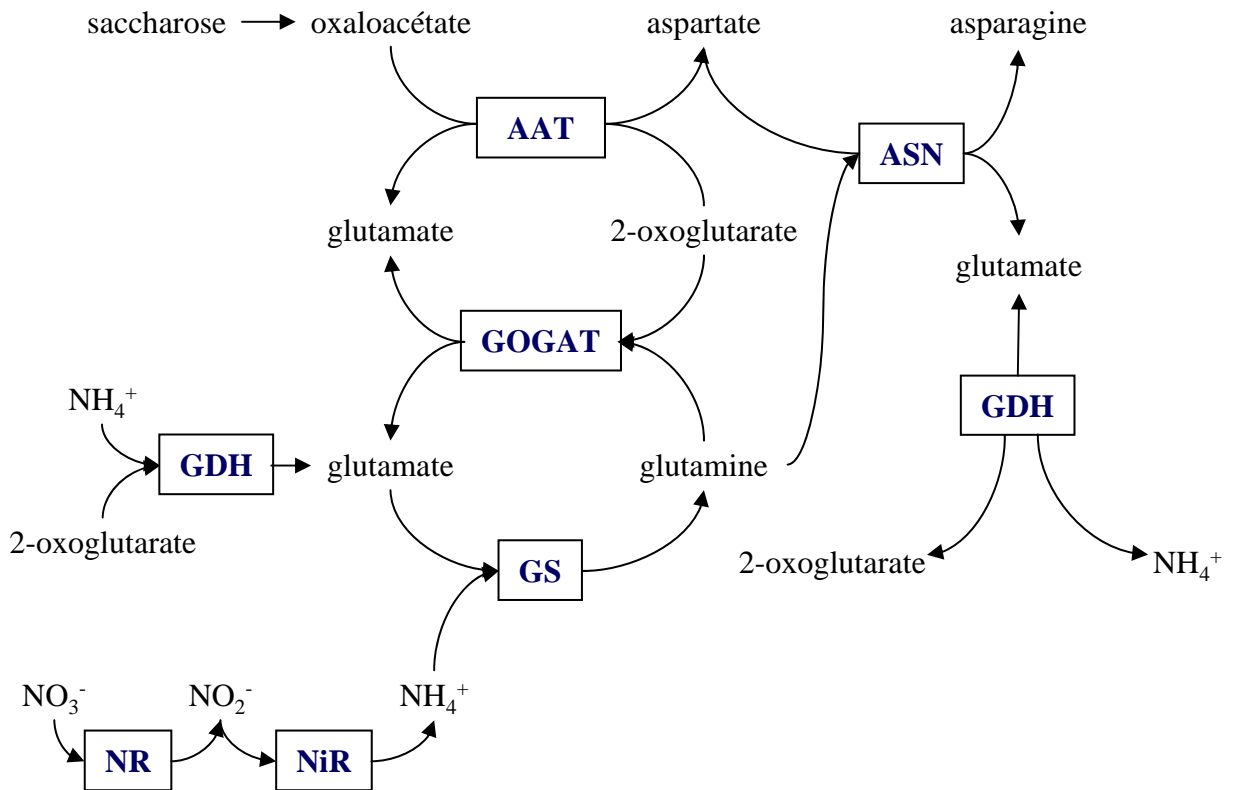
L'ammonium est indispensable car il constitue l'élément clé du passage entre l'azote inorganique et l'azote organique et inversement. L'absorption de l'ammonium du sol par les racines (cf I.A.2.) et la réduction du nitrate par la NR et la NiR (cf II.B.) ne sont pas les seules sources d'ammonium pour la plante. Le processus de photorespiration ainsi que le



catabolisme de certains acides aminés comme l'asparagine en particulier, ou d'autres composés riches en azote (uréides par exemple), constituent également un apport non négligeable. Néanmoins, quelle que soit son origine, l'ammonium, toxique pour la plante, doit être immédiatement réassimilé. Les trois enzymes glutamine synthétase (GS), glutamate synthase (GOGAT), et glutamate déshydrogénase (GDH) sont les principaux acteurs des processus d'assimilation de l'ammonium issu de l'absorption racinaire ou 'assimilation primaire' et de sa réassimilation dans la plante (Figure 2).

L'ammonium est incorporé dans les acides aminés par l'action combinée de la GS ATP-dépendante et de la GOGAT au cours du cycle GS/GOGAT. L'ion ammonium est incorporé au glutamate par la GS pour former la glutamine. Le groupement amide de la glutamine est alors transféré à l' $\alpha$ -cétoglutarate par la GOGAT. Deux molécules de glutamate sont ainsi formées, l'une étant recyclée pour la formation de glutamine, l'autre utilisée pour la synthèse des acides aminés (Hirel & Lea, 2001; Mifflin & Habash, 2002; Figure 2). Glutamine et glutamate sont les premières sources d'azote réduit dans la cellule, et peuvent alors être utilisés pour former aspartate et asparagine via les deux enzymes aspartate aminotransférase (AAT) et asparagine synthétase (ASN) (Figure 2), ainsi que les autres acides aminés et molécules azotées. Glutamine, glutamate, aspartate et asparagine, assurent alors la translocation de l'azote inorganique des organes source vers les organes puits (Peoples & Gifford, 1993).

Deux isoformes de **glutamine synthétase (GS)** existent, aux rôles et localisations différents. La GS1 cytoplasmique est présente principalement dans les racines et plus généralement les tissus non-photosynthétiques. La GS2 est majoritaire dans les tissus photosynthétiques, en particulier les feuilles jeunes, et est localisée dans le chloroplaste. Cette distribution organe spécifique suggère un rôle prépondérant de la GS2 dans l'assimilation de l'ammonium issu de la réduction du nitrate dans les chloroplastes et/ou dans la réassimilation de l'ammonium photorespiratoire. Quant à la GS1, elle interviendrait surtout pour l'assimilation de l'azote dans les racines (pour revue, voir Coruzzi, 2003). Chez *Arabidopsis*, cinq gènes codant pour la forme cytosolique de la GS (*GLN1.1* à *GLN1.5*) et un seul gène codant pour la forme chloroplastique (*GLN2*) ont été identifiés. Les gènes *GLN1.4* et *GLN1.5* restent toutefois putatifs car l'activité des protéines *GLN1.4* et *GLN1.5* n'a pas été démontrée. *GLN1.4* et *GLN1.5* seraient respectivement induits lors de la sénescence foliaire (Pourtau et al., 2006) et la germination des graines. L'expression de *GLN2* est uniquement détectable dans les feuilles vertes et *GLN1.1*, *GLN1.2*, *GLN1.3* sont préférentiellement exprimés dans les racines et les



**Figure 2. Voie d'assimilation de l'azote** (d'après Coruzzi, 2003).

GS, glutamine synthetase; GOGAT, glutamate synthase; AAT, aspartate aminotransferase; ASN, asparagine synthetase; GDH, glutamate dehydrogenase; NiR, nitrite reductase; NR, nitrate reductase.

feuilles sénescents (Bernhard & Matile, 1994; Peterman & Goodman, 1991). Les taux de transcrits de la GS sont régulés par la lumière, le carbone, et les métabolites azotés (Oliveira & Coruzzi, 1999). L'expression de la GS est en particulier induite par la lumière et le saccharose, et réprimée par des applications de glutamate ou glutamine.

Deux types de **glutamate synthase (GOGAT)** existent, localisées dans le chloroplaste, qui se distinguent par le donneur d'électrons, ferrédoxine (Fd-GOGAT) ou NADH (NADH-GOGAT) (Hirel & Lea, 2001). La Fd-GOGAT est prépondérante dans les feuilles photosynthétiques, assurant 95% de l'activité GOGAT, alors que la NADH-GOGAT est surtout active dans les tissus non photosynthétiques comme les racines. Ces localisations tissulaires suggèrent un rôle prépondérant de la Fd-GOGAT dans l'assimilation primaire de l'ammonium alors que la NADH-GOGAT serait plus spécifiquement impliquée dans les processus de réassimilation de l'ammonium photorespiratoire (pour revue, voir Coruzzi, 2003). Chez *Arabidopsis*, deux gènes codent pour la Fd-GOGAT (*GLU1* et *GLU2*) (Coschigano et al., 1998), et un seul pour la NADH-GOGAT (*GLT1*). *GLU1* est exprimé majoritairement dans les feuilles et est régulé par la lumière, alors que *GLU2* est d'abord exprimé dans les racines. *GLT1* est constitutif, faiblement exprimé dans les feuilles mais fortement dans les racines (Coruzzi, 2003).

**La glutamate déshydrogénase (GDH)** est un enzyme qui catalyse la conversion du glutamate en ammonium et  $\alpha$ -cétoglutarate ainsi que la réaction inverse, c'est-à-dire l'amination de l' $\alpha$ -cétoglutarate (Figure 2) (Aubert et al., 2001). Deux formes majeures de GDH ont été décrites : une forme à NADH dépendante dans les mitochondries et une forme à NADPH dépendante dans les chloroplastes (Melo-Oliveira et al., 1996). *Arabidopsis* possède deux gènes pour la GDH : *GDH1* et *GDH2*. Un troisième gène putatif *GDH3* a été récemment identifié par homologie de séquence. Au niveau transcriptionnel, les gènes *GDH* sont régulés négativement par les sucres et positivement par l'ammonium, contrairement aux gènes *GS*. L'enzyme GDH est abondant dans les différents organes de la plante et son activité élevée mais son rôle physiologique reste encore très débattu (Dubois et al., 2003). Le rôle majeur de la GDH serait la désamination du glutamate pour fournir énergie et squelettes carbonés (Mifflin & Habash, 2002; Masclaux-Daubresse et al., 2006).

**L'aspartate aminotransférase (AAT)**, enzyme phosphate-dépendant, catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé du glutamate vers l'oxaloacétate pour former l'aspartate et l' $\alpha$ -cétoglutarate (Figure 2). Cinq gènes codant différents isoenzymes ont été décrits chez *Arabidopsis*, *ASPI-5* (Schultz & Coruzzi, 1995; Wilkie et al., 1995). *ASPI* code pour





l'enzyme mitochondrial AAT1, *ASP2* et *ASP4* codent pour des isoenzymes cytosoliques, *ASP5* code pour l'enzyme chloroplastique AAT3, et *ASP3* code pour un isoenzyme putatif du péroxysome. AAT2 et AAT3 sont les formes majoritaires (Coruzzi, 2003). AAT2 assure la synthèse des pools d'aspartate à la lumière, qui sont utilisés pour la synthèse de l'asparagine à l'obscurité (Coruzzi, 2003). AAT2 jouerait aussi un rôle important dans le transport de l'azote jusqu'au silique (Miesak & Coruzzi, 2002).

**L'asparagine synthétase (ASN)** catalyse le transfert ATP-dépendant d'un groupe aminé de la glutamine vers une molécule d'aspartate pour former glutamate et asparagine (Figure 2). Même si l'ammonium est un substrat potentiel, la glutamine est le substrat privilégié de l'ASN chez la majorité des plantes supérieures (Sieciechowicz et al., 1988). L'asparagine a été le premier acide aminé découvert et, comparé à la glutamine, l'asparagine est relativement inerte et transporte plus d'azote par carbone. Ainsi l'asparagine assure le stockage de l'azote et le transport à longue distance de l'azote par le phloème chez les plantes supérieures. Trois gènes codant pour l'ASN ont été décrits chez *A. thaliana* : *ASN1*, *ASN2*, et *ASN3*. *ASN1* est majoritairement exprimé chez les jeunes plantules. L'expression de *ASN3* est très faible, et *ASN1* et *ASN2* sont réciproquement régulés par la lumière et les métabolites. Ces différences d'expression suggèrent des rôles distincts pour ces trois gènes (Lam et al., 1998). La transcription du gène *ASN1* est notamment induite chez les plantes cultivées à l'obscurité, et inhibée par la lumière. C'est exactement l'inverse pour *ASN2*. Le niveau d'expression de *ASN1* est très finement corrélé avec les taux d'asparagine libre (Lam et al., 1994, 1998, 2003). *ASN1* régulerait les taux d'asparagine libre synthétisée chez *Arabidopsis*. Métabolisme de l'ammonium et expression de *ASN2* sont corrélés, suggérant un rôle important de *ASN2* dans le métabolisme de l'ammonium chez *Arabidopsis* (Wong et al., 2004).

Glutamate et glutamine constituent les premières sources d'azote réduit dans la cellule. Par transamination, l'azote est ensuite transféré à d'autres substrats carbonés (acides  $\alpha$ -cétoniques) pour former de nouveaux acides aminés (aspartate, alanine, glycine ...), eux-mêmes précurseurs de tous les autres acides aminés. Les acides aminés synthétisés peuvent aussitôt contribuer à la biosynthèse des protéines, ou être transitoirement stockés dans les vacuoles, ou transportés vers d'autres tissus.



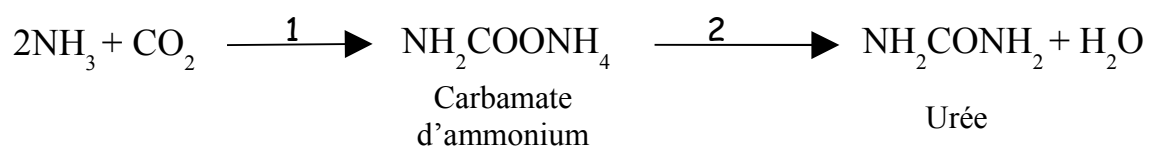
### III. Azote, urée & agriculture.

L'urée ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ) est un diamide d'acide carbonique. C'est un composé cristallin blanc, soluble dans l'eau, avec un poids moléculaire de 60,06, un point de fusion de  $132,7^\circ\text{C}$  et un contenu en azote de 46,6%. L'urée est la forme d'engrais azoté la plus utilisée dans le monde. Répandue sur les champs par pulvérisation foliaire, l'urée est aussi incorporée dans les sols, seule ou en combinaison avec d'autres engrais azotés.

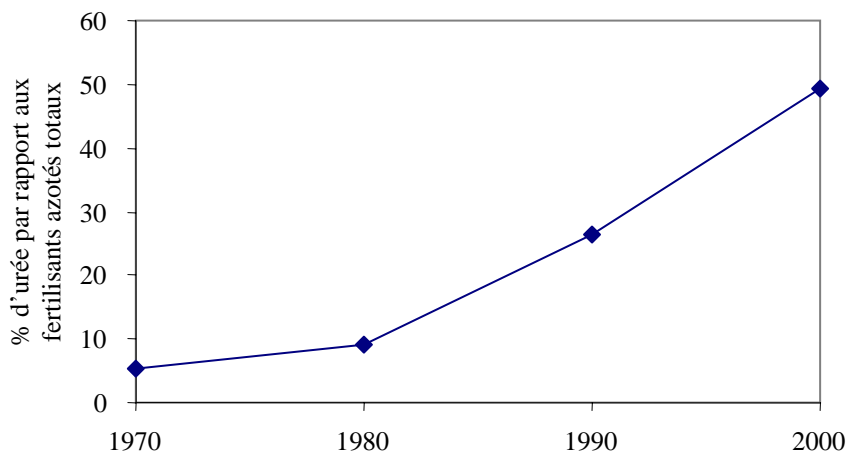
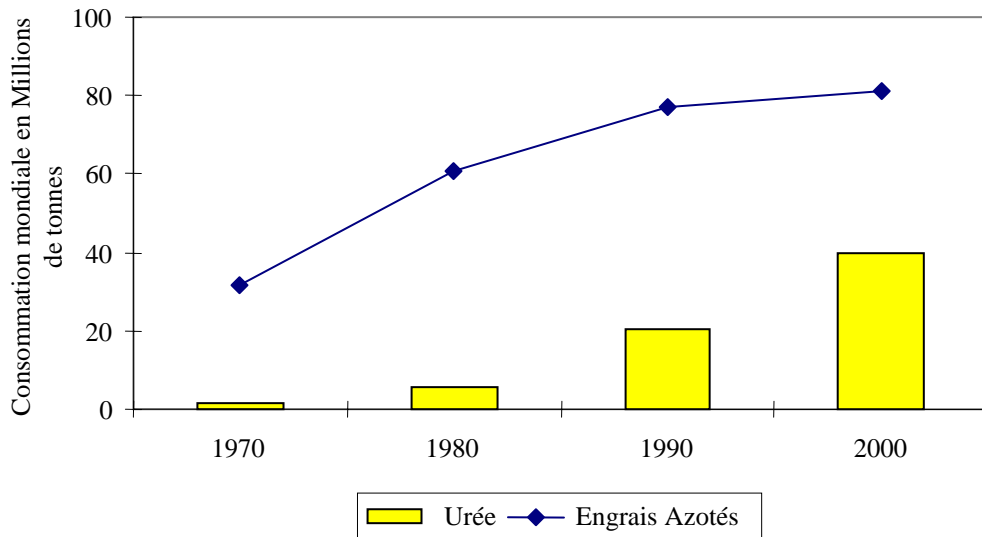
#### III.A. Le procédé de fabrication de l'urée.

La préparation de l'urée repose sur la méthode découverte par Bassarov en 1870 (Bellia, 1966). Cette méthode est basée sur la déshydratation, sous température et pression élevées, du carbamate d'ammonium, obtenu par synthèse directe à partir d'ammoniac et de dioxyde de carbone. Des améliorations successives du procédé basé sur cette réaction, ont suivi et ont été utilisées pour la première fois à des fins commerciales, par I.G. Farbenindustrie en Allemagne, en 1920. La production d'urée à l'échelle industrielle n'émergea que dans les années 1950, et a nécessité des améliorations de qualité et coût de production.

La fabrication industrielle de l'urée se déroule en deux étapes sous une forte pression.



La première réaction est rapide, exothermique et totale (140 à 250 bar,  $180^\circ\text{C}$ ), et conduit à la formation de carbamate d'ammonium. La décomposition thermique du carbamate en urée est plus lente, endothermique et la conversion est de l'ordre de 50 à 80%. L'urée obtenue se présente sous forme de solution aqueuse d'une concentration d'environ 70 à 80% que l'on transforme par évaporation sous vide de l'eau en une masse se prêtant au pompage (urée fondue). La transformation suivante donne un engrais granulé. Elle consiste soit en un prillage, procédé où les gouttelettes d'urée se solidifient dans un courant d'air ascendant lors



**Figure 3. Evolution de la consommation mondiale des engrais azotés et de l'urée (Données FAOSTAT, année 2005 ).**

de leur chute à l'intérieur de la tour de prillage, soit en une granulation de l'urée fondue sur des disques rotatifs ou autres dispositifs à refroidissement.

### **III.B. Données économiques.**

#### **III.B.1. Production.**

Les principales régions productrices d'urée sont la Russie, le Canada et l'Arabie Saoudite. D'autres producteurs du Moyen-Orient sont aussi importants (Iran et Iraq, du moins avant la guerre du Golfe) (Glibert et al., 2006). La production d'urée au Moyen-Orient n'a cessé de croître depuis les années 1980, passant de 2 millions de tonnes par an en 1980 à 10 millions de tonnes par an en 2000. En Chine la production d'urée a triplé entre 1989 et 1999. Depuis 2000, de nombreux pays d'Amérique Latine ont augmenté leur production de plus de 25% (Glibert et al., 2006).

#### **III.B.2. Consommation.**

Jusque dans les années 1960, l'urée représentait seulement 5% de la consommation mondiale d'engrais azotés. Les années 1980 ont vu une accélération de l'utilisation d'urée telle que l'urée représentait 40% des engrais azotés totaux au début des années 1990. Aujourd'hui l'urée représente le fertilisant azoté le plus utilisé dans le monde (Figure 3).

La Chine et l'Inde représentent environ la moitié de la consommation globale, et ont doublé leur consommation d'urée lors de la dernière décennie. Les Etats-Unis et le Canada représentent environ 20% du marché global de l'urée (Glibert et al., 2006). En France la consommation d'urée reste très faible (0,2 millions de tonnes en 2000 ce qui représente 0,5% de la consommation mondiale, FAOSTAT 2005)

### **III.C. Efficacité de l'urée en tant que fertilisant azoté.**

Les propriétés de l'urée en font un fertilisant azoté de choix. Sa richesse en azote est intéressante d'un point de vue économique: de moindres quantités sont utilisées ce qui permet de réduire les coûts. C'est une molécule non polaire fortement soluble, idéale pour un usage

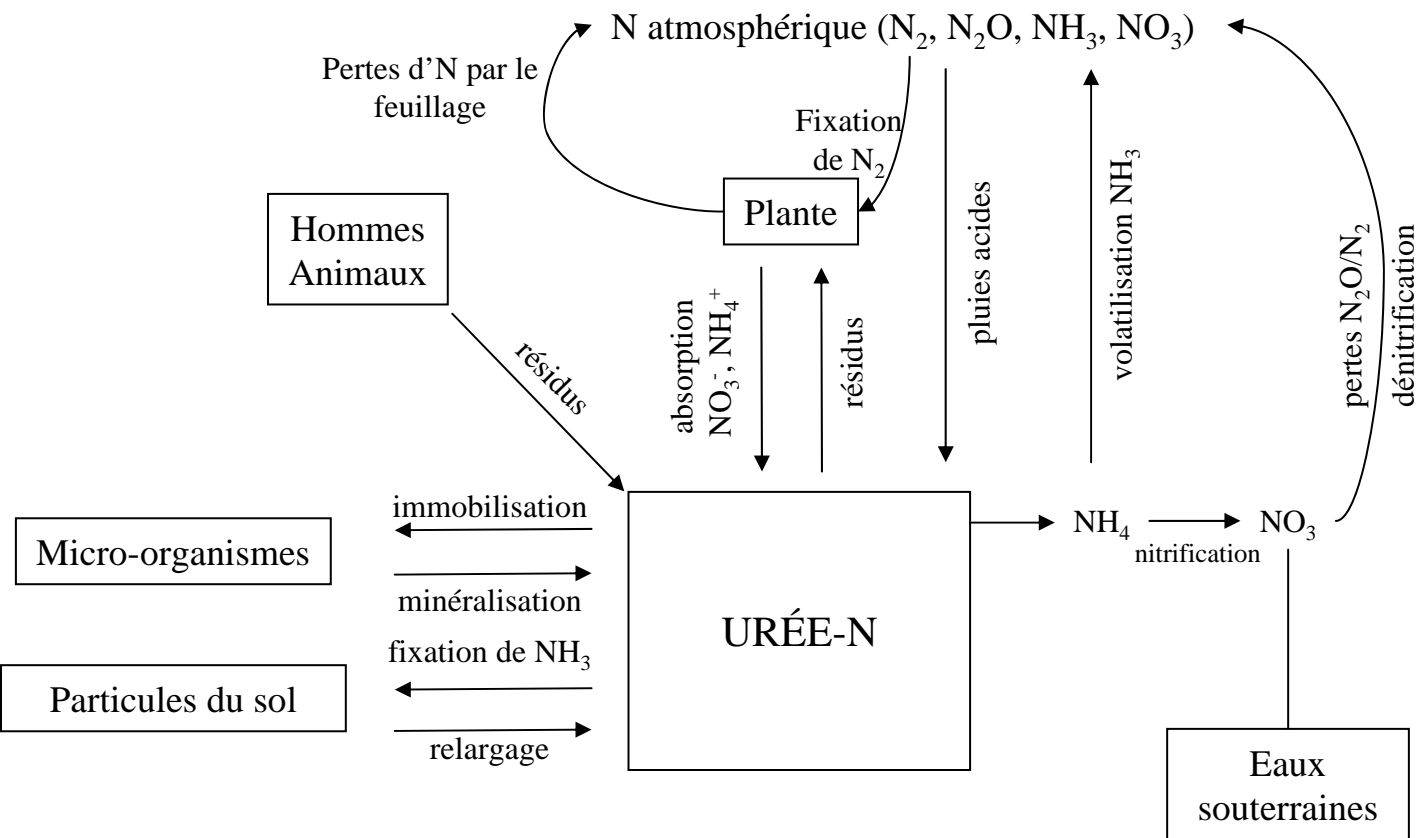


Figure 4. Dynamique de l'urée dans le sol (d'après Prasad, 1998).

en pulvérisation foliaire, de même qu'en mélange avec d'autres composés fertilisants, pesticides ou herbicides. L'urée a été utilisée pour la première fois en tant qu'engrais azoté en 1935, mais une certaine perplexité quant à son efficacité née de résultats anciens contradictoires, subsiste dans l'opinion agricole, ce qui a limité son utilisation jusque dans les années 1960 (Gould et al., 1986). En effet, l'urée est sujette à différents mécanismes de pertes d'azote, comme la volatilisation ammoniacale, le lessivage ou la dénitrification (Figure 4). L'ammoniac qui émane de l'urée apportée au champ contribue aux pluies acides, tandis que les nitrates produits dans le sol, contribuent non seulement à la contamination des eaux souterraines par lessivage, mais aussi à la destruction de la couche d'ozone, par la formation d'oxyde nitrique selon le processus de dénitrification. L'accumulation de nitrite dans le sol suite à l'hydrolyse de l'urée peut aussi entraîner toxicité et pertes d'azote. Le biuret (dimère de l'urée), en faible concentration dans l'urée, est phytotoxique sous certaines conditions. Ces différents problèmes sont aujourd'hui en majorité minimisés grâce aux nouvelles technologies et évolutions des procédés de fertilisation.

### III.C.1. Pertes d'ammoniac et toxicité de l'ammoniac.

La volatilisation d'ammoniac est due à la rapidité d'hydrolyse de l'urée en ammoniac et dioxyde de carbone par les uréases du sol. Il en résulte une augmentation du pH, qui, combinée à la production d'ion ammonium, conduit à l'accumulation d'ammoniac. Les ions ammonium sont en équilibre avec les gaz d'ammoniac en solution aqueuse et, à pH alcalin, la forme ammoniac libre est prédominante. Si l'ammonium est relativement inoffensif, l'ammoniac est très toxique et entraîne de sérieux dommages sur la germination des graines et la croissance des plantules (Bremner & Krogmeier, 1989). En outre, le pH alcalin couplé avec la forte concentration d'ions ammonium, sont des conditions favorisant la volatilisation ammoniacale. Les pertes d'azote issu de l'urée par volatilisation ammoniacale dépendent de plusieurs facteurs: elles sont favorisées dans les sols à pH élevé, avec un faible pouvoir tampon, et par les fortes températures.

La volatilisation ammoniacale est le principal problème lié à l'utilisation de l'urée en tant que fertilisant (Court et al., 1964). Les recherches se sont donc attachées à trouver une méthode efficace et économique afin de contrôler l'évolution de l'urée en ammoniac. L'un des moyens consiste à incorporer l'urée dans le sol. Cependant, cette pratique agricole se limite aux épandages précoces d'engrais, lors du semis par exemple. Les particules d'urée peuvent aussi





être recouvertes de soufre qui ralentit la dissolution du granule d'urée (Rao, 1987). Néanmoins, l'approche couramment utilisée afin de remédier au problème de volatilisation ammoniacale, consiste à trouver des composés qui inhibent l'hydrolyse de l'urée. Beaucoup de composés ont été proposés comme des inhibiteurs d'uréases potentiels. Les hydroamates, les composés soufrés hétérocycliques, les xanthates, les quinones et les phosphoroamides en sont quelques exemples. Plus récemment, Reddy & Sharma (2000) ont démontré l'efficacité des additifs chimiques comme le pyrite ( $\text{FeS}_2$ ), le chlorure de potassium (KCl) ou le sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ). Ces additifs ont l'avantage d'être moins onéreux que les inhibiteurs d'uréases. Ils permettent aussi l'enrichissement du sol en éléments nutritifs essentiels que sont le soufre, le fer, le potassium, le cuivre, et le sulfate.

### III.C.2. Accumulation de nitrite.

Le pH alcalin et les fortes concentrations en ions ammonium suite à l'hydrolyse de l'urée inhibent l'oxydation du nitrite en nitrate par les bactéries *Nitrobacter*. Par contre, les bactéries *Nitrosomonas* responsables de l'oxydation de l'ammonium en nitrite, sont beaucoup moins sensibles aux sels d'ammonium en conditions alcalines. Ainsi, les sols fertilisés avec les engrais uréiques ont tendance à accumuler du nitrite, toxique pour la plante. L'accumulation de nitrite conduit aussi à des pertes d'azote gazeux par dénitrification chimique ainsi qu'à la contamination en nitrite des nappes préhatiques.

Les inhibiteurs de nitrification associés avec l'application d'urée sur les sols permettent de réduire considérablement l'accumulation de nitrite, et retardent également la formation du nitrate. Cependant l'utilisation des inhibiteurs de nitrification peut également amplifier le phénomène de pertes d'azote uréique sous la forme d'ammoniac. Aussi est-il préférable d'ajouter des inhibiteurs d'uréase aux fertilisants uréiques. En effet, ceux-ci retardant considérablement l'hydrolyse de l'urée, limitent voire éliminent l'accumulation de nitrite dans les sols fertilisés avec de l'urée.

### III.C.3. Toxicité du Biuret.

Le biuret, le dimère de l'urée, se forme lors de la décomposition thermique de l'urée au cours du prillage et de la granulation de l'urée. Le biuret interfère avec la synthèse des protéines



chez les plantes (Webster et al., 1957), et ses effets phytotoxiques interviennent lorsqu'il représente au moins 1% de l'urée. Aussi le biuret est-il un faux problème, la plupart des fertilisants azotés commercialisés en contenant moins de 1% (Gould et al., 1986).

#### III.C.4. Immobilisation de l'azote de l'urée.

Dès l'apport d'engrais azoté dans le sol, une compétition s'engage entre les micro-organismes du sol et la culture pour la consommation de cet azote. La réorganisation correspond au processus par lequel les micro-organismes du sol assimilent l'azote pour leurs propres besoins de renouvellement et de croissance. La réorganisation est d'autant plus importante que le sol a une forte activité biologique. Elle ne doit pas être considérée comme une perte pour le système sol plante, mais elle représente une immobilisation de l'engrais dans le compartiment organique du sol. L'urée n'est pas sujette à une réorganisation spécifique, mais elle est plutôt immobilisée via la réaction biologique entre forme ammoniacale et micro-organismes (Recous, 1987; Le Souder & Taureau, 1997).

#### III.C.5. Fertilisation foliaire d'urée.

L'apport d'azote aux cultures par pulvérisation foliaire s'est développé au cours des années 50, notamment parce que cette méthode apporte des avantages par rapport à des stratégies plus 'classiques' comme les apports d'azote au sol. Le faible indice de salinité de l'urée en fait la forme d'azote privilégiée pour cette pratique agricole (la dessiccation des cellules par phénomène d'osmose est réduite) (Laurent et al., 1998).

La fourniture d'urée via le couvert végétal permet de réduire les pertes d'azote engendrées par le lessivage du nitrate lors d'une application au sol. La pulvérisation d'urée représente également une alternative efficace de nutrition azotée, afin de pallier les éventuelles difficultés d'absorption par voie racinaire, rencontrées en cas de sécheresse par exemple (Gooding & Davies, 1992). Cependant des brûlures du feuillage apparaissent souvent suite à la pulvérisation d'urée. Ces symptômes de phytotoxicité sont d'autant plus sévères que la température est forte et l'humidité faible, et que la solution d'urée pulvérisée est concentrée (Witte, 2001). Ces nécroses ont d'abord été attribuées à la formation de quantités toxiques d'ammonium issu de l'hydrolyse de l'urée par les uréases des cellules foliaires (Hinsvark et



al., 1953). Des études plus récentes montrent que les brûlures foliaires sont plutôt causées par l'accumulation d'urée toxique par elle-même (Krogmeier et al., 1989). D'autres effets indésirables sont générés par pulvérisation comme la phytotoxicité de l'ammoniac dissous issu de l'hydrolyse de l'urée. En plus de ces symptômes visuels de phytotoxicité, la pulvérisation foliaire d'urée engendre des interférences avec le métabolisme de la plante. Afin d'assurer l'assimilation de l'urée en acides aminés, la plante doit dépenser beaucoup d'énergie (6,5 g de glucose sont nécessaires pour convertir 1 g d'urée), ce qui aboutit à des chutes de rendements (Laurent et al., 1998). L'action des uréases foliaires génère aussi des pertes d'azote par volatilisation ammoniacale qui n'excèdent pas 30%, et qui sont encore bien moindres de façon générale (Witte, 2001). Toutefois l'essentiel des pertes par voie gazeuse a lieu après que l'urée a atteint le sol.

#### IV. Urée: aspects biochimiques & moléculaires.

##### IV.A. La dégradation de l'urée.

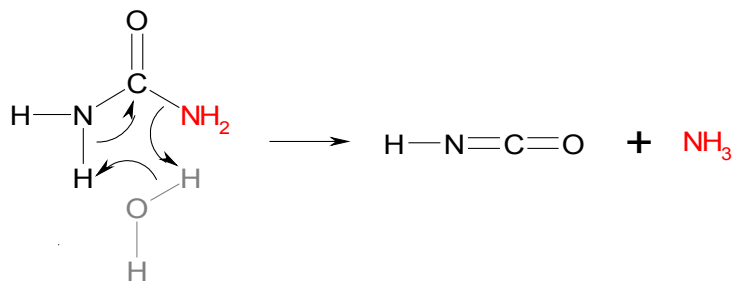
###### IV.A.1. Historique de la découverte de l'urée et de l'uréase.

Les découvertes de l'urée puis de l'uréase ont joué un rôle historique dans l'histoire de la chimie organique. L'isolement de l'urée issue de l'urine humaine est attribué au chimiste français Hillaire-Marine Rouelle en 1773. En 1828, le chimiste allemand Friedrich Wöhler synthétisa l'urée de manière un peu fortuite. En effet, Wöhler traita du cyanate d'argent avec une solution de chlorure d'ammonium, en espérant obtenir du cyanate d'ammonium. Une nouvelle substance cristalline blanche a été obtenue, qui s'est avérée de même formule élémentaire ( $\text{CH}_4\text{ON}_2$ ) que celle du cyanate d'ammonium recherché. D'autres propriétés ont prouvé que le produit obtenu n'était pas du cyanate d'ammonium, mais qu'il était identique à l'urée contenue dans les urines animales. La première molécule organique, l'urée, venait d'être créée, à partir de composés inorganiques: la chimie organique venait de naître. En 1926, James Batcheller Sumner prouva que les enzymes sont des protéines en achevant la première cristallisation d'une enzyme, l'uréase du haricot sabre (jackbean, *Canavalia*



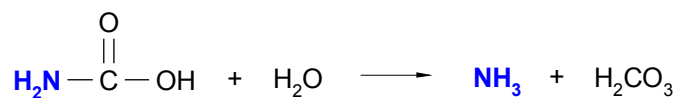
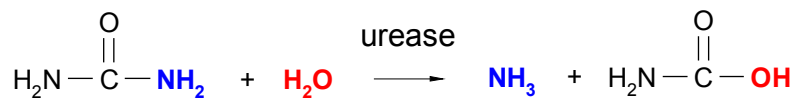
*ensiformis*). En 1975, Dixon et collaborateurs ont découvert que l'uréase contenait du nickel (Ni), élément indispensable à son activité. Aujourd'hui, l'uréase est encore le seul enzyme connu pour contenir du nickel chez les plantes supérieures.

#### IV.A.2. Dégradation non enzymatique de l'urée.

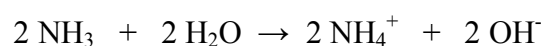


L'urée est une molécule très stable. La dégradation s'opère lentement en milieu aqueux (la demi-vie de l'urée est de 3,6 ans à 38°C et pour un pH compris entre 2 et 12). Le processus de dégradation consiste en une élimination conduisant à la formation d'acide cyanique et d'ammoniac.

#### IV.A.3. Dégradation enzymatique de l'urée.



La dégradation enzymatique de l'urée est  $10^{14}$  fois plus rapide que la dégradation non enzymatique. L'enzyme uréase (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammoniac et carbamate, qui est alors spontanément hydrolysé pour former une molécule d'acide carbonique ainsi qu'une seconde molécule d'ammoniac.







L'acide carbonique se dissocie à pH physiologique, et les molécules d'ammoniac s'équilibrent alors avec l'eau pour être protonées. Il en résulte une nette augmentation du pH.

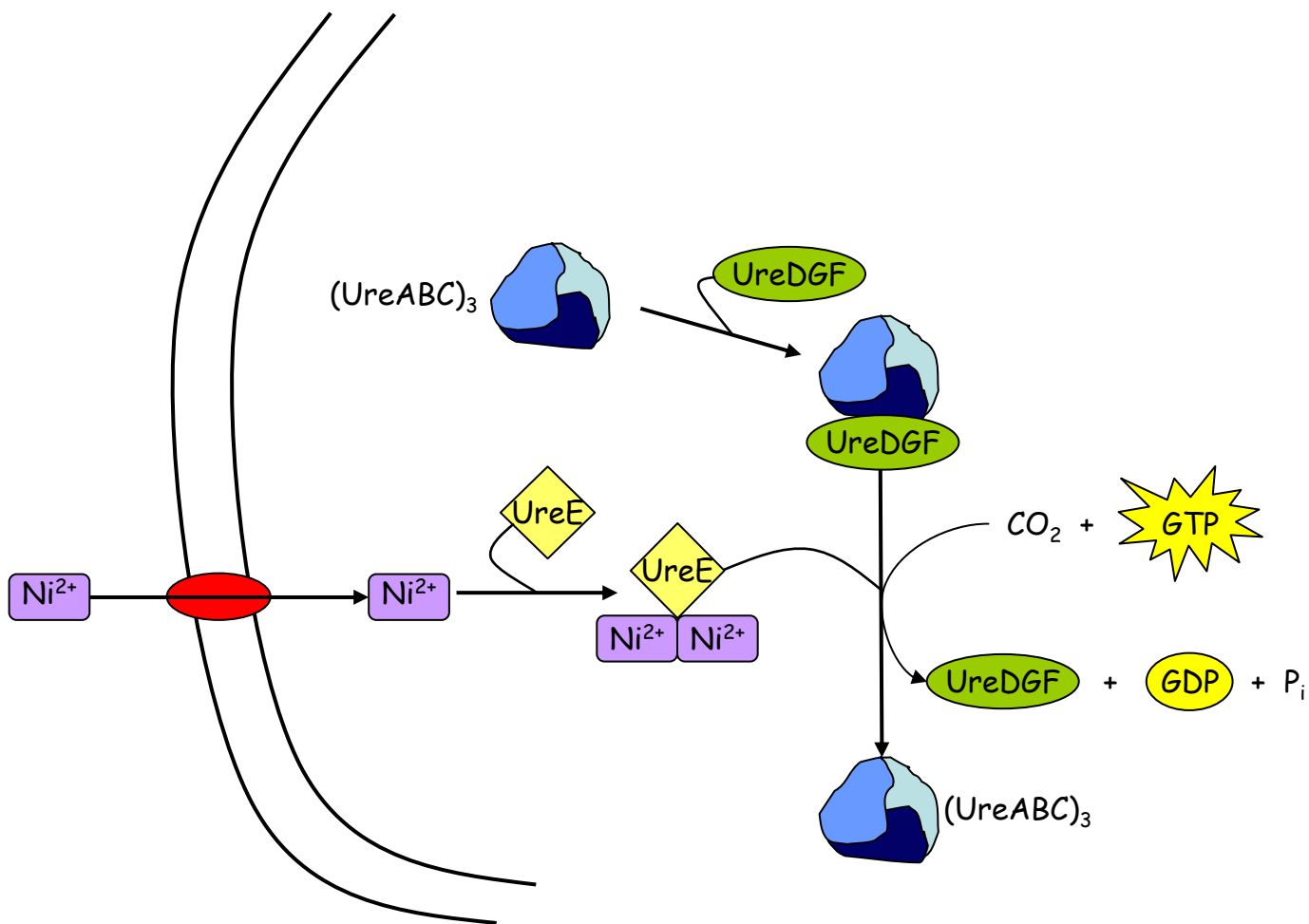
#### **IV.B. Les uréases.**

D'énormes quantités d'urée issues de la détoxification des composés azotés par l'homme et l'animal, sont constamment rejetées naturellement dans l'environnement. L'essor de la production et de l'application des engrais à base d'urée constitue une autre voie principale d'entrée de l'urée dans l'environnement. Cependant, l'urée ainsi générée est prise en charge par d'autres processus métaboliques impliquant l'enzyme uréase, et n'a donc souvent qu'une durée de vie très courte. L'uréase est un enzyme dépendant du nickel, répandu chez la majorité des organismes. Une activité uréase est observée chez les procaryotes et beaucoup d'eucaryotes synthétisent l'uréase (nombreux microorganismes, des invertébrés, les plantes). L'enzyme le plus et le mieux étudié est une uréase de plante, celle du haricot sabre (jack bean). Les uréases microbiennes et les uréases de plantes font l'objet d'un grand intérêt en agriculture, depuis que les engrais à base d'urée occupent la première place dans le monde. L'action des uréases microbiennes est essentielle dans le sol pour la transformation des composés azotés: 17 à 30% de la population microbienne du sol présentent une activité uréolytique. L'uréase est très stable et persiste même après la mort des cellules végétales et microbiennes. Elle est donc majoritairement présente dans le sol comme un enzyme libre ou lié aux particules colloïdales du sol.

##### **IV.B.1. Les uréases microbiennes.**

La caractérisation des uréases microbiennes d'un point de vue à la fois physiologique et moléculaire a été particulièrement bien décrite dans deux revues de microbiologie (Mobley & Hausinger, 1989; Mobley et al., 1995). Nous évoquerons ici seulement quelques aspects.

Chez les levures et bactéries les uréases sont cytoplasmiques. Bien que l'urée diffuse à travers les membranes, des systèmes de transports actifs de l'urée ont été décrits chez les levures, algues et bactéries. Toutes les uréases ayant une activité uréolytique dépendante du nickel, le transport actif de nickel est également nécessaire pour la formation d'une uréase active. L'urée est alors hydrolysée en ammoniac et dioxyde de carbone, ce qui génère une nette augmentation du pH intracellulaire. Le gradient de proton ainsi formé est utilisé pour activer



**Figure 5. Modèle d'activation de l'uréase (d'après Hausinger et al., 2001).**

une ATPase H<sup>+</sup> dépendante, et l'ammoniac est protoné en ammonium. L'activité uréolytique des uréases microbiennes est dépendante de la concentration en urée, du niveau de l'uréase dans la cellule, et des taux de transport de l'urée et de l'ammonium.

Les uréases microbiennes sont des hétéropolymères composés de deux ou trois sous unités différentes,  $\alpha$  (60 à 66 kDa),  $\beta$  (11 à 115 kDa), et  $\gamma$  (environ 11 kDa). Malgré ces différences dans le nombre de sous unités, toutes les uréases présentent une forte similarité de séquence, ce qui indique qu'elles sont des variantes de la même protéine ancestrale. Les gènes des uréases microbiennes sont organisés en cluster, regroupant des gènes de structure et des gènes accessoires. Les trois sous unités structurales  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  des uréases hétéropolymériques sont codées respectivement par trois gènes contigus, *ureC*, *ureB*, et *ureA*. Les séquences des gènes structuraux des uréases présentent de fortes homologues et montrent des gènes ancestraux communs. Chacun de ces gènes structuraux est aligné de la même façon, de la plus petite sous unité à la plus grande. Ils sont suivis par des gènes accessoires nécessaires pour la synthèse du site catalytique de l'uréase.

Un minimum de sept gènes est généralement nécessaire à l'expression d'une uréase fonctionnelle. *UreA*, *UreB* et *UreC* forment l'apoenzyme inactive. Les protéines *UreD*, *UreF* et *UreG* sont nécessaires à l'incorporation du nickel dans le site actif. Une quatrième protéine accessoire, *UreE*, facilite cette incorporation. La synthèse du centre actif de l'uréase est complexe et nécessite la présence de nickel, de dioxyde de carbone, et des protéines accessoires, ainsi que l'hydrolyse du GTP. La Figure 5 illustre les différentes étapes clés du processus d'activation cellulaire de l'uréase. En absence de nickel ou d'une protéine *UreD* fonctionnelle, les cellules produisent l'apouréase (*UreABC*)<sub>3</sub>, structurellement identique à l'holoprotéine active exceptées l'absence du nickel et de la carbamylation (Hausinger et al., 2001). L'apoprotéine se lie alors avec un complexe préformé composé des trois protéines accessoires essentielles: *UreD*, *UreF*, et *UreG*. L'apouréase pourrait aussi se lier successivement à *UreD*, puis *UreF*, et enfin *UreG*. Le complexe apouréase *UreDFG* ainsi formé constitue le complexe clé dans le processus d'activation de l'uréase. L'ensemble *UreDFG* est dissocié dès lors que l'apoenzyme est activée. Pour cela, la présence de nickel, de bicarbonate, de GTP, et de la protéine *UreE* sont nécessaires. Le bicarbonate est le donneur du dioxyde de carbone requis pour la carbamylation du résidu lysine du site actif, liant les deux ions nickel. Le nickel semble être délivré par la protéine chaperone *UreE*. Le nombre de nickel lié à *UreE* est variable selon les différentes uréases. Cette variabilité est à relier avec le nombre de résidus histidine présents dans la région C-terminale fixatrice de nickel, de la



protéine UreE. L'énergie nécessaire à l'activation de l'uréase *in vivo* provient du GTP, qui se fixe sur un motif P-loop de la protéine UreG.

#### IV.B.2. Les uréases chez les plantes.

La première cristallisation de l'uréase est celle du haricot sabre (jack bean, *Canavalia ensiformis*) et l'activation de l'uréase est encore aujourd'hui la seule fonction du nickel démontrée chez les plantes supérieures. L'uréase est une enzyme ubiquiste chez les plantes (Witte & Medina-Escobar, 2001) et très abondante dans la graine de nombreux membres de la famille des Légumineuses et des Cucurbitacées. Sa principale fonction est le recyclage de l'azote issu de l'urée. L'uréase de haricot est la mieux caractérisée du point de vue biochimique, alors qu'au niveau génétique les informations proviennent essentiellement de l'étude de l'uréase chez le soja (*Glycine max*).

Les uréases des plantes ont été particulièrement bien renseignées dans trois revues, dont les informations qui suivent sont majoritairement issues (Polacco & Holland, 1993, 1994; Sirko & Brodzik, 2000). La source de données complémentaires est précisée.

##### IV.B.2.a Propriétés biochimiques et physiologiques.

Les uréases de plante sont des multimères d'une unique sous unité d'environ 90 kDa (Polacco et al., 1985), colinéaire avec les trois peptides constituant les uréases des bactéries (Mulrooney & Hausinger, 2003). Chaque sous-unité fixe deux ions nickel, sur une région riche en résidus histidine (Takishima et al., 1988). L'affinité et la spécificité de l'uréase pour son substrat sont fortes. L'uréase de haricot possède un  $K_m$  de 2,9 mM et son activité spécifique est de 3500  $\mu\text{mol}$  d'urée dégradée par minute et par mg de protéine.

Des expériences de fractionnement cellulaire révèlent une localisation cytoplasmique de l'uréase. La protéine n'est pas glycosylée et ne contient pas de peptide signal (Witte, 2001).

Une régulation de l'uréase par son substrat est évoquée dans la littérature, chez le riz (Matsumoto et al., 1966), le haricot (Matsumoto et al., 1968), et l'orge (Turley & Ching, 1986; Chen & Ching, 1988). Cependant, Polacco & Holland (1993) réfutent l'état inductible de l'uréase chez les plantes. Selon ces auteurs, l'augmentation de l'activité uréasique suite à une exposition à l'urée, est plutôt générée par les uréases de la population bactérienne retrouvée chez les plantes.



#### IV.B.2.b Biologie moléculaire.

La richesse en protéines du soja en fait la plante modèle quant à l'étude de l'uréase, l'uréase étant le seul enzyme capable d'assimiler l'urée chez les plantes. Le soja produit deux uréases différentes. L'uréase ubiquiste est homotrimérique et synthétisée dans l'ensemble des tissus végétaux. L'uréase embryonnaire existe sous la forme d'hexamères ou de trimères et elle est spécifique des graines matures et des racines des jeunes plantules. L'isoenzyme embryonnaire représente 0,2% à 0,5% des protéines totales de la graine, et son activité est respectivement 100 à 500 fois plus importante que l'uréase ubiquiste dans les embryons en développement et les embryons matures. Chacune des deux uréases est codée par un gène distinct: *Eu1* code l'uréase spécifique de l'embryon et *Eu4* l'isoenzyme ubiquiste (Torisky et al., 1994). En revanche, la pomme de terre, la tomate, plusieurs autres espèces de solanacées, et aussi *Arabidopsis*, ont un unique gène *uréase* (Witte et al., 2005b).

La séquence codante complète de l'uréase de la graine de *Canavalia ensiformis* (jackbean, haricot sabre) a longtemps été la seule disponible chez les plantes (Riddles et al., 1991). La séquence génomique du gène d'*Arabidopsis* est désormais disponible (AT1G67550). La séquence nucléotidique d'un ADNc codant pour l'uréase foliaire chez le riz a été publiée en 2001 dans les bases de données (*Oryza sativa*, AB075476). Les séquences codantes pour les deux isouréases du soja (*Glycine max*) ont également récemment été ajoutées dans les bases de données (Goldraij et al., 2003). En 2005, Witte et collaborateurs ont publié les séquences de deux allèles du gène de l'uréase chez la pomme de terre (AJ276864, AJ276865).

L'étude des mutants des gènes *Eu1* et *Eu4* chez le soja a apporté de nombreuses informations quant aux rôles physiologiques de chaque isoenzyme (Polacco & Holland, 1993). Dans les conditions utilisées, la perte de l'uréase embryonnaire n'est pas associée à un phénotype particulier: l'isoenzyme spécifique n'aurait donc pas de fonction physiologique essentielle. L'uréase ne jouerait pas de rôle dans la nutrition de l'embryon, puisque les cotylédons de soja ne génèrent pas d'urée *in vivo*. De même, alors que beaucoup d'urée est générée suite à la germination, les mutants sans uréase embryonnaire n'accumulent pas plus d'urée que les sauvages. Aussi l'uréase spécifique de l'embryon n'interviendrait pas dans l'assimilation de l'azote uréique, mais aurait plutôt un rôle dans la défense chimique de la graine. Un mécanisme de défense possible pourrait être la création d'un environnement hostile suite aux attaques de microbes ou insectes. La blessure de l'embryon immature générerait la libération d'arginase par rupture des mitochondries. L'urée issue de l'action de l'arginase sur l'important pool cytoplasmique d'arginine (voir paragraphe IV.C.1.), serait alors hydrolysée





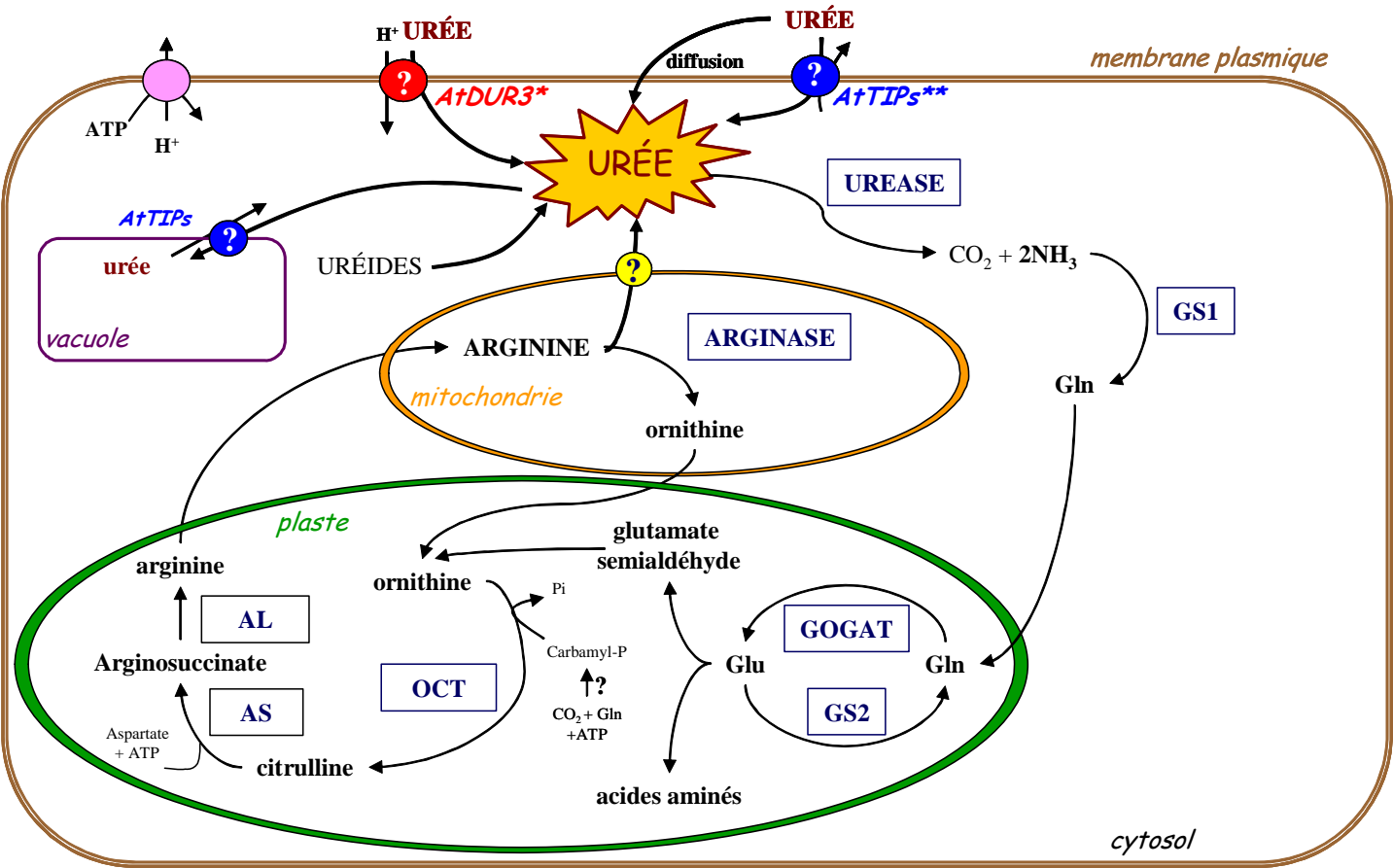
par l'uréase entraînant une forte hausse du pH accompagnée par la production d'ammoniac toxique.

La perte de l'uréase ubiquiste chez le soja entraîne l'apparition de nécroses aux extrémités des feuilles ainsi que l'accumulation d'urée dans les feuilles et les graines (Stebbins et al., 1991). De même, la suppression de toute activité uréolytique, par ajout d'inhibiteur d'uréase ou par élimination du nickel, conduit à l'accumulation d'urée chez les plantes de soja et bloque leur capacité à utiliser l'urée comme source d'azote. L'uréase ubiquiste est donc à l'origine du recyclage de l'urée dérivée du métabolisme de la plante, et de l'assimilation de l'urée exogène. Cependant, ces mêmes plantes se développent jusqu'à maturité et produisent de bons rendements en graines viables, qui germent normalement. Par contre, le phenylphosphorodiamide (PDD), un inhibiteur d'uréase, bloque la germination des graines chez *Arabidopsis* en présence d'eau (Zonia et al., 1995). Cette inhibition de la germination peut être levée par l'ajout d'une source externe d'azote. L'uréase semble donc avoir un rôle important pour la capture de l'azote de l'urée lors de la mobilisation des réserves de la graine. Ces données réunies suggèrent un rôle pivot de l'uréase dans la mobilisation de l'azote des plantules.

#### IV.B.2.c Activation de l'uréase et gènes accessoires.

Si les bases génétiques de l'activation de l'uréase chez les microorganismes sont relativement bien connues, elle le sont beaucoup moins chez les plantes. Quatre gènes non liés contrôlent la synthèse des uréases chez le soja. Les gènes structuraux *Eu1* et *Eu4* codent respectivement l'isoenzyme spécifique de l'embryon et l'isoenzyme ubiquiste, et les mutants correspondant n'affectent que l'une des deux uréases. Deux autres gènes, *Eu2* et *Eu3*, définissent une deuxième classe pour laquelle une seule mutation sur l'un ou l'autre de ces deux gènes inhibe l'activité des deux uréases, la quantité de protéine produite restant toutefois élevée. *Eu2* et *Eu3* sont analogues aux gènes accessoires des bactéries nécessaires à la maturation de l'uréase, et le phénotype des mutants mime celui d'une absence totale de nickel (accumulation d'urée, perte d'activité uréolytique et nécroses foliaires). *Eu2* et *Eu3* sont des gènes accessoires impliqués dans l'incorporation du nickel dans le centre actif de chaque isoenzyme (Polacco et al., 1999).

Freyermuth & collaborateurs (2000) ont montré que le gène *Eu3* code pour une protéine de 32 kDa liant le nickel, et présente de fortes homologues avec les UreG bactériennes. En outre, *Eu3* est homologue avec la protéine UreG d'*Arabidopsis* (Freyermuth et al., 2000) et de



**Figure 6. Les sources d'urée chez les plantes.**

GS, glutamine synthétase; GOGAT, glutamate synthase; AL, arginosuccinate lyase; AS, arginosuccinate synthetase; OCT, ornithine carbamyl transférase.

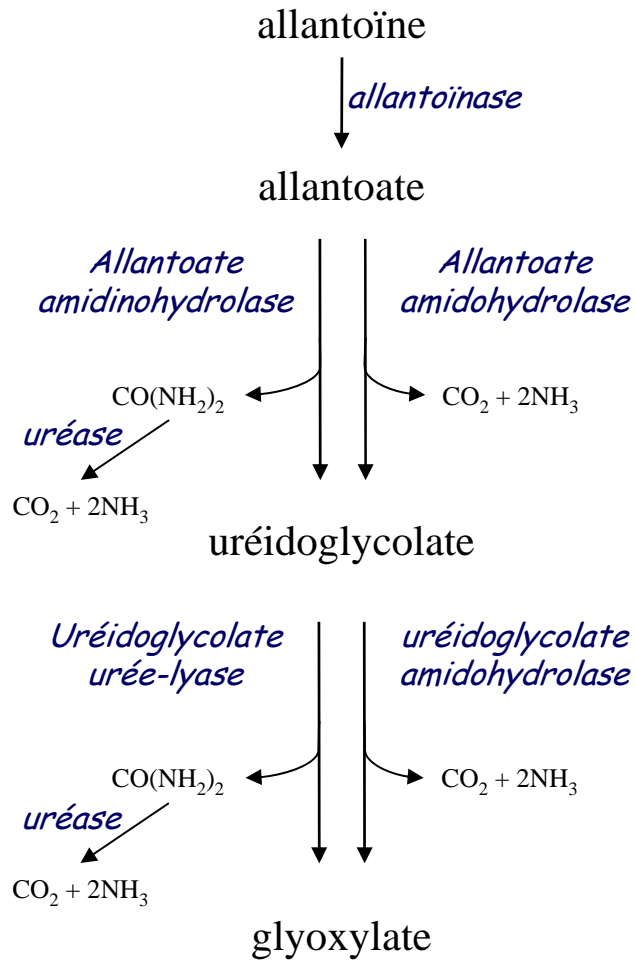
*Medicago truncatula* (AA660998). Sa région N-terminale est toutefois riche en histidine et aspartate, et ainsi ressemble plus à la région C-terminale de l'UreE chez *Klebsiella aerogenes*, région fixatrice du nickel (Lee et al., 1993). Les protéines UreG du soja et d'Arabidopsis possèdent un domaine P-loop de liaison à des nucléotides, qui est aussi retrouvé chez les UreG bactériennes. Les mutants *Eu2* et *Eu3* se complètent entre eux, et une faible stimulation de l'activité uréolytique est observée *in vitro* suite au mélange des extraits protéiques issus de ces deux mutants (Polacco et al., 1999). *Eu3* interagit avec le produit de *Eu2* pour l'activation de l'uréase *in vitro*, mais aucune donnée de séquence n'est encore disponible pour *Eu2*. La régulation de la protéine *Eu3* est fonction du développement et *Eu3* s'accumule dans les embryons en développement. *Eu3* équivaut à UreG et est directement impliquée dans l'activation de l'uréase puisque des anticorps polyclonaux anti-UreG bloquent cette activation *in vitro* (Freyermuth et al., 2000).

D'autres gènes accessoires putatifs ont été identifiés dans les banques de données par comparaison avec les séquences protéiques microbiennes, et les ADNc correspondants clonés. Witte et associés (2001) ont caractérisé la famille multiallèlique *ureG* chez la pomme de terre. Plus récemment, Bacanamwo & collaborateurs (2002) ont isolé des orthologues de *ureD* et *ureF* chez le soja, la tomate et Arabidopsis. Alors que les gènes paralogues *UreD* et *UreF* du soja semblaient être de possibles candidats pour *Eu2*, ces auteurs ont démontré que *Eu2* ne codait ni pour *UreD* ni pour *UreF*. Aucun gène montrant une quelconque similarité avec *ureE* n'a été isolé. En fait la protéine UreG de plante pourrait avoir un rôle équivalent à la protéine UreE des bactéries (cf ci-dessus). Plus récemment (2005b), Witte & associés ont identifié trois protéines accessoires fondamentales pour l'activation de l'uréase chez Arabidopsis (At2g35035 pour AtUreD, At1g21840 pour AtUreF et At2g34470 pour AtUreG).

#### IV.C. Les sources d'urée chez les plantes.

##### IV.C.1. L'arginine.

La principale route de production d'urée chez les plantes est la réaction catalysée par l'arginase (L-Arg amidinohydrolase, EC 3.5.3.1). L'arginase dégrade l'arginine en ornithine et urée, et intervient lors du cycle de l'ornithine, également appelé le cycle de l'urée (Figure 6). L'arginine est un important constituant des protéines et est le précurseur pour la biosynthèse des polyamines, molécules impliquées dans la croissance, le développement et les



**Figure 7. Les voies de dégradation des uréides chez les plantes (d'après Todd et Polacco, 2004).**

réponses aux stress abiotiques (Martin-Tanguy, 2001). L'arginine représente en outre, le composé majeur de transport et de stockage de l'azote chez de nombreuses espèces végétales. L'urée s'accumule au cours de la germination et du développement des plantules, consécutivement à une augmentation de l'activité de l'arginase lors de la mobilisation des réserves protéiques de la graine (Zonia et al., 1995; Goldraij & Polacco, 1999). L'urée s'accumule aussi dans les feuilles sources des plantes âgées, probablement générée par la dégradation des protéines et de l'arginine pour la remobilisation de l'azote dans les tissus en sénescence (Gerendás et al., 1999). En revanche, malgré un large pool d'arginine libre dans les embryons de soja en développement (Micallef & Shelp, 1989), ainsi qu'une faible activité arginase *in vitro*, l'arginase n'est pas activée *in vivo* à ce stade de développement (Goldraij & Polacco, 1999). Ainsi l'activation du cycle de l'urée est inexistante et permet aux embryons de conserver l'arginine, principale réserve d'azote utilisée lors de la germination du soja (Goldraij & Polacco, 2000).

#### IV.C.2. Les uréides.

Les uréides sont issus du catabolisme des purines. Ce sont des composés organiques structurellement proche de l'urée (Muñoz et al., 2006), et très riches en azote. Parmi eux, l'allantoïne et l'acide allantoïque, son produit de dégradation. Ils jouent un rôle essentiel dans l'assimilation, le métabolisme, la mise en réserve et le transport de l'azote chez les plantes (Schubert & Boland, 1990). En outre, les uréides représentent la principale forme de transport de l'azote atmosphérique fixé par les bactéries chez les plantes symbiotiques à uréides (légumineuses des régions tropicales comme le soja). Chez le soja par exemple (*Glycine max*), les uréides représentent 70 à 80% (p/v) de l'azote organique circulant dans la sève du xylème (McClure & Israel, 1979). En revanche, les légumineuses des régions tempérées (luzerne, lupin, pois) transportent leur azote des nodosités au reste de la plante, essentiellement sous forme d'asparagine mais aussi de glutamine: elles sont qualifiées de légumineuses à amide.

Les uréides doivent alors être convertis en métabolites et l'azote formé, assimilé à d'autres molécules azotées. Les possibles voies du catabolisme des uréides chez les plantes sont décrites sur la Figure 7. L'allantoïne est dégradée en allantoate par l'allantoïnase (EC 3.5.2.5) (Yang & Han, 2004). La dégradation de l'allantoate peut alors être catalysée soit par l'allantoate amidohydrolase (EC 3.5.3.9), soit par l'allantoate amidinohydrolase (EC 3.5.3.4). Ces deux enzymes produisent l'uréidoglycolate, métabolisé en glyoxylate, soit par



l'uréidoglycolate urée-lyase (EC 4.3.2.3), soit par l'uréidoglycolate amidohydrolase (EC 3.5.3.19). Ces activités diffèrent par la nature des composés azotés qui sont alors produits: l'allantoate et l'uréidoglycolate amidohydrolases génèrent de l'ammonium, alors que l'allantoate amidohydrolase et l'uréidoglycolate urée-lyase produisent de l'urée. Les plantes sont effectivement capables de produire directement du dioxyde de carbone et de l'ammoniac, issus de la dégradation des uréides (Polacco & Holland, 1993). Cependant, Stebbins & Polacco (1995) ont montré que les enzymes génératrices d'ammonium et d'urée fonctionnaient en parallèle chez le soja. Chez *Arabidopsis*, alors que l'urée générée est issue de l'arginine les trois premiers jours après germination, la dégradation des uréides contribue pour 30 à 40% au pool d'urée (Zonia et al., 1995). Vadez & Sinclair (2000) ont mis en évidence que l'allantoate est dégradé dans les feuilles de soja via l'amidohydrolase ou l'amidohydrolase selon le type de cultivar. En outre la première uréidoglycolate urée-lyase a été purifiée chez le pois chiche (Muñoz et al., 2001).

#### IV.C.3. Absorption racinaire et foliaire.

Outre la biosynthèse d'urée au sein de la plante, l'urée prélevée dans le milieu extérieur constitue une autre source pour la plante. Les feuilles et les racines constituent les deux voies d'entrée de l'urée dans la plante. L'urée est une molécule neutre. Ainsi, elle pourrait franchir passivement la bicouche lipidique de la membrane plasmique (Galluci et al., 1971). Cependant, plusieurs expériences indépendantes ont apporté la preuve physiologique de l'existence de l'absorption d'urée par les racines, avant sa dégradation en dioxyde de carbone et ammonium. Lorsque l'urée est ajoutée à des plantes en culture hydroponique, l'urée se retrouve dans la sève xylémienne (Hine & Sprent, 1988), ou encore s'accumule dans les feuilles de plantes déficientes en nickel (Gerendás et al., 1998). L'absorption d'urée par les racines dépendrait du statut azoté initial de la plante ainsi que de la présence de nitrate et d'ammonium (Bradley et al., 1989). De même, la disponibilité en nickel serait un facteur limitant pour l'absorption de l'urée (Gerendás et al., 1998). L'application directe d'urée sur les feuilles entraîne une accumulation d'urée dans les feuilles ainsi que des nécroses à leur extrémité apicale, nécroses particulièrement sévères en présence d'un inhibiteur d'uréase (Krogmeier et al., 1989). L'absorption d'urée via les feuilles est proportionnelle à la concentration en urée de la solution pulvérisée (Klein & Weinbaum, 1985), ou suit le taux de transpiration des feuilles, ce qui témoigne d'un processus dirigé par les flux d'eau dans la plante (Palta et al., 1991). Ainsi, l'absorption d'urée par les racines révèle des signes d'un





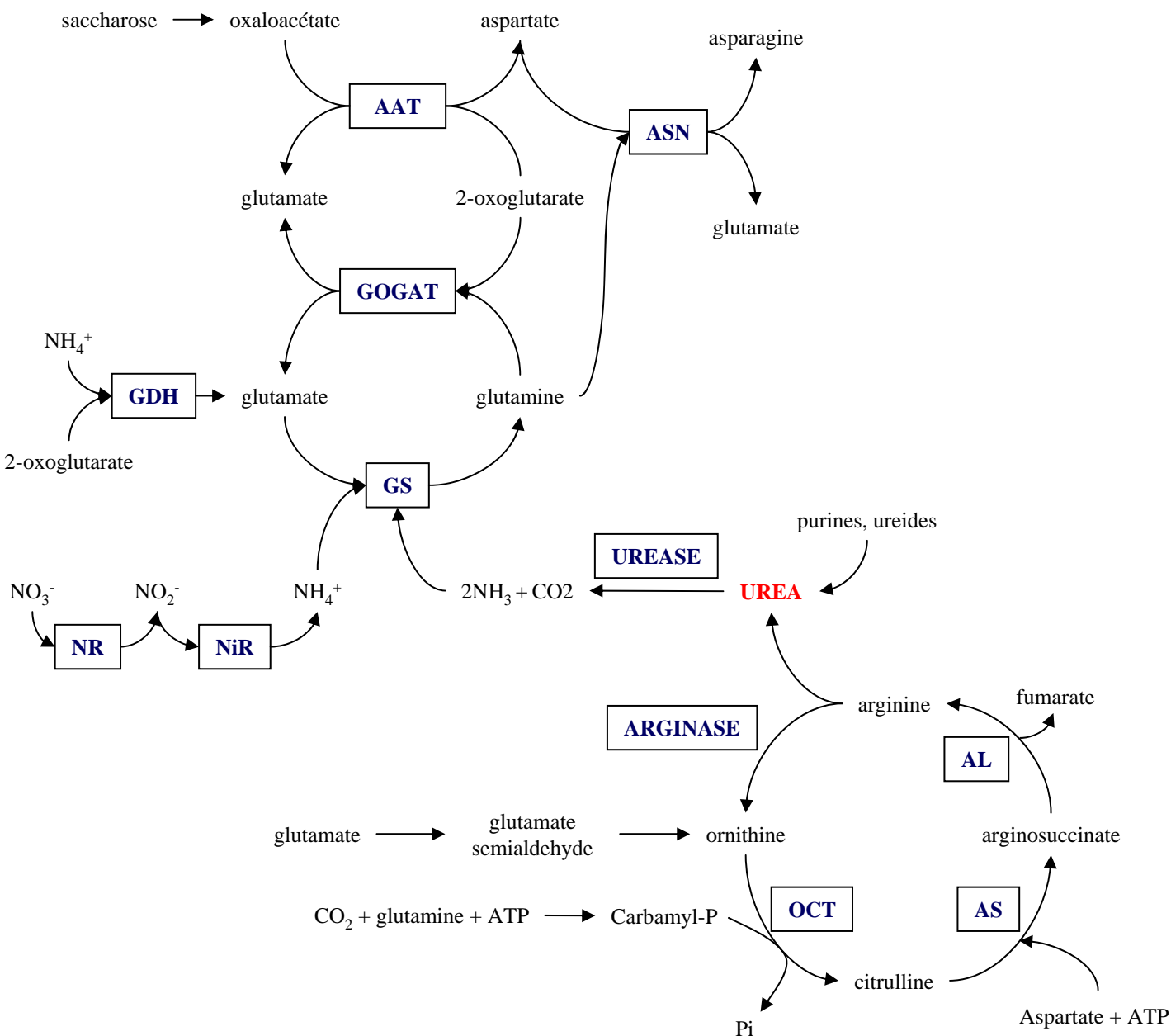
contrôle par l'azote et le nickel, alors qu'au niveau foliaire, le moteur de l'absorption s'avère être un processus de diffusion.

Malgré ces preuves physiologiques d'une absorption d'urée par les cellules végétales racinaires et foliaires, les mécanismes qui régissent le transport de l'urée sont peu connus d'un point de vue moléculaire. Un transporteur de l'urée à haute affinité AtDUR3 a récemment été cloné et caractérisé chez *Arabidopsis*, apportant pour la première fois la preuve du transport actif d'urée chez les plantes (Liu et al., 2003a). AtDUR3 est constitué de 14 domaines transmembranaires et l'urée est co-transportée avec des protons. AtDUR3 est exprimé dans les feuilles et les racines, et son expression est induite dans les racines carencées en azote et pendant les trois premiers jours de la germination (Liu et al., 2003a). Par une approche de complémentation hétérologue de mutant de transport de l'urée chez la levure, Liu et collaborateurs (2003b) ont isolé chez *Arabidopsis*, quatre gènes codant pour des protéines intrinsèques tonoplastiques (TIP). Contrairement au transporteur à haute affinité H<sup>+</sup>/urée AtDUR3, ces aquaporines sont moins sensibles à la concentration en urée et au pH environnant. Pareillement à *AtDUR3*, trois de ces *AtTIPs* sont induits dans les racines en carence azotée et pendant les premiers jours de la germination, mais l'expression de ces gènes reste constitutive dans les feuilles. La localisation subcellulaire de la protéine de fusion GFP/*AtTIPs* dans des protoplastes confirme l'adressage de ces protéines sur le tonoplaste mais aussi sur les autres endomembranes (vésicules de protoplastes éclatés). Un adressage vers la membrane plasmique n'est toutefois pas à exclure. Aussi, ces transporteurs TIP pourraient-ils jouer un rôle dans l'équilibration des concentrations en urée entre les différents compartiments cellulaires (Liu et al., 2003b).

#### IV.D. Le devenir de l'urée dans la plante.

Quelle que soit son origine endogène ou exogène, l'urée n'est pas utilisable par la plante avant d'être prise en charge par les uréases qui catalysent l'hydrolyse de l'urée en dioxyde de carbone et ammonium. Une incorporation directe de l'urée via le sens inverse du cycle de l'ornithine est aussi proposée par certains auteurs (Beusichem & Neeteson, 1982).

Des flux d'urée existent entre les organes puits et source de la plante (Gerendás et al., 1999; Witte et al., 2002), permettant ainsi la remobilisation préférentielle de l'azote uréique au niveau des organes en croissance. De même les activités de l'uréase sont particulièrement plus fortes dans les feuilles âgées par rapport aux jeunes feuilles (Witte et al., 2002). Concernant



**Figure 8. Le devenir de l'urée chez les plantes.**

GS, glutamine synthétase; GOGAT, glutamate synthase; AAT, aspartate aminotransférase; AL, arginosuccinate lyase; AS, arginosuccinate synthetase; ASN, asparagine synthétase; GDH, glutamate deshydrogénase; NiR, nitrite réductase; NR, nitrate réductase; OCT, ornithine carbamyl transférase.

l'urée issue de l'arginine, un export de l'urée de la mitochondrie vers le cytosol doit opérer. En effet Polacco & Holland (1993) ont évoqué une localisation intra-mitochondriale de l'arginase. L'étude des séquences nucléotidiques de l'arginase d'*Arabidopsis* (Krumpelman et al., 1995) et de soja (Goldraij et al., 1998) confirme cette hypothèse: celles-ci présentent une extrémité N-terminale riche en résidus chargés et hydroxylés, formant un site potentiel d'adressage vers la mitochondrie (Sjöling & Glasser, 1998). Aussi l'utilisation de l'urée issue de l'action de l'arginase (Zonia et al., 1995), nécessite-t-elle le transport de l'urée hors de la mitochondrie, les uréases étant des enzymes cytoplasmiques (Polacco & Holland, 1993).

Suite à l'action des uréases, l'ammonium ainsi formé est incorporé dans les acides aminés par l'action combinée de la glutamine synthétase (GS) et de la glutamate synthase (GOGAT) (Figure 8).

## **V. Substances marines, azote & agriculture.**

Les substances marines constituent une ressource naturelle et représentent un potentiel économique en plein essor dans les domaines agricole, alimentaire, pharmaceutique, cosmétique, et industriel. En agriculture, l'utilisation d'algues marines pour amender les sols et fertiliser les cultures n'est pas une pratique récente (Vincent, 1924). Cependant l'exploitation et la commercialisation de cette ressource marine naturelle et abondante restent principalement restreintes aux régions côtières, le coût des opérations de ramassage, séchage et transport étant élevé par comparaison avec les engrais chimiques traditionnels. Une exception à ce constat concerne les algues rouges calcaires, connues sous l'appellation de maërl, commercialisées en Angleterre et en France pour l'amendement des sols acides.

Avec la mise sur le marché des extraits d'algues liquides depuis les années 50, les traitements par voie foliaire ont permis un regain d'intérêt pour les substances marines depuis les années 60. De nombreux effets agronomiques sont attribués aux extraits d'algues: meilleure germination des graines, augmentation du développement racinaire et du rendement, plus grande assimilation de l'azote et du phosphore, meilleure résistance aux stress et aux maladies, et amélioration de la conservation des fruits (Abetz, 1980; Mooney & van Staden, 1986; Jolivet et al., 1991; Verkleij, 1992). Les micronutriments et les phytohormones apportés par les substances marines, et en particulier les cytokinines, sont considérés comme les générateurs de ces effets biologiques induits chez les plantes (Mooney & van Staden, 1986).



Cependant l'utilisation des substances marines reste encore sujette à bien des questionnements, leurs mécanismes précis d'action restant inexpliqués jusqu'à présent.

#### **V.A. Entre milieu marin et monde végétal...**

Vingt-cinq mille espèces d'algues sont recensées dans les mers et océans, qui recouvrent les deux tiers de la surface de la terre. Elles représentent la presque totalité de la flore marine, et sont considérées comme les premiers êtres vivants apparus il y a quelques six cent millions d'années. Ces végétaux jouent un rôle fondamental dans l'équilibre de la biosphère en produisant chaque année plus du tiers de l'oxygène de la planète, et en constituant, par le phytoplancton, le premier maillon de la chaîne alimentaire. Les algues sont classées parmi les Cryptogames et plus précisément les Thallophytes (plantes sans feuilles, ni tiges, ni racines, ni vaisseaux conducteurs). Feldmann (1978) a défini l'algue comme l'ensemble des végétaux eucaryotes, photosynthétiques par leurs plastes pourvus de chlorophylles associées à des pigments variés, se reproduisant par des spores et des gamètes formés dans des sporocytes et des gamétocytes. On distingue plusieurs groupes: les rhodophytes ou algues rouges, les chromophytes ou algues brunes à la base de la plupart des engrais agricoles et horticoles, et les chlorophytes ou algues vertes.

Les algues marines se présentent parmi les végétaux les plus productifs de la planète. Pour faire face à l'absence de racines, ces végétaux marins ont dû développer des stratégies de développement et de nutrition particulièrement performantes. Leur ingéniosité biochimique les a ainsi amenées à développer différentes stratégies d'adaptation et de lutte tout à fait exceptionnelles pour résister et survivre aux différents stress abiotiques (hydrique, osmotique, thermique, ...) et biotiques (herbivores, champignons, ...). Ces stratégies ont abouti à la mise en place de tout un arsenal biologique d'une remarquable efficacité. Les algues ont ainsi une faculté extraordinaire à concentrer les principes actifs présents dans l'eau de mer (jusqu'à 50000 fois). Aussi ces phytonutriments naturels, sont-ils exploités afin de renforcer la performance des végétaux terrestres et répondre ainsi aux attentes en matière de productivité, de qualité et de respect de l'environnement. Les algues sont non seulement utilisées comme engrais pour l'agriculture et l'horticulture, mais sont désormais présentes dans l'agroalimentaire, la cosmétique, la pharmacie, le textile ou encore la chimie.

#### **V.B. Récolte, préparation et production des extraits d'algues.**



Figure 9. Bateau goémonier à l'ouvrage.

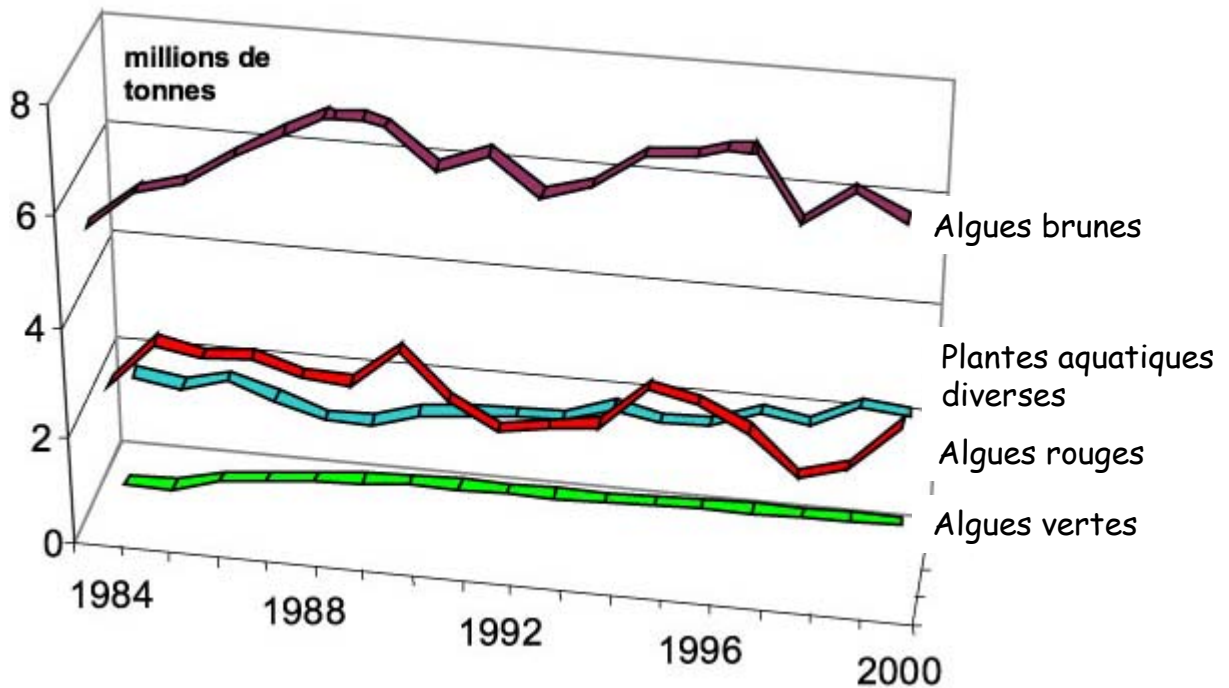


Figure 10. Production aquacole mondiale par groupe d'algues. (Source FAO, 2002; R. Kaas, IFREMER).

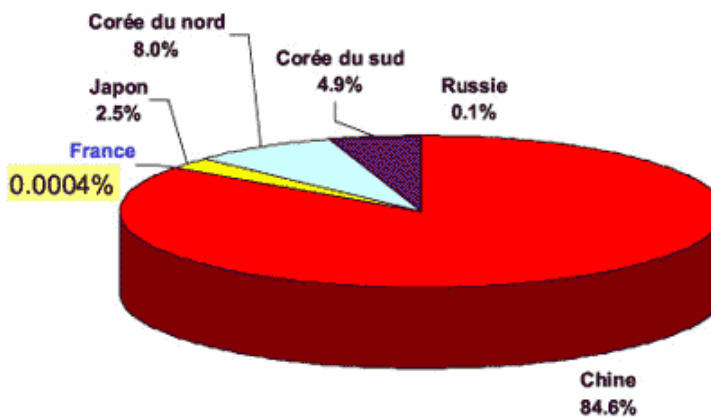


Figure 11. Répartition géographique de l'algoculture des algues brunes.

La production mondiale des algues brunes est d'environ 5 millions de tonnes. La Chine est le principal producteur avec 84,5% du total mondial (Source FAO, 2002; R. Kaas, IFREMER).

La récolte annuelle d'algues fraîches en France est d'environ 70000 tonnes, dont les trois-quarts sont récoltés en Bretagne (source CEVA, Centre d'Etude et de Valorisation des Algues). Les algues fraîches sont récoltées mécaniquement par des cueilleurs professionnels, à l'aide de bateau goémonier (Figure 9), ou manuellement par des plongeurs sous-marins. En 2000, la production mondiale des algues et végétaux aquatiques atteint 7,9 millions de tonnes. Les algues brunes sont de loin les plus représentées, avec 4,9 millions de tonnes fraîches produites (Figure 10) (source FAO, 2002; Ifremer). Devant le géant chinois, la production française ne représente qu'une infime part de la production mondiale d'algues brunes (Figure 11). L'engouement des industriels pour les algues est cependant croissant, et les techniques actuelles d'approvisionnement ne permettent pas de répondre à la demande d'un marché en plein essor. Ainsi est née Aléor, une toute jeune société (Paimpol, 22) créatrice d'une ferme aquacole pour la culture d'algues naturellement présentes dans les eaux bretonnes afin de ne pas modifier l'écosystème (dépêche AFP du 01/08/2006 et site web d'Aléor <http://www.aleor.org/>). La première récolte de 450 kg de kombu, une variété de laminaires brunes, effectuée fin juillet 2006, était destinée à la société de cosmétiques BiotechMarine (Pontrieux, Côtes d'Armor). Les avantages des algues cultivées par rapport aux algues sont une qualité constante et plus calibrée, ainsi qu'une meilleure traçabilité, ce que recherchent les entreprises telles que BiotechMarine.

Les algues fraîchement récoltées sont alors séchées puis broyées. Les méthodes utilisées pour la préparation des extraits d'algues sont variées. Elles font souvent l'objet d'un dépôt de brevets et ne sont décrites dans les publications que de manière sommaire et incomplète. Le process industriel qui prend en compte les spécificités physiques et biochimiques des algues, fait intervenir différentes technologies dans le domaine de l'extraction végétale et de la purification. Le matériel végétal peut être soumis à l'action de différentes températures, d'un milieu alcalin, ou de pressions variées. La nature des extraits commerciaux peut, dans certains cas, être très différente de la composition originelle des algues qui ont servi à leur préparation.

### **V.C. Les effets des extraits d'algue.**

La littérature relative aux effets des extraits d'algues marines sur la productivité des plantes cultivées, reporte fréquemment des résultats irréguliers et contradictoires. La pertinence





scientifique des effets répertoriés n'est pas toujours respectée, de nombreux rapports émanant des firmes productrices de substances marines visant à démontrer l'efficacité commerciale de leurs produits mis sur le marché. Cependant nul ne peut nier les divers effets bénéfiques des extraits d'algues sur les cultures. Plusieurs synthèses bibliographiques décrivent ces différents effets phytoactifs (Abetz, 1980; Mooney & van Staden, 1986; Jolivet et al., 1991; Verkleij, 1992).

#### V.C.1. Germination facilitée des graines.

De nombreux exemples d'amélioration de la germination des graines par les extraits d'algues ont été décrits dans la littérature (Button & Noyes, 1964; Bhosle et al., 1975; Rajeshwari et al., 1983; Venkataraman et al., 1993; Mohan et al., 1994; El-Sheekh & El-Saied, 2000; Sivasankari et al., 2006). Ces derniers relèvent un pourcentage de germination supérieur lorsque des graines de *Vigna sinensis* sont semées sur un extrait d'algues vertes ou brunes (respectivement 98% et 100%), par rapport à un semis sur de l'eau (86%). Le plus fort taux de germination est observé pour des extraits concentrés à 20%. La germination est également favorisée lorsque les graines sont d'abord semées sur de l'eau pendant 24 heures, puis traitées avec les extraits d'algues, comparativement à un témoin eau.

#### V.C.2. Amélioration de la croissance, de l'absorption minérale et du rendement des cultures.

La croissance de plusieurs plantes cultivées semble répondre positivement à l'application d'extraits d'algues marines, et ceci d'autant mieux que les plantes sont stressées par une carence minérale (Nelson & van Staden, 1984a; Beckett & van Staden, 1989) ou hydrique (Mooney & van Staden, 1985). La réponse de la plante à l'extrait d'algue s'observe au niveau de son système racinaire: une meilleure croissance des racines engendre un système racinaire plus vigoureux. L'activité des racines est accrue et l'absorption de différents éléments minéraux du sol comme l'azote (Beckett & van Staden, 1990a), le phosphore et le calcium (De Villiers et al., 1983), le potassium (Beckett et van Staden, 1989), le manganèse (Blunden, 1972), le magnésium (Senn & Kingman, 1978), le fer (Booth, 1966), le zinc (Beckett & van Staden, 1990b), s'avère plus importante. Ces modifications de l'architecture et de l'activité des racines, se traduisent par une amélioration de la croissance de la plante toute entière. Il en



résulte un accroissement du rendement des cultures. Chez le blé, l'apport d'un extrait (Kelpak 66), tant au niveau des racines que des feuilles, entraîne une augmentation du rendement en grains (Nelson & van Staden, 1984b): nombre et poids de chacun des grains par épi sont accrus (Nelson & van Staden, 1986; Beckett & van Staden, 1989). Ces effets sont observables uniquement pour des conditions particulières de culture, à savoir une carence en potassium et en eau (Mooney & van Staden, 1985; Beckett & van Staden, 1989). Des effets similaires ont été reportés chez l'orge (Featonby-Smith & van Staden, 1987) et chez de nombreuses autres espèces végétales (pour revue, voir Abetz, 1980; Mooney & van Staden, 1986; Jolivet et al., 1991; Verkleij, 1992).

### V.C.3. Résistance accrue des plantes aux stress et maladies.

L'apport d'extrait d'algue confère aux plantes une plus forte résistance au froid (Booth, 1966; Stephenson, 1966; Senn & Kingman, 1978) et à la sécheresse (Mooney & van Staden, 1985). Quelques articles décrivent une résistance accrue des plantes aux maladies fongiques en réponse à la pulvérisation d'extraits d'algue (Booth, 1966; Stephenson, 1966). Les extraits d'algues confèrent également une protection des plantes contre les attaques des insectes (Booth, 1964; Stephenson, 1966). La fécondité de certains insectes seraient aussi réduite suite à l'application de ces extraits d'algues (Booth, 1966; Stephenson, 1966). L'infestation des racines par les nématodes est aussi réduite en présence d'extraits d'algue (Featonby-Smith & van Staden, 1983; Crouch & van Staden, 1993; Wu et al., 1997), ces extraits jouant sur le taux de fécondité des nématodes (Whapham et al., 1994; Wu et al., 1998). Plus récemment, l'activité élicitrice d'un extrait d'algue verte a été démontrée chez *Medicago truncatula* en utilisant une membrane macroarray (Cluzet et al., 2004). Ainsi l'expression de nombreux gènes de défense est induite suite à la pulvérisation de l'extrait d'algue. En accord avec ces effets sur l'expression des gènes de défense, cet extrait engendre une protection accrue des plantes contre les attaques pathogènes (Cluzet et al., 2004).

### V.C.4. Meilleure qualité des produits récoltés.

Des pulvérisations foliaires répétées de substances marines sur des espèces fruitières ou maraîchères avant la récolte se traduisent par un affermissement des fruits ou des légumes,



qui se conservent alors d'autant mieux (Skelton & Senn, 1968; Povolny, 1966, 1969, 1972, 1974, 1977). La pureté du jus de betterave à sucre est notamment améliorée par une diminution en potassium (Blunden et al., 1974, 1979). Yvin et associés (1989) ont également constaté une augmentation de la production de sucre chez la betterave en réponse à un traitement algal.

### **V.D. Approche moléculaire des mécanismes d'action des extraits d'algues.**

Les modalités d'action des extraits industriels d'algues marines sur les processus physiologiques, biochimiques et moléculaires des plantes ne sont pas encore clairement établies. Les algues marines contiennent de faibles concentrations en nutriments primaires comme l'azote, le phosphore et le potassium (Booth, 1966). Ils possèdent tous les oligoéléments nécessaires aux plantes mais aussi beaucoup d'autres, pouvant ainsi supprimer des carences en certains minéraux (Aitken & Senn, 1965). Cependant leurs teneurs dans les extraits s'avèrent beaucoup trop faibles pour expliquer totalement les réponses de croissance (Blunden, 1977; Abetz, 1980). L'occurrence de phénomènes physicochimiques est une hypothèse avancée pour expliquer les propriétés phytoactives des extraits d'algues, mais les régulateurs de croissance apportés par les algues semblent les principaux ingrédients responsables. D'autres composés comme les éléments-trace, les bêtaïnes, les polysaccharides, induisent aussi des effets biologiques. Le rôle des régulateurs de croissance a été suggéré par le fait que les doses d'extraits d'algues appliquées à l'hectare sont très faibles, ce qui implique que les ingrédients actifs doivent pouvoir agir à très faible concentration. Les composés organiques connus pour induire de fortes réponses physiologiques à très faibles concentrations sont les phytohormones. Ainsi, de nombreux régulateurs de croissance ont été identifiés chez les algues (Brain et al., 1973; Augier, 1976a, b; Kingman & Moore, 1982; Mooney & van Staden, 1986; Bradley, 1991; Crouch & van Staden, 1993; Stirk et al., 2003; Ördög et al., 2004, Plettner et al., 2005). Les hormones de croissance des algues sont, pour l'essentiel, semblables à celles des végétaux supérieurs.

#### **V.D.1. Les cytokinines.**

Ce sont les hormones qui se retrouvent en plus forte proportion dans les tissus algaux, et auxquelles est attribuée la plupart des effets biologiques des extraits commerciaux. En



comparant les effets obtenus avec la kinétine et des extraits d'algues commerciaux ayant une activité cytokinique équivalente, Blunden (1977) a montré l'existence de similitudes entre les deux. Aussi, le contenu en cytokinines des extraits d'algues et les effets bénéfiques de ces extraits, sont-ils étroitement corrélés. En utilisant la chromatographie liquide haute performance, Featonby-Smith & van Staden (1984) ont identifié la *cis*- et la *trans*-ribosylzéatine, la *trans*-zéatine, la dihydrozéatine et la N<sup>6</sup>( $\Delta^2$ -isopentényladénosine), dans l'extrait d'algue Kelpak. Des cytokinines ont aussi été mises en évidence dans l'extrait commercial Seasol par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (Tay et al., 1985). Parmi celles-ci, la *trans*-zéatine et la *trans*-zéatine riboside et leurs dérivés dihydro, ainsi que l'isopentényladénine et l'isopentényladénosine. Plus tard (1987), ces mêmes auteurs ont identifié des cytokinines-glucosides dans le même extrait. Parmi les premières réponses des plantes aux cytokinines, impliquées dans la régulation de leur croissance, une induction de la synthèse protéique et de la division cellulaire (Miller, 1963; Pozsar et al., 1967), une mobilisation des nutriments (Letham, 1978), un retard de sénescence (Shaw et al., 1965), une inhibition de l'infection fongique (Dekker, 1963), ou encore une augmentation du contenu en chlorophylle dans la feuille (Mourey-Bringuier, 1986), une augmentation de la masse fraîche et de la surface des feuilles (Featonby-Smith & van Staden, 1983), sont avancés.

Cependant, la seule présence des cytokinines dans les extraits d'algues marines, n'expliquerait pas l'ensemble de leurs effets bénéfiques sur la plante (Sanderson & Jameson, 1986; Tay et al., 1987). En effet, les pratiques agricoles privilégient l'utilisation des extraits d'algues en solutions très diluées, et même si l'activité cytokinique est forte dans l'extrait concentré, celle-ci s'avère insuffisante pour affirmer que les cytokinines soient les seuls composés responsables. Durand & collaborateurs (2003) ont d'ailleurs montré que l'effet positif de l'extrait d'algue N PRO (BiotechMarine) sur l'activité de la nitrate réductase ne pouvait s'expliquer uniquement par la présence des cytokinines contenues dans l'extrait.

En outre les activités cytokinines de différents lots d'un même extrait commercial peuvent présenter de fortes variations. Ces fluctuations peuvent s'expliquer notamment par des modifications de la composition des extraits d'algues selon l'époque de l'année, par les pratiques d'extraction et de conservation du matériel végétal. Aussi est-il important de connaître les taux d'activité cytokinique de chacun des extraits, afin d'assurer la reproductibilité des résultats. La sélection et l'homogénéisation de matériel brut sont nécessaires, de même que le choix et le contrôle des techniques d'extraction sont très importants.





### V.D.2. Les auxines.

La présence des auxines dans les extraits commerciaux d'algues marines a été longtemps mise en doute. En effet, l'auxine est instable en milieu aqueux, et peut donc facilement être détruite au cours de la récolte ou lors de la préparation des extraits commerciaux. La présence des auxines chez de nombreuses algues marines est pourtant clairement avérée. En utilisant le test du coléoptile d'avoine, Van Overbeek (1940) a décelé la présence d'acide indole-3-acétique (AIA) dans une large gamme d'espèces d'algues. Depuis, les méthodes basées sur la chromatographie et la spectrométrie, ont permis l'identification d'AIA chez d'autres algues (Abe et al., 1972; Jacobs et al., 1985), de même que d'autres composés auxiniques comme l'acide phényl-3-acétique (Abe et al., 1972; Hart, 1982) et l'acide hydroxyphényl acétique (Abe et al., 1974). Bernart & Gerwick (1990) ont détecté l'indole-3-hydroxyacétyl chez une algue rouge par résonance magnétique. Les extraits d'algues commerciaux ont alors été testés pour leur contenu en auxine. Kingman & Moore (1982) ont isolé, purifié et quantifié de l'AIA dans un extrait d'*Ascophyllum nodosum*. La présence d'AIA a été confirmée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse, dans un autre extrait, le Maxicrop (Sanderson et al., 1987).

Les auxines, et en particulier l'AIA, sont connues pour stimuler la croissance des racines adventives chez les plantes. Aussi, le développement d'un système racinaire vigoureux chez la plante, suite à l'application des extraits d'algues, a été logiquement attribué aux auxines endogènes algales (Blunden & Wildgoose, 1977; Featonby-Smith & van Staden, 1983; Nelson & van Staden, 1984). Crouch & van Staden (1991) ont également mis en évidence une stimulation de la rhizogénèse en présence d'un extrait concentré préparé à partir d'algues brunes. Cet effet promoteur a été attribué à la présence d'indoles dans l'extrait (Crouch et al., 1992).

### V.D.3. Les gibbérellines.

Bien que la présence des gibbérellines chez les algues soit bien documentée (Crouch & van Staden, 1993 et références), elle n'est pas clairement établie dans les extraits d'algues



commerciaux. Les gibbérellines sont des molécules fragiles, peu représentées, et dont l'activité serait limitée dans le temps. Aussi, alors que Williams et collaborateurs (1974) ont détecté une faible activité gibbérelline dans trois extraits commerciaux fraîchement préparés, le taux d'acide gibbérellique devient négligeable après une conservation de quatre mois à température ambiante. Il en résulte que les gibbérellines ne peuvent expliquer les effets physiologiques observés aux doses où les extraits sont utilisés en agriculture. Cependant, les gibbérellines, en synergie avec les cytokinines, pourraient intervenir dans l'amélioration de la germination constatée après l'utilisation des extraits d'algues (Crouch & van Staden, 1993).

#### V.D.4. L'acide abscissique.

La présence d'acide abscissique dans un extrait commercial a été confirmée par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (Boyer & Dougherty, 1988). Hirsch & collaborateurs (1989) ont ensuite montré que l'acide abscissique est universellement répandu chez les algues. Toutefois son rôle reste à déterminer.

#### V.D.5. L'éthylène.

Il y a peu d'études sur l'éthylène chez les algues. La production d'éthylène a été mise en évidence chez plusieurs espèces d'algues (Vanden Driessche et al., 1988; Plettner et al., 2005). L'acide-1-aminocyclopropane-1-carboxylique, molécule précurseur de l'éthylène, a été identifiée dans un extrait commercial d'algues brunes (Nelson & van Staden, 1985). Toutefois, la présence d'éthylène dans les extraits commerciaux d'algues marines reste à démontrer.

#### V.D.6. Les bétaines.

Les bétaines sont des composés de type ammonium quaternaire qui présentent une activité cytokinine-like (Wheeler, 1973). Leur participation aux propriétés phytoactives des extraits d'algues marines a été envisagée du fait que les extraits contiennent de nombreux composés qui répondent positivement à certains tests cytokiniques (Blunden et al., 1984). Plusieurs bétaines ont d'ailleurs été isolées à partir de nombreuses espèces d'algues brunes utilisées pour la préparation des extraits d'algues commerciaux (Blunden et al., 1985). Différents



extraits commerciaux ont alors été testés pour leur contenu en bétaines (Blunden et al., 1986). Glycine bétaine, acide  $\gamma$ -aminobutyrique bétaine, acide  $\delta$ -aminovalérique bétaine ont alors pu être identifiés et quantifiés.

Whapham et collaborateurs (1993) ont montré que les bétaines présentes dans les extraits d'algues entraînaient une augmentation des taux de chlorophylle dans les plantes traitées par rapport aux contrôles non traitées. Des résultats similaires sont décrits par Blunden & collaborateurs (1997). Ces auteurs suggèrent un ralentissement de la dégradation de la chlorophylle plutôt qu'une augmentation du taux de chlorophylle. Les bétaines joueraient également un rôle dans la résistance des plantes au gel (Blunden et al., 1984), ainsi que dans la protection des plantes contre l'invasion des nématodes (Blunden et al., 1997).

#### V.D.7. Les autres composés.

Les extraits commerciaux se caractérisent par la présence de nombreux composés qui sont généralement spécifiques aux espèces d'algues utilisées. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer des oligosaccharides et des polysaccharides (laminaranes, carraghénanes...), des sucres, des polyols (mannitol), des acides aminés, des protéines, des dérivés phénoliques, lipides, pigments, vitamines...

La paroi cellulaire des algues marines est riche en divers oligo et polysaccharides (Kloareg & Quatrano, 1988), et certains stimuleraient les systèmes de défense et de résistance des plantes (Joubert et al., 1998). Ainsi, la laminarine et les carraghénanes semblent être impliqués dans le déclenchement des réponses de défense par la plante (Cardinale et al., 2000; Mercier et al., 2001; Klarzynski et al., 2000, 2003; Aziz et al., 2003; Menard et al., 2004). La laminarine induit non seulement les réponses précoces de défense (alcalinisation du milieu extracellulaire, production de peroxyde d'hydrogène), mais aussi les réponses tardives (induction de la phenylalanine ammoniac lyase et de la lipoxygénase). La liminarine induit en outre la synthèse de phytoalexines, l'expression de plusieurs familles de Pathogenesis-Related (PR) protéines, ainsi que l'accumulation de l'acide jasmonique (Klarzynski et al., 2000). Cependant aucune réaction hypersensible n'a été détectée. Les carraghénanes induisent l'expression de gènes de défense ainsi que les voies de signalisation médiées par l'éthylène, l'acide jasmonique et l'acide salicylique (Mercier et al., 2001). L'activité de ces polysaccharides serait liée à leur degré de sulfatation: plus leur contenu en sulfate est important et plus la molécule est active (Mercier et al., 2001; Menard et al., 2004). L'induction de différents gènes de défense a également été mise en évidence chez le tabac,



grâce à la première étude transcriptomique sur l'activité élicitrice d'un extrait d'algue verte (Cluzet et al., 2004). Parmi eux, les gènes impliqués dans la biosynthèse des phytoalexines, des PR protéines et des protéines de la paroi cellulaire sont surexprimés suite au traitement avec l'extrait d'algue. Plusieurs gènes du métabolisme primaire répondent aussi à l'extrait d'algue. Parmi ceux-ci, les enzymes clés du métabolisme de l'azote comme la nitrite réductase sont induits, de même que la citrate réductase impliquée dans le métabolisme des carbohydrates.

Le mannitol a été identifié comme l'un des composants actifs de l'Optéine, un extrait de l'algue côtière *Ascophyllum nodosum*, commercialisé par la société Goëmar (Klarzynski et al., 2005). Le biostimulant Optéine augmente la quantité d'azote absorbé par une culture de blé, ainsi que le transfert de l'azote des feuilles et des tiges vers le grain. La qualité de la récolte est alors optimisée tout en favorisant le rendement, l'extrait d'algue augmentant la teneur en protéines des grains (Joubert et al., 2002). Des recherches ont alors été entreprises afin de déterminer la (ou les) matière(s) active(s) contenue(s) dans cet extrait (Klarzynski et al., 2005). Parmi les molécules présentes dans l'extrait, le mannitol serait un photoassimilat activateur de la nitrate réductase. Le mannitol induirait également une plus forte accumulation de chlorophylle dans les tissus. Un autre extrait d'algue (N PRO, BiotechMarine) a aussi révélé une activité inductrice sur l'activité de la nitrate réductase (Durand et al., 2003).

Certains extraits d'algues montrent des propriétés antioxydantes, et agissent en synergie avec la vitamine E (Le Tutour, 1990). Le Tutour a alors identifié la chlorophylle a comme le principal composé actif des extraits (Le Tutour et al., 1998).

### V.E. Substances marines, phytohormones et azote.

L'azote est essentiel à la croissance et au développement des plantes, et, en ce sens, l'azote est facteur nutritionnel important. Les plantes ont aussi la capacité de sentir leur statut azoté interne et externe, et de s'adapter aux variations des conditions azotées en modifiant l'expression des gènes, les activités enzymatiques et les contenus en métabolites (Stitt et al., 2002). Cette capacité à orchestrer ces changements de disponibilité en azote, nécessite un réseau de signalisation efficace et intégré. L'azote devient alors un facteur de signalisation. Le nitrate est la première molécule signal en activant l'expression des gènes liés à l'assimilation de l'azote (Wang et al., 2000). De nouvelles molécules signal intervenant dans la propagation des signaux azotés sont aujourd'hui proposées. Parmi celles-ci les cytokinines et les auxines





semblent jouer un rôle central de communication de la disponibilité en azote entre les racines et les feuilles (Walch-Liu et al., 2005). Certains extraits algaux sont riches en auxines ou en cytokinines. Aussi peut-on supposer une interaction entre ces phytohormones d'origine marine et l'intégration des signaux azotés par la plante.

Les cytokinines sont impliquées dans de nombreux processus développementaux comme la division cellulaire, la formation et la régénération des organes, la dominance apicale, le développement vasculaire la mobilité des nutriments, et la sénescence (Mok, 1994). Les cytokinines interviendraient dans la propagation du statut azoté des racines vers les feuilles via le xylème (Takei et al., 2001, 2002). Nitrate et biosynthèse des cytokinines sont étroitement reliés. En effet l'expression de deux adénosine isopentényltransférases phosphate (premier enzyme de la voie de biosynthèse des cytokinines, IPT), est modulée par la disponibilité en azote (Miyawaki et al., 2004; Takey et al., 2004). *AtIPT3* est rapidement induite par le nitrate alors que *AtIPT5* répond aussi bien à un traitement prolongé de nitrate ou d'ammonium. Suite à une période de carence en azote, la fourniture de nitrate induit aussi l'expression de certains gènes de type ARR (Arabidopsis Response Regulators), qui interviennent dans la réponse aux cytokinines (Taniguchi et al., 1998; D'Agostino et al., 2000). Les cytokinines pourraient aussi agir comme médiateurs systémiques dans le sens inverse, c'est-à-dire des feuilles vers les racines. Les cytokinines issues des feuilles et transportées vers les racines via le phloème, pourraient ainsi jouer un rôle intégrateur, en régulant l'absorption du nitrate en réponse aux variations du statut azoté de la partie aérienne (Walch-Liu et al., 2005).

Les auxines de la partie aérienne sont importantes pour l'émergence des racines latérales chez des plantules d'*Arabidopsis* (Bhalerao et al., 2002). Les auxines représentent donc de bons candidats pour médier le signal systémique permettant l'inhibition du développement des racines latérales en réponse à une accumulation de nitrate dans les feuilles (Forde, 2002). Cette accumulation de nitrate dans les feuilles pourrait inhiber la biosynthèse des auxines ou leur chargement dans le phloème, entraînant ainsi un contenu en auxines trop faible pour favoriser la formation des primordia des racines latérales (Forde, 2002). L'initiation des racines latérales est fortement inhibée chez des plantes cultivées sur un milieu contenant une forte dose de carbone par rapport à l'azote, et cette inhibition semble dépendre de la régulation du transport d'auxines (Malamy & Ryan, 2001).

Le transporteur *AtNRT1.1* est aussi régulé par les auxines dans les feuilles et les racines (Guo et al., 2002).



Les extraits d'algues marines semblent donc présenter des propriétés intéressantes qui pourraient être exploitées à plus grande échelle en agriculture et horticulture. Ce sont généralement des mélanges complexes de plusieurs algues, dont la nature varie, pour une même algue selon le mode de préparation, et aussi, pour un même produit commercial selon le lot considéré (qualité de l'algue, date de récolte, ...). Aussi, les firmes commerciales doivent elles assurer la standardisation de leurs lots d'extraits marins, caractériser la (ou les) biomolécule(s) responsable(s), et déterminer son (leur) mode d'action, afin d'envisager le développement de ces extraits marins sur le marché.

## **VI. Contexte, objectifs & stratégies de travail.**

La société BiotechMarine, implantée sur la côte nord de la Bretagne (Pontrieux, Côtes d'Armor), à proximité de l'archipel de Bréhat, et qui produit et commercialise des substances d'origine algale ainsi que des engrais azotés chimiques, est confrontée à ces exigences. Ainsi, BiotechMarine a contacté l'INRA de Versailles, et collabore depuis 1997 avec le laboratoire de la Nutrition Azotée des Plantes. Le projet initial consistait à décrypter les modalités d'action des substances marines à l'origine de leurs effets sur le métabolisme azoté de la plante. Au préalable, il s'agissait de valider ces effets stimulateurs sur la nutrition azotée des plantes, notamment par des mesures d'activité de la nitrate réductase, avant d'identifier la (ou les) molécule(s) responsable(s) et comprendre son (leur) mécanisme d'action (Durand et al., 2001). Au fil des ans, un autre aspect s'est ajouté à ce projet, BiotechMarine partant du constat que les engrais à base d'urée sont peu utilisés en France à la différence du reste du monde.

Ma thèse financée par une convention CIFRE (Convention Industrielle de Formation par la REcherche) traite de ce double aspect. L'analyse bibliographique fait apparaître que les connaissances sur les effets d'un apport d'urée sur la physiologie et le métabolisme des plantes restent finalement très incomplètes. D'autre part, les cinq années d'études menées par Nathalie Durand n'ont pas permis d'identifier la (ou les) molécule(s) active(s) des extraits fournis par la société BiotechMarine. L'objectif de cette étude est de mieux appréhender l'effet des différentes formes azotées sur le métabolisme des plantes, et ainsi de situer plus clairement l'intérêt des fertilisants azotés uréiques vis-à-vis du nitrate et de l'ammonium. Le second volet de cette étude porte sur la nature et la compréhension des interactions entre métabolisme azoté et bio-stimulants apportés par la pulvérisation de substances marines. A



plus long terme, le but de ce projet est d'améliorer la fertilisation azotée tout en satisfaisant aux exigences de rendement des cultures et au souci de protection de l'environnement.

Les plantes de grandes cultures telles que le maïs et le blé ont été nos premiers matériels d'étude. Nous avons ensuite utilisé la plante modèle *Arabidopsis thaliana* pour analyser plus finement les réponses et notamment pour accéder aux gènes.

Ma thèse se découpe en deux grands volets qui seront respectivement détaillés dans les parties I et II de ce mémoire. La première partie porte sur l'étude de l'impact de l'urée sur la croissance et le métabolisme azoté de la plante, mais aussi sur les systèmes de transport d'azote, nitrate, ammonium et urée. Ces études physiologiques ont été complétées par une analyse transcriptomique dans le but d'identifier des gènes cibles répondant à l'urée. Dans la deuxième partie, nous avons testé l'efficacité de la pulvérisation foliaire d'un extrait d'algue fourni par notre partenaire industriel sur la croissance et les paramètres liés au métabolisme azoté de la plante. Nous l'avons vu précédemment, les connaissances actuelles sur les modalités d'action des substances algales sont assez limitées. Afin de mieux comprendre les voies de signalisation de ces substances, nous avons par ailleurs choisi une étude transcriptomique. Cette approche systématique nous permet ainsi de n'avoir aucun *a priori* sur le type de résultats obtenus, et d'ouvrir au maximum les champs d'investigation sur ce sujet afin de rechercher de nouvelles cibles au cœur du métabolisme du végétal.



# CHAPITRE I

## EffiCaCité d'utilisation de l'urée par les Céréales.

### I. Mise au point d'un système de culture avec l'urée.

Le laboratoire de la Nutrition Azotée des Plantes (NAP) a acquis une grande renommée au niveau national et international de par son savoir-faire dans le domaine de la nutrition nitrique et ammoniacale des plantes. Au cours des années 70, les solutions nutritives équilibrées appelées solutions Coïc-Lesaint du nom de leurs auteurs (Coïc and Lesaint, 1975) ont été mises au point au laboratoire pour une utilisation en culture hydroponique. Par contre, l'urée n'était pas une source d'azote étudiée au NAP. Notre premier travail, déterminant pour la suite du projet, a donc consisté en la mise au point de techniques culturales précises sur milieu contenant de l'urée, afin d'étudier les conséquences de l'alimentation azotée sous forme urée sur la croissance des plantes, par comparaison avec une alimentation sous forme ammonium ou nitrate.

Nous avons choisi la culture en hydroponie car c'est un système où la nutrition minérale est parfaitement contrôlée. En outre, nous avons ainsi facilement accès aux racines. Nous avons initié cette étude avec le maïs et le blé, plantes de grandes cultures ayant un intérêt agronomique majeur. Nous avons ensuite utilisé la plante modèle *Arabidopsis thaliana* pour des analyses plus fines, et notamment pour pouvoir étudier les gènes impliqués dans l'assimilation de l'urée (Figure 12). Notre choix pour une concentration de 2 mM d'azote dans l'ensemble des solutions nutritives se base sur des travaux antérieurs, dans le but d'éviter toute toxicité ammoniacale pour les plantes (Chaillou et al., 1991). La composition des différentes solutions utilisées pour la culture en hydroponie est détaillée dans les Tableaux 1 et 2.

Nous devons aussi nous assurer que les formes d'azote apportées n'évoluaient pas au cours du temps dans le milieu de culture hydroponique. Pour cela nous renouvelions les solutions de culture tous les deux jours. En outre, plusieurs contrôles étaient effectués quotidiennement: (i) suivi (pHmètre électronique) et réajustement du pH afin d'éviter une acidification de la

**Tableau 1. Composition des solutions pour la culture hydroponique du maïs et du blé.**

	Coïc-Lesaint	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,9 mM	0,9 mM	0,9 mM	0,9 mM
KNO <sub>3</sub>	1,4 mM	-	-	-
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,8 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0,65 mM	0,65 mM	0,65 mM	0,65 mM
CaCl <sub>2</sub>	2,35 mM	2,35 mM	2,35 mM	2,35 mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,3 mM	1 mM	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	1 mM	-
CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	-	-	-	1 mM
Oligoéléments*	0,1 mL L <sup>-1</sup>	0,1 mL L <sup>-1</sup>	0,1 mL L <sup>-1</sup>	0,1 mL L <sup>-1</sup>
Fer-DTPA	22 g L <sup>-1</sup>	22 g L <sup>-1</sup>	22 g L <sup>-1</sup>	22 g L <sup>-1</sup>

\* 23 µM B; 9 µM Mn; 0.3 µM Mo; 0.95 µM Cu; et 3.5 µM Zn.

**Tableau 2. Composition des solutions pour la culture hydroponique d'Arabidopsis.**

	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> + CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Carence
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	2,2 mM	2,2 mM	2,2 mM	2,2 mM	2,2 mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 mM	0,5 mM	-	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	1 mM	1 mM
CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	-	0,5 mM	1 mM	-	-
Oligoéléments*	1 mL L <sup>-1</sup>	1 mL L <sup>-1</sup>	1 mL L <sup>-1</sup>	1 mL L <sup>-1</sup>	-
Fer Sequestrène	10 mg L <sup>-1</sup>	10 mg L <sup>-1</sup>	10 mg L <sup>-1</sup>	10 mg L <sup>-1</sup>	10 mg L <sup>-1</sup>

\* 23 µM B; 9 µM Mn; 0.3 µM Mo; 0.95 µM Cu; et 3.5 µM Zn.



solution ammoniacale; (ii) présence de nitrate pour vérifier qu'il n'y avait pas eu nitrification dans les solutions ammoniacale et uréique (bandelettes Quantofix®); (iii) présence d'ammonium pour vérifier que l'urée n'avait pas été hydrolysée (kit Aquaquant NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Merck). Nous avons ainsi pu obtenir des conditions de culture nous permettant l'utilisation de l'urée comme seule source d'azote, quel que soit le matériel d'étude végétal. Ces conditions de culture sont discutées plus avant dans les deux articles qui suivent.

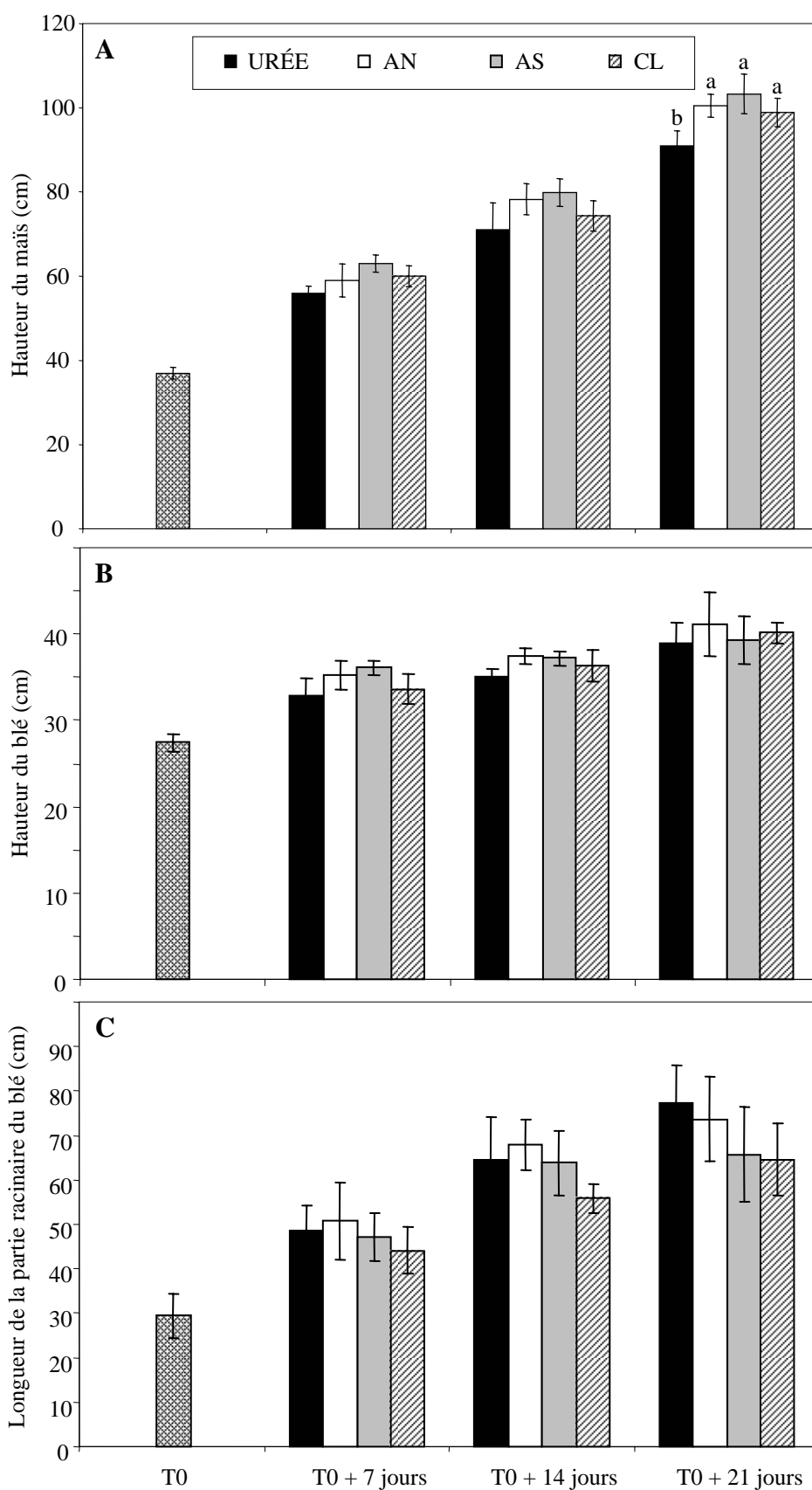
## II. Article 1 - Urea use efficiency of hydroponically grown maize and wheat plants -

**Article soumis à *Journal of Plant Nutrition* et accepté pour publication sous réserve de modifications.**

Cet article rassemble les réponses physiologiques et métaboliques de deux plantes de grandes cultures (maïs et blé), à une alimentation azotée sous forme urée, par comparaison avec une nutrition sous formes ammonium nitrate ou ammonium sulfate. Alors que l'urée entraîne une croissance moindre par rapport aux autres sources azotées testées, le développement des racines est favorisé par rapport à celui des parties aériennes. D'autre part, l'azote apporté sous forme urée est faiblement absorbé par les plantes. Enfin, maïs et blé répondent différemment à l'urée en terme de croissance et de métabolisme azoté.







**Figure 13. Evolution de la hauteur du maïs et du blé.**

T0 représente le début du traitement azoté sous la forme urée, AN, AS, ou CL. Les valeurs sont des moyennes de 6 répétitions. Les différentes lettres correspondent aux groupes significativement différents à  $P < 0,05$ .

### III. Résultats complémentaires obtenus au cours de la culture en hydroponie.

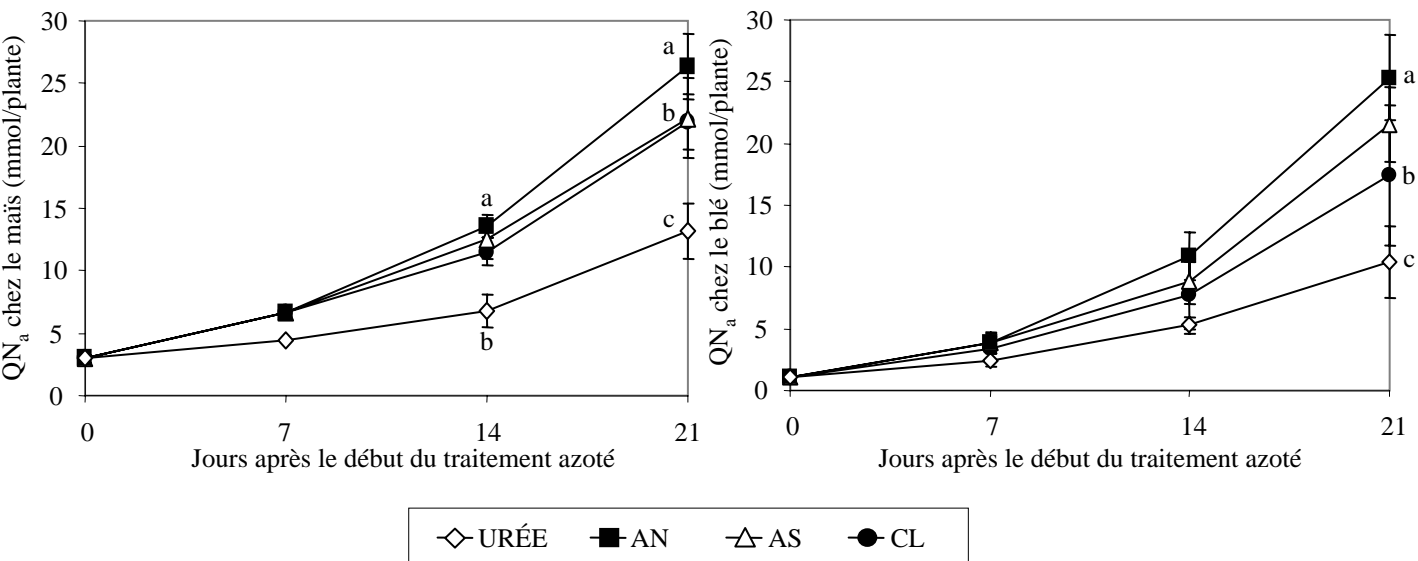
Nous reprendrons ici les mêmes abréviations que celles utilisées dans l'article 1: AN pour ammonium nitrate; AS pour ammonium sulfate; et CL pour Coïc-Lesaint.

#### III.A. Evolution de la hauteur des plantes.

La longueur des parties aériennes des plantules de maïs et de blé a été mesurée à chaque prélèvement hebdomadaire, du collet à la pointe des feuilles étirées. Ces mesures ont été complétées par celles de la longueur des racines chez le blé (Figure 13A, B, C).

Les mesures de la longueur des parties aérienne et racinaire à chaque prélèvement montrent une croissance homogène quelque soit la source d'azote et l'espèce végétale considérée (Figure 13A, B, C). L'évolution de la taille des plantes de maïs corrobore sa cinétique de croissance (Figure 13A et Figure 1A de l'Article 1). Chez le maïs, des brûlures apparaissent au niveau de la courbure des plus grandes feuilles des plantes ayant eu un apport en AN et en AS quelques jours avant le deuxième prélèvement. Ces symptômes semblent témoigner d'une toxicité de la nutrition ammoniacale. La surface des brûlures est plus importante chez les plantes cultivées sur AS que sur AN. On observe également de très légères brûlures pour les plantes témoin CL (la solution fournit un très léger apport en ammonium). Aucun symptôme n'est détecté sur les plantes poussant sur urée; leurs feuilles sont toutefois d'une couleur plus jaune que celles des plantes soumises aux autres traitements. Ce jaunissement pourrait traduire un symptôme de sénescence relié à une dégradation partielle de la chlorophylle en réponse à une limitation en azote pour ces plantes sur urée (Diaz et al., 2006). Un dosage de la chlorophylle dans la partie aérienne des plantes pourrait confirmer cette hypothèse.

Chez le blé, la hauteur de la partie aérienne évolue peu au cours des 21 jours de culture. Par contre, l'allongement des racines est beaucoup plus important indépendamment de la source azotée. L'ampleur de cet allongement racinaire semble plus prononcé pour les plantules de blé alimentées avec de l'urée (Figure 13C). Aucune différence visuelle quant à l'aspect des plantes n'est à constater, contrairement à ce que l'on a observé chez le maïs. Nous avons aussi compté le nombre de talles à chaque prélèvement, et l'évolution du nombre de talles révèle les mêmes différences que celles de la courbe de croissance, en fonction de la source d'azote présente dans la solution nutritive (Article 1).



**Figure 14. Quantité d'azote absorbée par le maïs et le blé au cours des trois semaines de traitement azoté, sous forme urée, ammonium nitrate, et ammonium sulfate.**

La quantité d'azote absorbée ( $QN_a$ ) est calculée pour la plante entière et les valeurs sont des moyennes de 6 répétitions. Les différentes lettres correspondent aux groupes significativement différents à  $P < 0,05$ .

### III.B. Quantité d'azote prélevé par les plantes.

En partant des valeurs de la teneur en azote total mesurée dans la plante, nous avons calculé pour chaque prélèvement, la quantité totale d'azote prélevé par la plante (Figure 14). Pour cela, la concentration en azote total ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  poids sec) a été multipliée par le poids sec de la plante entière en g. Au cours des 21 jours de culture les valeurs de quantité d'azote total prélevé pour chacun des 3 traitements AN, AS et urée sont semblables pour le maïs et le blé. Alors que la quantité d'azote apporté pour chaque traitement est identique, la quantité d'azote total absorbé par les plantes nourries avec de l'urée reste faible au cours du temps par rapport aux trois autres conditions azotées (Figure 14). L'azote apporté sous forme de la molécule urée semble donc plus difficilement absorbé pour les plantes que les ions nitrate ou ammonium. Notons que, dans tous les cas, la quantité de l'azote absorbé au cours des sept derniers jours de culture est la plus forte. Les plantes sont alors en pleine croissance et la demande en azote devient plus importante.

### IV. Utilisation de l'urée par le blé en conditions proches du champ.

Dans nos conditions de culture hydroponique, l'azote apporté n'a pas subi de transformations et les plantes ont donc été directement au contact de l'élément azoté ajouté en l'état. Nous avons ainsi pu montrer que l'absorption de l'azote sous forme d'urée est faible. Lorsque l'urée est apportée au champ, les racines des plantes sont simultanément exposées à trois sources d'azote: urée, ammonium et nitrate. La présence d'urée se limite à une brève période du fait de la rapidité de son hydrolyse par les uréases du sol. Les principales sources d'azote pour les plantes sont donc l'ammonium et le nitrate. Afin de tenir compte des transformations des formes azotées qui existent dans les conditions naturelles, nous nous sommes rapprochés des conditions agricoles en réalisant une culture de blé en pots, sur sol non fertilisé en azote minéral. En outre, avec l'utilisation des isotopes stables (urée, ammonitrate, ammosulfate marqués à l'azote  $^{15}\text{N}$ ), nous pensions obtenir quelques éléments de réponse quant à la cinétique d'absorption de l'urée par rapport aux autres sources azotées, mais aussi sur la nature de la forme d'azote absorbé en conditions naturelles.

**Tableau 3. Propriétés pédologiques du sol utilisé pour la culture de blé en pots.**

Granulométrie ( $\text{g kg}^{-1}$ )		(g $\text{kg}^{-1}$ )			
Argile	169	C organique	N organique	Calcaire	pH eau
Limon fin	181				
Limon grossier	406	14,5	0,87	2	7,5
Sable fin	216				
Sable grossier	28				

**Tableau 4. Solution de fertilisation de fond pour la culture de blé en pots.**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,56 mM
$\text{K}_2\text{PO}_4\text{H}$	0,85 mM
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2(1\text{H}_2\text{O})$	2,525 mM
$\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$	3,5 mM
Oligoéléments*	9,2 mL. $\text{L}^{-1}$
Fer Sequestrène	0,9 g. $\text{L}^{-1}$

\* 23  $\mu\text{M}$  B; 9  $\mu\text{M}$  Mn; 0.3  $\mu\text{M}$  Mo; 0.95  $\mu\text{M}$  Cu; et 3.5  $\mu\text{M}$  Zn.



**Figure 15. Culture du blé en pots.**  
Les plantes sont âgées de 26 jours.



## IV.A. Mise en place du dispositif expérimental de culture.

Afin de mener à bien nos expérimentations, nous recherchions un sol au pH neutre, et avec un reliquat d'azote minéral faible. Le sol utilisé pour ces expérimentations provient de la parcelle La Cage sur les terres de Versailles, sans fertilisation minérale depuis cinq ans. Le sol a été prélevé au printemps dans l'horizon 0-30 cm, séché à l'air libre en serre, puis tamisé. Le reliquat moyen d'azote du sol a été mesuré: il atteint  $14 \text{ kg ha}^{-1}$ , ce qui correspond à un reliquat faible pour les agronomes (Patrick Saulas, Agronomie, INRA Versailles-Grignon). Sa nature et sa composition sont aussi détaillées dans le Tableau 3.

Les premiers tests de germination sur ce sol n'ont pas été concluants, le sol étant beaucoup trop argileux. Finalement le plus judicieux s'est avéré être l'utilisation d'un substrat composé de ce sol et de sable de fontainebleau inerte (50/50). Cent pots de un litre ont été préparés à l'identique: au fond, une couche d'argile expansé pour le drainage, surmontée du mélange sol et sable. Chaque pot a reçu une fumure de fond apporté en solution (250 mL; Tableau 4). Nous avons cultivé 3 plantes de blé (cv. Courtot) par pot. Les pots ont été installés en serre non climatisée, et l'arrosage a été effectué avec de l'eau déminéralisée par sub-irrigation dès que le sol s'asséchait. Jusqu'au tallage du blé, les plantes ont utilisé uniquement l'azote du sol pour leur croissance. Nous avons également arrosé par sub-irrigation deux pots avec une solution nutritive complète Coïc-Lesaint (Coïc & Lesaint, 1971), ces pots constituant des témoins de croissance optimale. Nous avons effectué deux essais au cours de deux étés successifs (Figure 15).

### IV.A.1. Essai 1.

Un mois après le semis, les plantes étaient au stade tallage. Les 100 pots ont alors été séparés en deux lots de 50 pots. Un premier apport d'azote a été effectué sur les 150 plantes d'un lot de 50 pots, 32 jours après le semis, et sous 3 formes: urée, ammonium nitrate et ammonium sulfate, marqués à l'azote  $^{15}\text{N}$ . Nous avons ainsi fertilisé ces plantes avec 100 mL de solution azotée par pot à l'aide d'une seringue, chaque solution apportant 0,05 g de  $^{15}\text{N}$  enrichi à 5%. La même quantité d'azote  $^{14}\text{N}$  a été apportée au deuxième lot de 50 pots sous la forme d'une solution de  $\text{KNO}_3$ . Ces pots ont alors été cultivés encore 20 jours jusqu'à montaison, où un deuxième apport d'azote sous la forme  $^{15}\text{N}$ , identique à celui effectué sur le premier lot de pots, a été réalisé. Ceux-ci ont donc reçu 0,1 g d'azote au total par pot (0,05 g de  $^{14}\text{N}$  + 0,05 g



de  $^{15}\text{N}$ ), ce qui correspond environ à la quantité normalement épanchée en agriculture sur une culture de blé. Un, 3 et 8 jours suivant chaque apport de  $^{15}\text{N}$ , 12 plantes (4 pots) ont été récoltées par traitement azoté. Le choix des différentes dates de prélèvement a été motivé par la vitesse avec laquelle l'urée évolue vers l'ammonium par hydrolyse. Des études antérieures ont montré que 30 à 60% de l'urée est hydrolysée au cours de la première journée dans différents sols en étuve à 28°C. L'hydrolyse est totale au bout de 4 jours (Soubies et al., 1955). Ainsi nous pensions pouvoir comparer la cinétique d'absorption de l'urée à celle des autres formes azotées, et ainsi obtenir des indications quant à la forme d'urée absorbée, moléculaire ou dégradée.

À chaque prélèvement, parties aérienne et racinaire ont alors été séparées, pesées, puis congelées dans l'azote liquide. Le matériel végétal récolté a été lyophilisé, pesé et réduit en poudre afin de réaliser les dosages de l'azote total et du  $^{15}\text{N}$ , du nitrate et des acides aminés.

#### IV.A.2. Essai 2.

Ce deuxième essai a été réalisé un an après le premier. Nous avons respecté un schéma de culture identique au premier essai, notamment les dates du semis et des apports d'azote. Les résultats du premier essai (cf IV.B.) nous ont conduit à modifier quelques points du protocole de culture pour ce deuxième essai: ils sont précisés ci-après.

Un seul apport de  $^{15}\text{N}$  a été réalisé au stade montaison, l'ensemble des pots ayant reçu une solution de  $\text{KNO}_3$  au stade tallage. Par rapport au premier essai, 4 traitements supplémentaires azotés ont été effectués: urée + uréase (Sigma<sup>®</sup>) + nickel (le nickel est le cofacteur de l'enzyme uréase); urée + Agrotain (IMC AGRICO<sup>®</sup>, inhibiteur d'uréase); ammonitrate + uréase + nickel; et ammonitrate + Agrotain, ces deux derniers traitements servant de contrôles. Suivant les indications des fournisseurs, nous avons apportés 100 unités d'enzyme par pot telles que l'urée apportée soit totalement hydrolysée en 30 min, et l'Agrotain a été utilisé à une concentration finale de 10  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Le nickel a été ajouté à 0,4  $\mu\text{M}$  (Gerendás et al., 1998).



### IV.A.3. Protocole des dosages.

#### IV.A.3.a Les analyses $^{15}\text{N}$ et le dosage de l'azote total.

La composition isotopique de chaque échantillon est déterminée par une analyse par spectrométrie de masse. 5 à 7 mg de poudre de matière sèche végétale sont pesés dans une nacelle d'étain, brûlés, et l'azote gazeux formé est dosé (combustion Dumas). Pour l'essai 1, les analyses  $^{15}\text{N}$  ont été effectuées avec l'autoanalyseur d'azote Roboprep CN couplé à un spectromètre de masse Tracermass (Europa Scientific). Pour l'essai 2, les analyses  $^{15}\text{N}$  ont été effectuées avec l'autoanalyseur EA EuroVector S.P.A. et le spectromètre de masse Isoprime (GV Instruments). Ces analyses  $^{15}\text{N}$  ont été prises en charge par Pascal Tillard, au Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, dans l'Atelier des Isotopes Stables, à l'INRA de Montpellier. En sortie analytique, nous obtenons à la fois la composition en azote total de l'échantillon (%  $\text{N}_t$ ), et l'abondance isotopique du gaz (A% Echantillon).

La quantité de  $^{15}\text{N}$  provenant de l'absorption pendant le marquage, présente dans les feuilles à la récolte, se définit comme suit (Deléens et al., 1997):

$$Q^{15}\text{N}_a \text{ feuilles} = \text{A\% excès feuilles} \times Q \text{ N}_t \text{ feuilles}$$

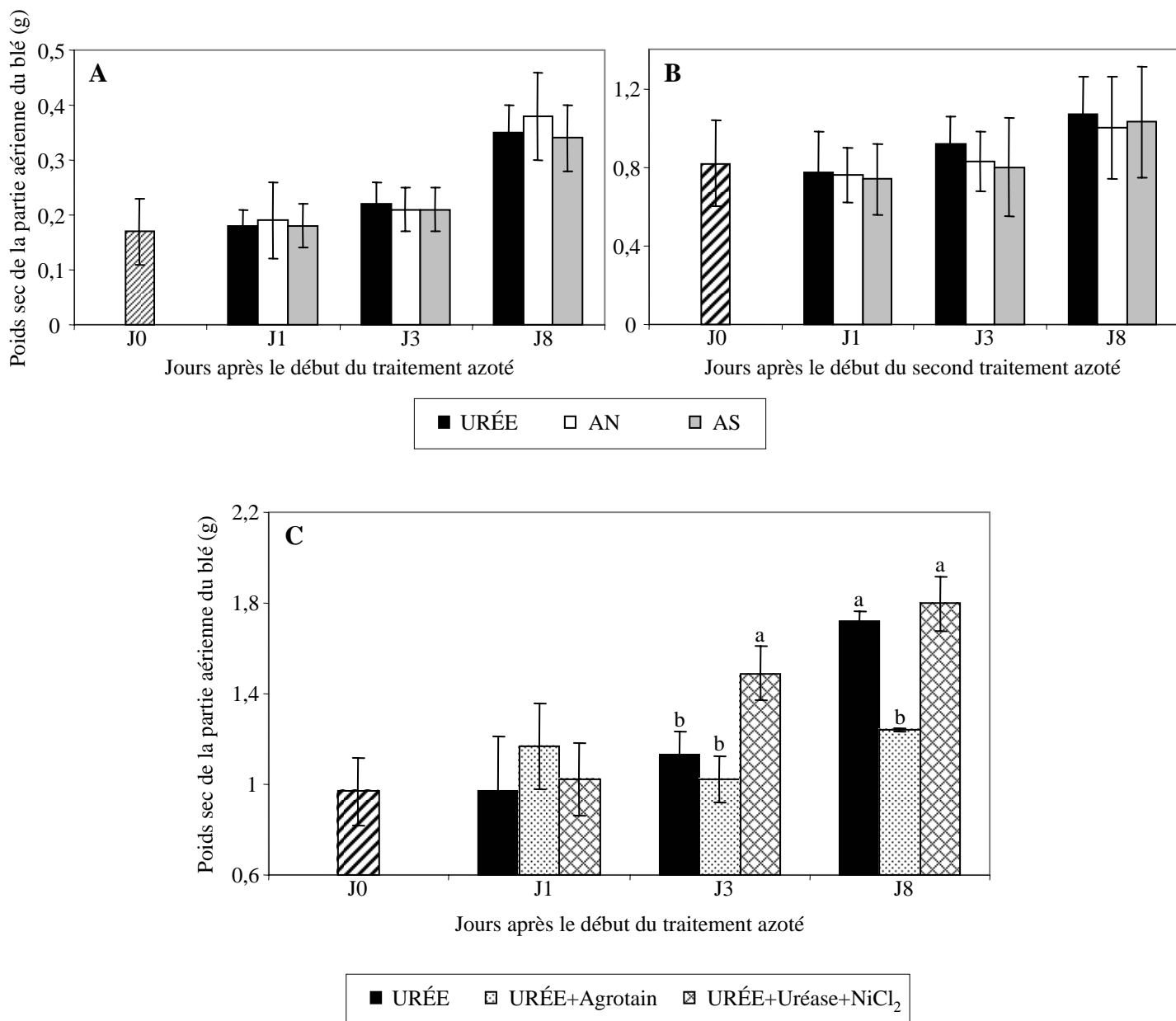
$$\text{A\% Echantillon} = \left[ \frac{^{15}\text{N}}{(^{14}\text{N} + ^{15}\text{N})} \right] \times 100$$

$$\text{A\% excès} = \text{A\% Echantillon} - \text{A\% Témoin}$$

L'excès isotopique (A% excès) représente la teneur ou abondance en isotope lourd entre l'échantillon traité et l'échantillon témoin.

#### IV.A.3.b Le dosage du nitrate et des acides aminés totaux.

Le dosage du nitrate ainsi que celui des acides aminés totaux ont déjà été décrits (Loudet et al., 2003).



**Figure 16. Evolution de la biomasse sèche de la partie aérienne du blé.**

Les plantes sont cultivées en pots placés en serre, et deux essais sont réalisés au cours de deux étés successifs. Lors de l'essai 1, un apport d'azote  $^{15}\text{N}$  est effectué sur un premier lot de plantes, 32 jours après le semis sous la forme urée, ammonium nitrate (AN) et ammonium sulfate (AS) (A). Le même jour, un deuxième lot de plantes est fertilisé avec la même quantité d'azote sous forme  $\text{KNO}_3$ , 20 jours après, ce deuxième lot de plantes reçoit un apport de  $^{15}\text{N}$  identique à celui effectué sur le premier lot de plantes (B). Pour l'essai 2, un apport d'azote sous forme  $\text{KNO}_3$  est effectué 29 jours après le semis. L'apport de  $^{15}\text{N}$  est effectué 48 jours après semis sous la forme urée, additionné ou pas d'Agrotain, un inhibiteur d'uréase, ou d'uréase et de son cofacteur le nickel (C). Les valeurs sont respectivement des moyennes de 12 et de 3 répétitions pour l'essai 1 et 2. Les différentes lettres correspondent aux groupes significativement différents à  $P < 0,05$ .

#### IV.A.4. Analyse statistique.

L'ensemble de nos données a été soumis à une analyse de variance (ANOVA) sur XLStat-Pro 7.5 (Addinsoft). Le test de Newman-Keuls au seuil  $\alpha = 5\%$  a été réalisé pour comparer les traitements.

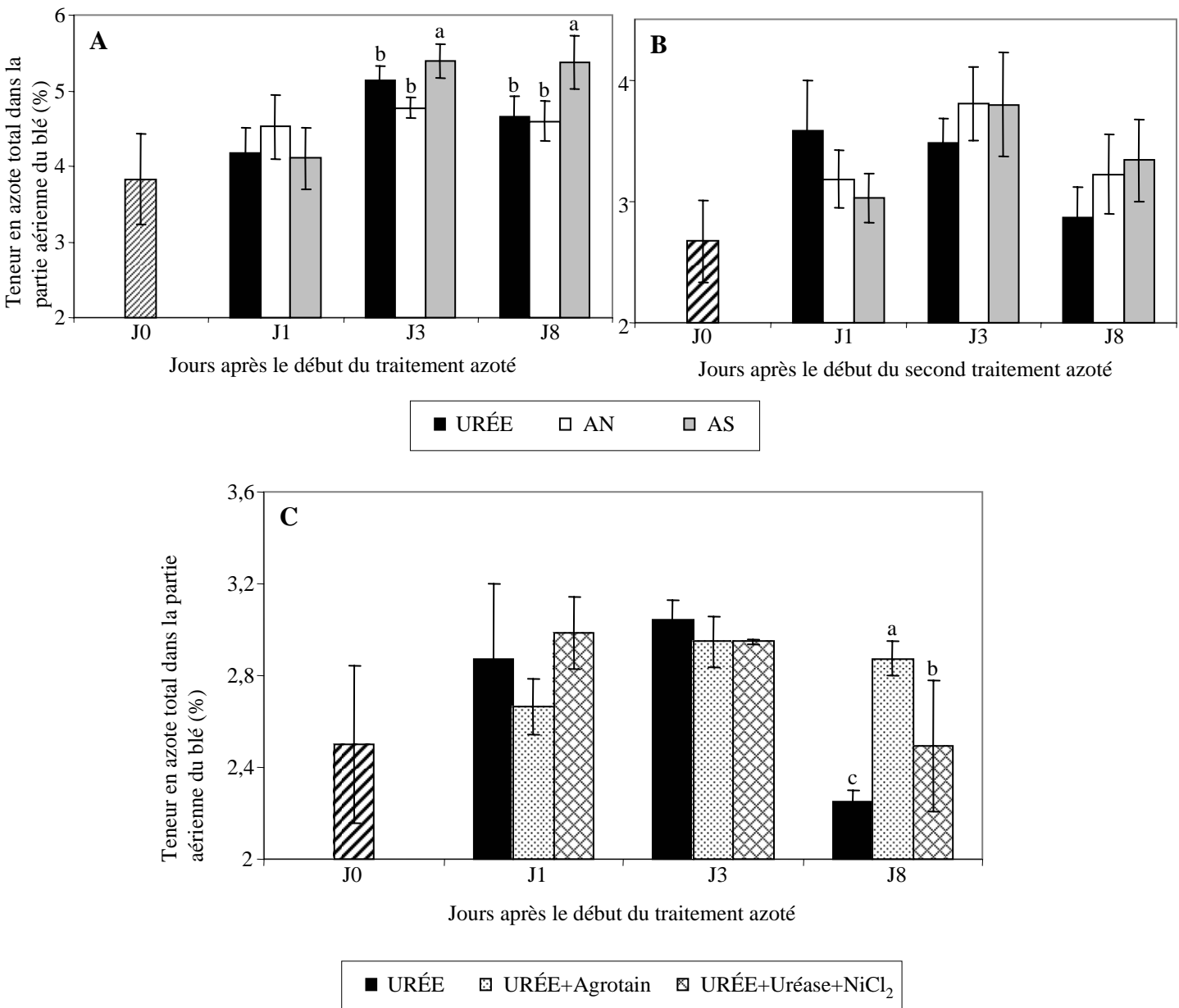
#### IV.B. Résultats et discussion.

Malgré nos soins, la récolte des racines a été difficile et nous avons perdu beaucoup de matériel. Les résultats que nous avons obtenus sont de ce fait erronés, et nous avons choisi de ne pas les mentionner dans ce mémoire. Les résultats qui suivent concernent donc uniquement la partie aérienne. D'autre part, nous présenterons ici uniquement les résultats obtenus au cours de l'essai 1 car ceux de l'essai 2 sont globalement similaires pour les traitements urée, ammonium nitrate (AN) et ammonium sulfate (AS). Pour contre, les résultats de l'essai 2 obtenus avec les 3 traitements contenant de l'urée seront présentés.

##### IV.B.1. Croissance et statut azoté initial des plantes avant les apports d'azote.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent (cf IV.A.), les plantes ont été séparées en deux lots, chaque lot ayant reçu des apports d'azote différents. Pour l'un des lots, un seul apport d'azote sous les trois formes U, AN et AS marqués à l'azote 15, a été effectué 32 jours après le semis. L'autre lot a reçu, à la même date, la même quantité d'azote mais sous forme  $K^{14}NO_3$ . Vingt jours après, un deuxième apport d'azote a été effectué sur ces mêmes plantes sous les trois formes U, AN et AS marqués à l'azote 15. L'analyse de la croissance (Figure 16) et du statut azoté (Figures 17 à 20) de l'ensemble de ces plantes au jour zéro (J0, date des apports d'azote) nous a permis d'établir une caractérisation assez fine de 'l'état métabolique' des plantes juste avant les apports de  $^{15}N$ .

Pour le premier lot de plantes ayant reçu un seul apport d'azote, la teneur moyenne en azote total est de 4% à J0 (Figure 17A) (elle s'élevait à 7% chez des blés âgés d'une vingtaine de jours et cultivés en hydroponie sur 2 mM  $NH_4NO_3$ , Article1). La teneur en nitrate est de 100  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de poids sec (Figure 19A) (contre 800  $\mu\text{mol}$  de nitrates  $\text{g}^{-1}$  de poids sec chez le blé en hydroponie, Article 1), et seulement des traces d'acides aminés sont retrouvées dans les



**Figure 17. Evolution de la teneur en azote total dans la partie aérienne du blé.**

Les conditions de culture sont les mêmes que pour la Figure 16. Les différentes lettres correspondent aux groupes significativement différents à  $P < 0,05$ .



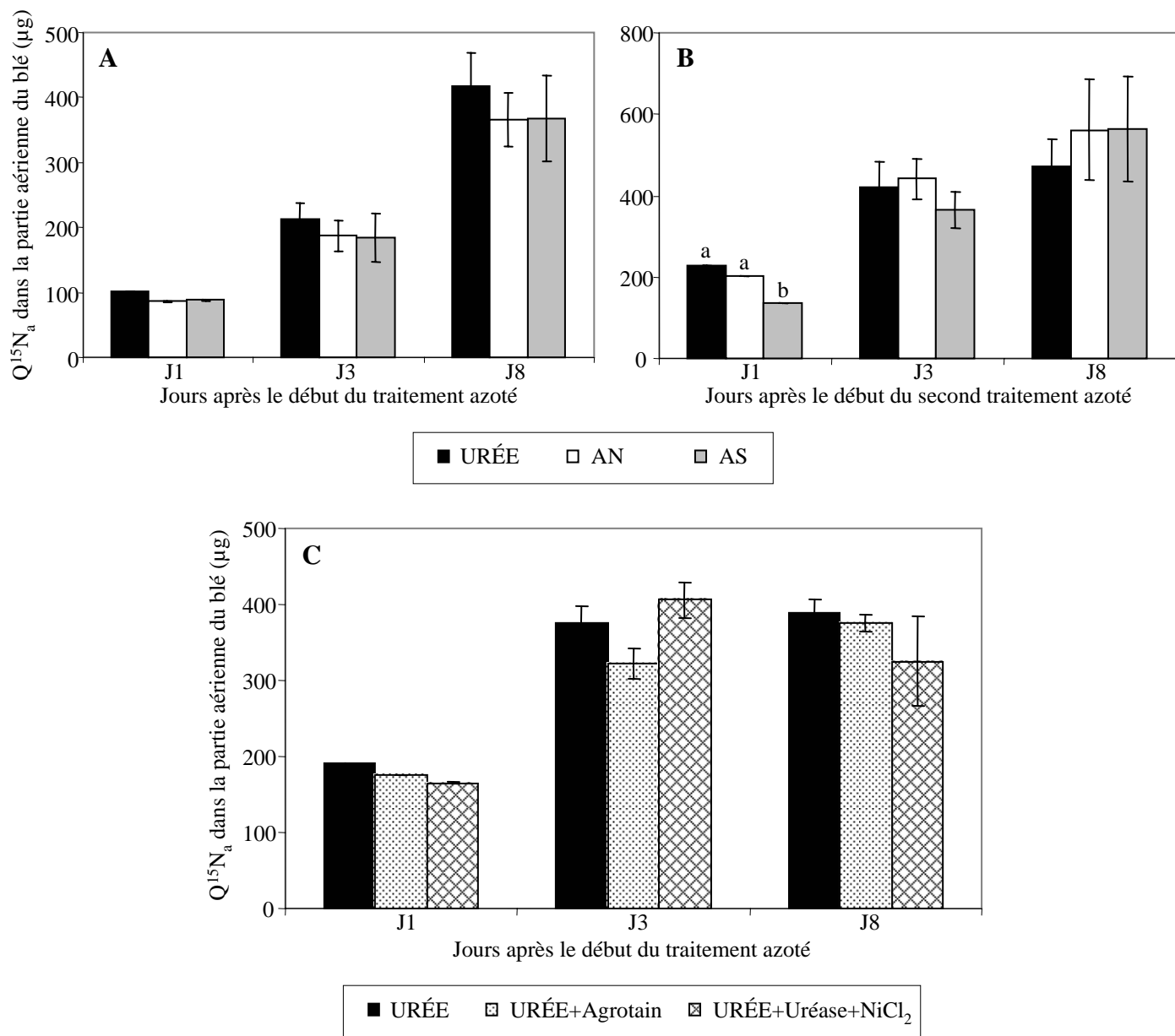
feuilles du premier lot de plantes, n'ayant pas encore reçu d'azote (Figure 20A). Toutes ces données traduisent une certaine limitation en azote, ce qui est en accord avec les observations comparées entre ces plantes et les témoins de croissance optimale. En Effet, les deux pots témoins Coïc-Lesaint présentaient des plantules plus 'grasses' à J0, avec un limbe plus étalé par rapport aux blés irrigués avec de l'eau. Les blés étant déficients en azote, l'apport de  $^{15}\text{N}$  a donc été efficace. Toutefois la présence d'azote et de nitrate dans la partie aérienne des plantes n'ayant encore reçu aucune fertilisation azotée implique que les plantes ont utilisé l'azote issu de la minéralisation naturelle de l'azote organique du sol pour assurer leur croissance jusqu'à ce stade.

Pour le deuxième lot de plantes préalablement fertilisé avec du  $\text{KNO}_3$  avant l'apport de  $^{15}\text{N}$  (J0), seulement 2,7% d'azote total sont présents dans les feuilles (Figure 17B). Cependant, une semaine après l'apport de  $^{15}\text{N}$  aux plantes du premier lot (Figure 17A), le pourcentage moyen d'azote total est proche de 5%. Au cours des douze jours séparant les points J8 (premier lot) et J0 (deuxième lot), la croissance des plantes est forte (Figure 16A, B), ce qui entraîne cette dilution de l'azote à J0. Le contenu en nitrate confirme l'état de carence des plantes puisque très peu de nitrates sont mesurés à J0 chez ce deuxième lot de plantes (Figure 19B). Aussi notre apport de  $\text{KNO}_3$  a seulement servi au maintien de la croissance des plantes. En revanche nous retrouvons des acides aminés, issus de l'assimilation du nitrate apporté 20 jours avant (Figure 20B). Ainsi ces plantes semblent avoir épuisé leurs réserves en azote pour la production d'acides aminés et de protéines, et ainsi poursuivre leur croissance (Figure 16B).

Notons que les résultats de l'essai 2 (Figures 16C, 17C, 18C, 19C et 20C) concernant l'ensemble des paramètres mesurés pour le traitement urée sont globalement semblables à ceux de l'essai 1 (Figures 16B, 17B, 18B, 19B et 20B). Ces observations consolident notre étude.

#### IV.B.2. Absorption et assimilation de l'urée par les plantes.

Aucune différence de croissance du blé n'a pu être mesurée entre les 3 nutritives azotées urée, AN et AS reçues au cours de la culture (Figure 16A, B). Au cours de l'essai 2 (Figure 16C), l'ajout d'Agrotain semble entraîner une baisse de croissance significative par rapport à l'urée (Jour 8). Nous avons vérifié sur le traitement contrôle AN que l'Agrotain, inhibiteur de l'hydrolyse de l'urée, n'était pas phytotoxique. Ainsi la forme 'urée non dégradée' serait défavorable à la croissance, comme nos résultats en culture hydroponique le montrent. L'ajout



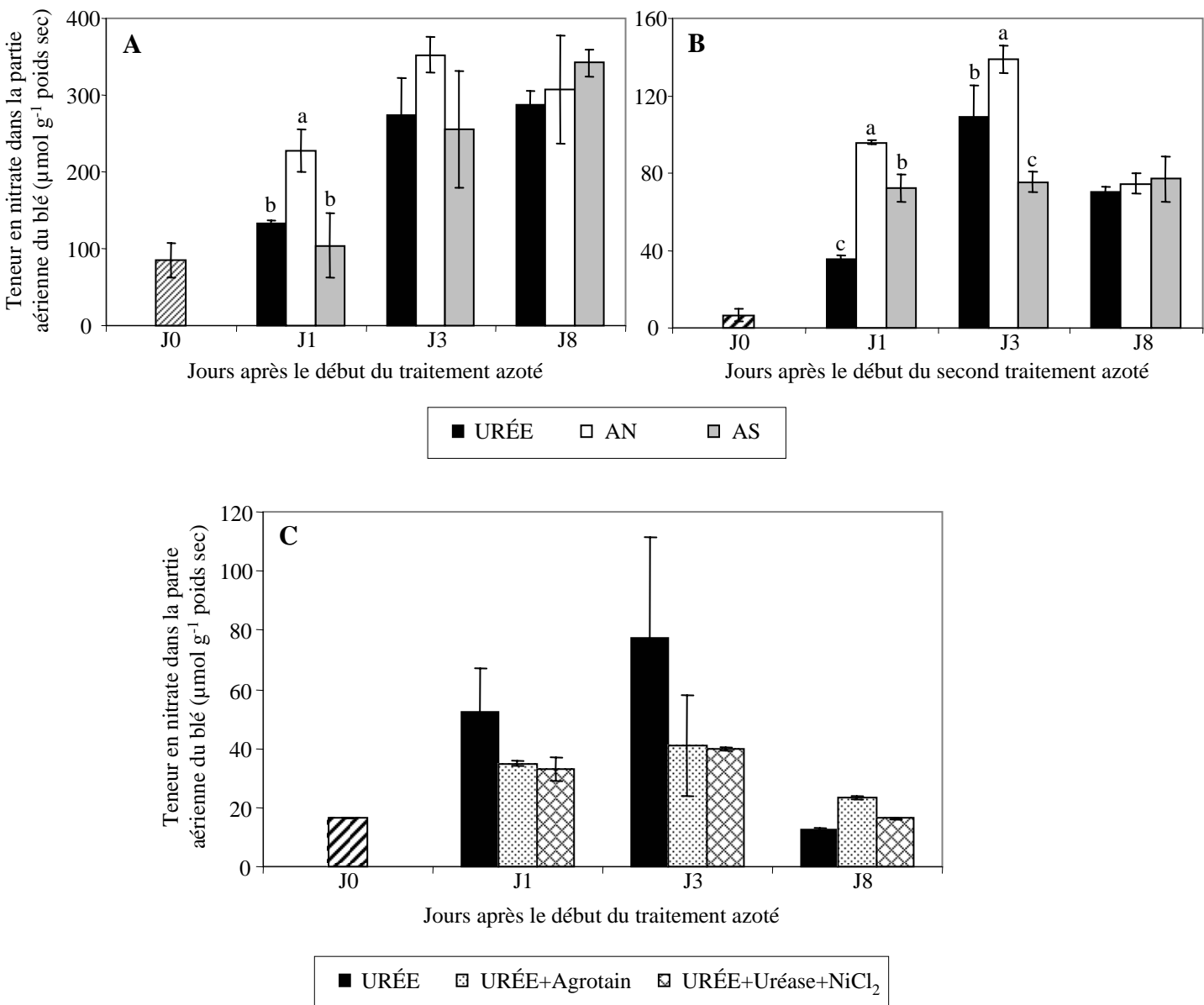
**Figure 18. Evolution de la quantité de <sup>15</sup>N absorbé pendant le marquage et présent dans la partie aérienne du blé.**

Les conditions de culture sont les mêmes que pour la Figure 16. Les différentes lettres correspondent aux groupes significativement différents à P<0,05.

d'uréase à l'urée permet une meilleure croissance comparée à l'urée seule au bout de 3 jours de traitement. La forme 'urée hydrolysée', donc un mélange d'ammonium et de nitrate, serait ainsi plus favorable à la croissance du blé par rapport à l'urée. Néanmoins, ce résultat est en contradiction avec ceux des essais 1 et 2 concernant les différentes formes azotées AN, AS et urée (Figure 16B).

Nous l'avons vu, la culture du blé en hydroponie avec de l'urée comme seule source d'azote, entraîne une baisse rapide de la teneur en azote total dans l'ensemble de la plante (Article 1, Figures 3C, D). La teneur en azote total augmente ici durant les 3 jours qui suivent le premier apport d'urée (Figure 17A). Dans les deux essais, elle chute une semaine après le second apport, indépendamment de la source d'azote, sans doute à cause de la forte demande en azote à cette période (Figure 17B). La teneur en azote est un paramètre difficilement exploitable car il intègre deux variables, la quantité d'azote absorbé et la biomasse accumulée. Ainsi, au cours de l'essai 2, la teneur en azote du traitement urée + Agrotain ne chute pas entre les jours 3 et 8 contrairement aux deux autres traitements (Figure 17C), mais la croissance du blé sur urée + Agrotain est aussi plus faible par rapport aux autres traitements (Figure 16C).

Nous avons quantifié l'entrée d'azote dans la plante au cours du temps en utilisant le traceur  $^{15}\text{N}$ , isotope stable de l'azote présent naturellement dans l'environnement sous forme de traces. Pour cela, nous avons calculé à chaque prélèvement la quantité de  $^{15}\text{N}$  présente dans la partie feuillée (le calcul est détaillé dans le paragraphe IV.A.3.), provenant de l'absorption pendant le marquage (Figure 18). Dans nos conditions de culture sur sol, l'absorption d'azote uréique se révèle aussi efficace que celle des formes ammoniacale et nitrique, et ceci dès le jour qui suit l'apport (Figure 18A, B). Ainsi, au cours de l'essai 1, 60% de l'azote apporté sous forme urée est retrouvé dans les parties aériennes 8 jours après le second apport (Figure 18B). Mais sous quelle forme cet azote issu de l'urée est-il absorbé par les plantes? Urée, ammonium, nitrate, ou un mélange de plusieurs formes? L'essai 1 ne nous permet pas de répondre à cette question. C'est pourquoi nous avons mis en place un deuxième essai où nous nous sommes proposés de bloquer l'hydrolyse de l'urée grâce à un inhibiteur d'uréase (Agrotain), ou au contraire, d'accélérer cette hydrolyse en présence d'uréase et de son cofacteur le nickel. Cependant, compte tenu des résultats obtenus et illustrés sur la Figure 18C, nous ne pouvons rien conclure quant à la forme sous laquelle l'azote uréique apporté est absorbé par le blé. Les quantités de  $^{15}\text{N}$  présentes dans les parties aériennes sont en effet identiques quel que soit le traitement au huitième jour, mais aussi le jour qui suit le traitement (Figure 18C).



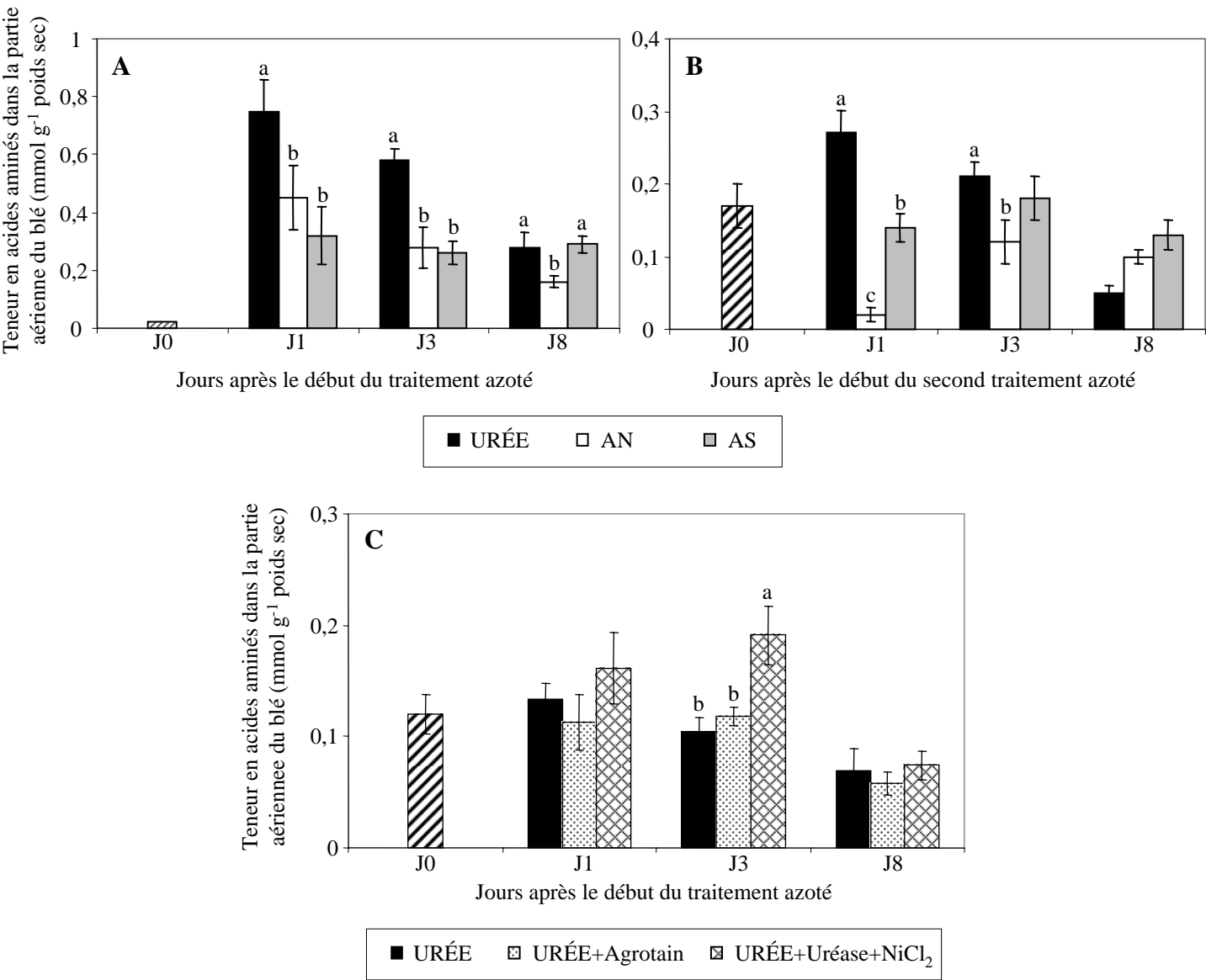
**Figure 19. Evolution de la concentration en nitrate dans la partie aérienne du blé.**

Les conditions de culture sont les mêmes que pour la Figure 16. Les différentes lettres correspondent aux groupes significativement différents à  $P < 0,05$ .

Néanmoins, l'analyse de la concentration en nitrate dans les feuilles de blé nous permet de formuler une réponse partielle à cette question. En effet les feuilles des blés s'enrichissent en nitrate au cours des 3 jours qui suivent l'apport d'AN, mais aussi d'AS et d'urée (Figure 19A, B). Ainsi, nous pouvons penser que ces nitrates sont issus de l'hydrolyse de l'urée. Nous avons observé le contraire en hydroponie, où la présence d'urée et d'AS entraîne une brusque chute des nitrates dans la plante (Article 1, Figure 4C, D). Cependant, dans nos conditions de culture sur sol, le processus de nitrification est actif et pourrait expliquer les quantités de nitrates non négligeables, mesurées dans les plantes alimentées avec AS et urée. Notons que la concentration en nitrates des plantes traitées avec l'AN reste ici assez nettement supérieure à celle des deux autres traitements aux jours 1 et 3, ce qui conforte notre interprétation (Figure 19A, B). Cependant, la présence d'uréase dans le sol semble fortement limiter l'accumulation de nitrate dans les feuilles du blé nourri avec de l'urée (Figure 19C). Le blocage de l'hydrolyse de l'urée par l'Agrotain semble réduire de la même façon l'accumulation du nitrate (Figure 19C). Nous retrouvons ainsi une situation comparable à celle de la culture en hydroponie. Indépendamment des engrais, une autre source de nitrate provient de la minéralisation de l'azote organique présent dans le sol (Tableau 3). Néanmoins, il semble que cette seule source ne puisse expliquer les augmentations de nitrate observées suite aux apports d'engrais. Un témoin exempt d'engrais aurait été nécessaire pour quantifier l'apport du sol par minéralisation.

Concernant la concentration en acides aminés totaux, les plantes ayant poussé en présence d'urée sont les plus riches durant les 3 jours suivant les apports d'azote (Figure 20A, B). La métabolisation de l'azote uréique serait donc particulièrement efficace chez le blé, par rapport au nitrate ou à l'ammonium. Nous retrouvons ici le même comportement déjà relevé en culture hydroponique (Article 1, Tableau 2). La présence d'uréase dans le sol semble favoriser cette accumulation. Quant à l'inhibiteur d'uréase aucun effet n'est observé (Figure 20C).

Nos résultats le montrent: la méthodologie  $^{15}\text{N}$  adoptée nous a permis de comparer les absorptions d'urée, d'AN et d'AS, mais elle est peu adaptée pour discriminer entre les formes d'azote (nitrique, ammoniacale, ou uréique) absorbées dans nos conditions de culture sur sol. L'azote de l'urée est-il absorbé sous forme urée ou sous les formes réduites ammonium et/ou nitrate?



**Figure 20. Evolution de la concentration en acides aminés totaux dans la partie aérienne du blé.** Les conditions de culture sont les mêmes que pour la Figure 16. Les différentes lettres correspondent aux groupes significativement différents à  $P < 0,05$ .

## V. Utilisation de l'urée par les céréales: conclusions & perspectives.

Nous avons choisi deux systèmes de culture afin d'étudier l'efficacité d'utilisation de l'urée par les céréales. Dans un système d'hydroponie, le contrôle des conditions de culture est assez fin, et les racines sont accessibles. Dans un système de culture sur sol qui se rapproche plus des conditions agronomiques, la maîtrise des conditions expérimentales est beaucoup plus difficile, et les racines sont difficilement récupérées. Les résultats obtenus en culture hydroponique sont déjà discutés dans l'Article 1. Nous rajouterons ici seulement quelques aspects.

### V.A. Urée et architecture racinaire.

Nous l'avons vu en hydroponie, contrairement à une nutrition ammoniac-nitrique ou ammoniacale, la croissance des racines est favorisée aux dépens de celle de la partie feuillée chez les plantes alimentées avec de l'urée. Nous l'avons mesuré chez le blé, cette plus forte croissance se traduit par une plus grande longueur de la racine principale exposée à l'urée. Nous avons également pu observer un chevelu racinaire plus dense pour les racines plongées dans la solution uréique, par comparaison aux autres traitements. Même si ce phénotype racinaire est caractéristique d'un déficit d'azote, nous ne pouvons pas exclure que ce soit une réponse spécifique des racines, au contact avec la molécule d'urée (Article 1).

### V.B. Absorption et assimilation de l'urée.

C'est le principal résultat de notre étude en hydroponie: dans nos conditions de culture, maïs et blé sont capables d'absorber l'urée sous sa forme non dégradée, et d'utiliser l'azote uréique pour assurer leur croissance. Cette utilisation est différente selon que ce soit du maïs ou du blé. Toutefois, l'absorption de l'urée est faible sous sa forme moléculaire, facteur limitant la croissance des plantes, et l'urée s'avère donc une source d'azote moins efficace en terme de rendement, que les sources plus traditionnelles comme l'ammonium nitrate ou l'ammonium sulfate (Article 1).

Il nous a été beaucoup plus difficile d'évaluer l'efficacité de l'urée par rapport à ces autres sources d'azote, lorsqu'elle est apportée sur sol. Dans nos essais de culture sur pots, la croissance des blés est toutefois homogène quelle que soit la source d'azote urée, ammonium





nitrate ou ammonium sulfate. Si l'on s'attache à essayer de relier efficacité d'utilisation de l'urée et formes d'azote absorbé (urée, nitrate, ammonium), beaucoup de questions restent sans réponse. Il semble clair que l'hydrolyse de l'urée a débuté au cours du premier jour de traitement, compte tenu des études antérieures (Soubies et al., 1955; Recous, 1987). Dans cette hypothèse, l'azote se présenterait sous les deux formes urée et ammonium. La nitrification étant plus lente que l'hydrolyse de l'urée (Soubies et al., 1955), il est peu probable qu'elle ait démarré dès le premier jour suivant l'apport d'urée. Or, au cours de cette première journée en présence d'urée marquée, l'absorption de  $^{15}\text{N}$  est aussi efficace que les formes ammoniacale et ammoniacale (Figure 18A), voire supérieure à la forme ammoniacale (Figure 18B). La forme ammoniacale pourrait être majoritaire et donc compenserait la faible absorption de l'urée que nous avons constatée en hydroponie. C'est probable mais nous ne pouvons rien affirmer, faute de maîtriser suffisamment les conditions expérimentales. En particulier nous n'avons pas testé l'efficacité de l'inhibiteur d'uréase Agrotain, ni celle de l'uréase. Ce type d'étude en sol aurait nécessité davantage de contrôles notamment au niveau des bilans de  $^{15}\text{N}$ . Ainsi nous n'avons pas quantifié les pertes d'azote qui ont pu se produire au cours de nos essais. Le lessivage du nitrate a probablement été limité par l'arrosage des pots par sub-irrigation. Mais les pertes par volatilisation de la forme ammoniacale ont certainement été non négligeables puisque nous avons apporté les engrais sous forme liquide et à une température en serre élevée.

Nos résultats montrent que les feuilles du blé traité avec de l'urée s'enrichissent en nitrates. Quelle est l'origine de ce nitrate dans la plante alimentée avec de l'urée? (i) Vient-il directement de la minéralisation de l'azote organique du sol? (ii) L'urée apportée au sol est-elle hydrolysée en ammonium par les uréases, puis nitrifiée, nitrates alors absorbés par la plante? La présence d'uréase dans le sol semble fortement limiter l'accumulation de nitrate dans les feuilles du blé nourri avec de l'urée (Figure 19C). L'hypothèse (ii) serait donc à écarter, mais les trop grandes variations de nos résultats ne nous permettent pas de conclure. Quoiqu'il en soit, l'azote uréique s'avère bien utilisé par les plants de blé cultivés en pots, tout comme nous l'avons vu en culture hydroponique.

Afin d'apporter de nouveaux éléments de réponses à nos questions à l'issue de ces deux essais de culture sur sol, nous avons essayé de doser l'urée dans nos échantillons de blé par chromatographie échangeuse d'ions, mais l'analyse n'a pas abouti notamment en raison de la faiblesse du contenu en urée dans nos échantillons. De même il nous a été impossible de suivre le devenir de l'élément  $^{15}\text{N}$  par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse, l'enrichissement en  $^{15}\text{N}$  de 5% étant trop insuffisant.



Grâce à nos expérimentations sur deux plantes de grandes cultures, et sur deux systèmes de culture, nous ont permis de mesurer les avantages mais aussi les limites de chacune des deux espèces céréalières maïs et blé, ainsi que celles des systèmes de culture en hydroponie et sur sol. Afin de nous permettre d'aller plus avant dans l'étude de l'utilisation de l'urée par le végétal, ainsi que dans l'étude de ses mécanismes régulateurs, notre matériel d'étude sera désormais *Arabidopsis thaliana*.



# CHAPITRE II

## Effet de l'urée sur le transport & le métabolisme de l'azote chez *Arabidopsis thaliana*.

### I. Introduction.

Pour faire suite à notre étude sur céréales, et afin d'analyser plus finement les différentes adaptations du métabolisme de la plante que nous avons pu mettre en évidence en réponse à une fourniture d'urée, nous avons choisi de poursuivre notre travail sur une autre espèce végétale, *Arabidopsis thaliana*.

Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser l'ensemble des réponses physiologiques de la plante à un apport d'urée. Le choix des différents milieux de culture utilisés se fonde sur les différents aspects que nous voulions traiter. Une solution nutritive contenant de l'ammonium nitrate (AN) a constitué notre milieu de référence. Nous y avons ajouté de l'urée (AN+U) dans le but de pouvoir évaluer les effets de la présence d'urée sur l'utilisation par la plante des autres formes d'azote, que sont le nitrate et l'ammonium. Un milieu nutritif composé exclusivement d'urée (U) comme source d'azote nous a permis de caractériser les réponses de la plante qui sont spécifiques à l'urée. Nous avons vu que le maïs et le blé présentent des signes de carence azotée suite à un apport d'urée (Article 1). Aussi avons-nous testé un milieu nutritif sans aucune source d'azote (S), afin d'évaluer la sévérité de la carence en azote générée par l'urée. Enfin, pour que l'azote de l'urée soit utilisé par la plante (voir introduction), l'urée doit être hydrolysée. L'azote uréique est alors converti en ammonium, et ainsi est-il légitime de se demander si une nutrition avec de l'urée ne serait pas équivalente à une nutrition ammoniacale. Afin d'apporter des éléments de réponse à cette question, nous avons choisi de tester un milieu contenant uniquement de l'ammonium (AS). La Figure 21 synthétise de façon schématique le plan expérimental suivi lors de nos expérimentations (voir aussi Article 2). Grâce à des mesures d'influx avec l'isotope  $^{15}\text{N}$  dont le principe est décrit sur la Figure 22, nous souhaitons apporter une preuve physique d'un



flux d'urée via les racines de la plante. Nous avons également mesuré l'effet de l'addition d'urée à d'autres sources azotées sur l'influx de nitrate, d'ammonium ou d'urée, et ceci en fonction des différents statuts azotés de la plante (AN, AN+U, U ou S). En outre, ces analyses physiologiques ont été complétées par des mesures sur des paramètres liés au métabolisme azoté comme le contenu en nitrate ou en acides aminés libres au niveau foliaire et racinaire. Le travail s'est alors poursuivi à un niveau moléculaire par une analyse de la réponse de la plante au niveau de l'expression génique. Grâce à une étude transcriptomique, nous avons identifié les gènes dont l'expression est modulée en réponse à différents traitements azotés contenant ou non de l'urée.

## II. Article 2 - Physiological and transcriptomic aspects of urea uptake and assimilation in *Arabidopsis* plants -

**Article préparé pour être soumis à *Plant Physiology*.**

Cet article rassemble les résultats obtenus au cours de notre étude sur l'impact de l'urée chez des plantes d'*Arabidopsis* cultivée en hydroponie. Les deux aspects physiologique et transcriptomique sont traités.





### III. Résultats complémentaires.

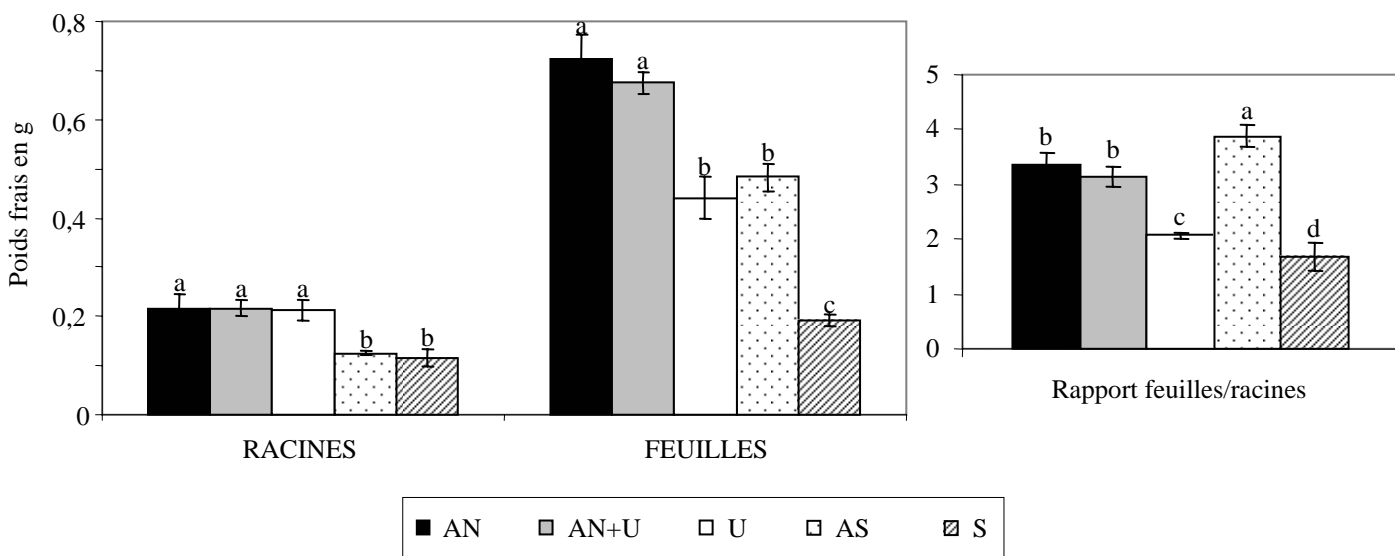
Nous reprendrons ici les mêmes abréviations que celles utilisées dans l'Article 2: AN pour ammonium nitrate; AN+U pour ammonium nitrate + urée; U pour urée; S pour le milieu sans azote; et AS pour ammonium sulfate.

#### III.A. Analyse physiologique de la réponse à l'urée chez *Arabidopsis*.

L'Article 2 décrivant la presque totalité des résultats que nous avons obtenus au cours de l'analyse physiologique de la réponse à l'urée, nous ajouterons ici seulement quelques compléments et illustrations graphiques non représentées dans l'article.

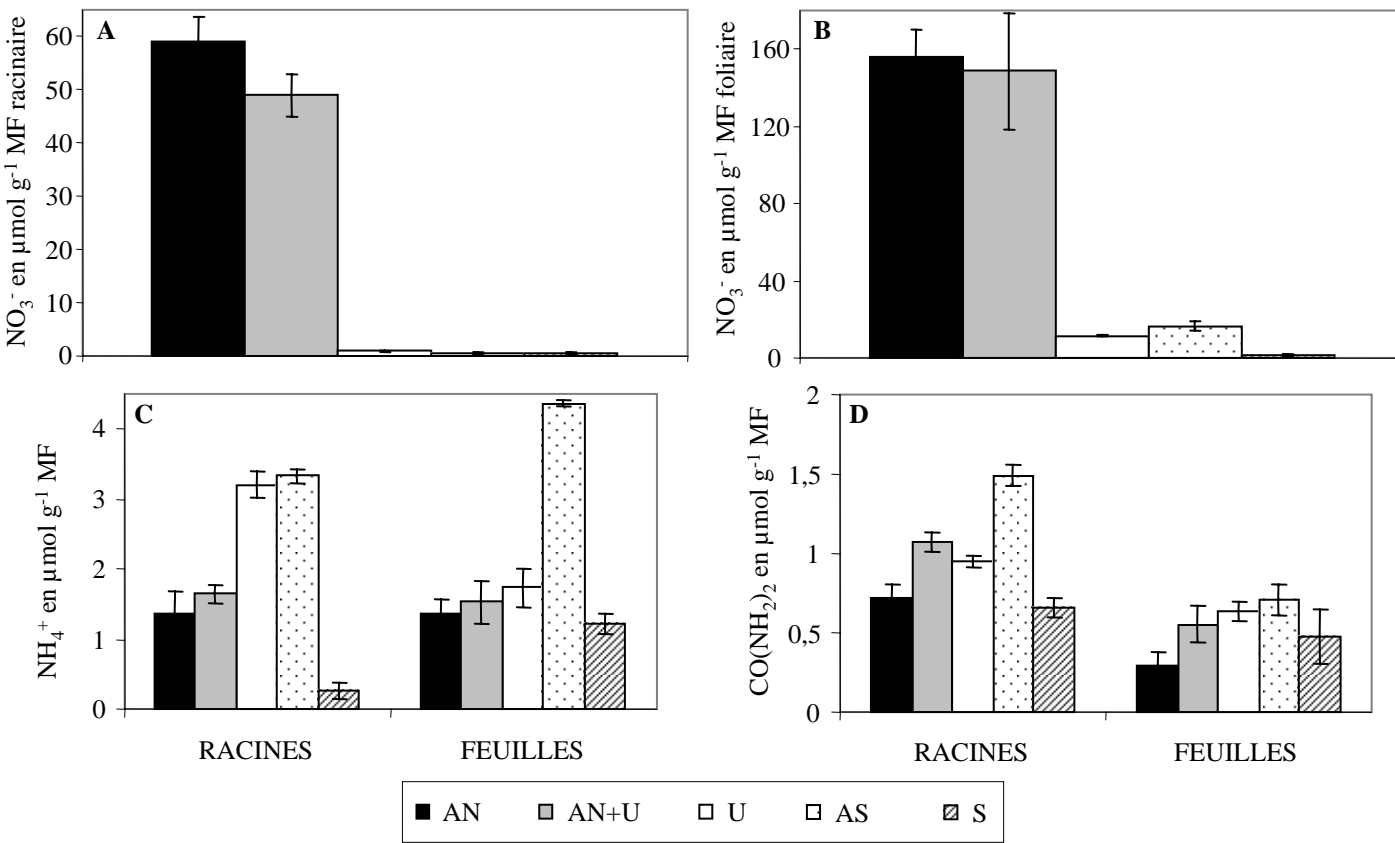
##### III.A.1. Urée et architecture racinaire.

Nous l'avons vu chez le maïs et chez le blé, une nutrition exclusivement uréique conduit à une stimulation du développement racinaire aux dépens des parties aériennes (Chapitre I). Nous retrouvons cette même particularité développementale des racines chez *Arabidopsis* (Article 2). Même si cette induction du développement des racines semble relié à un déficit en azote, nous ne pouvons pas exclure que ce soit une réponse spécifique des racines au contact de la molécule d'urée (Article 1). Un tel phénotype racinaire avait déjà été observé dans le laboratoire, sur une culture *in vitro* d'*Arabidopsis* en milieu semi-liquide contenant de l'urée. Aussi, dans le but de mieux comprendre comment agit la source azotée urée sur le développement de l'appareil racinaire, nous avons mis en place un dispositif de culture *in vitro* d'*Arabidopsis* écotype Columbia sur des boîtes placées en position verticale dans une chambre de culture en jours longs (18°C, 60% d'humidité et photopériode 7h-23h). Après de nombreux tests de milieux de germination et de culture, il semble que la source azotée n'a pas d'influence visible sur la germination des plantules. Le dispositif expérimental le plus simple a donc été une germination directe des graines sur les différentes sources azotées ammonium nitrate, ammonium sulfate et urée, avec deux concentrations en azote 5 et 10 mM. Le principal problème que nous avons rencontré avec ce système de culture en position verticale a été celui de l'hétérogénéité de croissance des plantules sur une même boîte, mais aussi d'une expérimentation à l'autre. De plus le meilleur développement de la partie aérienne sur ammonium nitrate par rapport à l'urée, a rendu difficile une comparaison de l'appareil



**Figure 23. Distribution de la masse fraîche entre les racines et les feuilles des plantes après une semaine de culture sur différentes sources azotées.**

Les plantes d'Arabidopsis ont été cultivées pendant 35 jours en hydroponie sur un milieu contenant 0,5 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Les plantes ont alors été transférées sur différents milieux contenant 1 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (AN), 0,5 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ +0,5 mM  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (AN+U), 1 mM  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (U), 1 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (AS), ou ne contenant pas d'azote (S). Elles sont récoltées à 42 jours, une semaine après le transfert. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions. Les différentes lettres correspondent aux groupes significativement différents à  $P < 0,05$ .



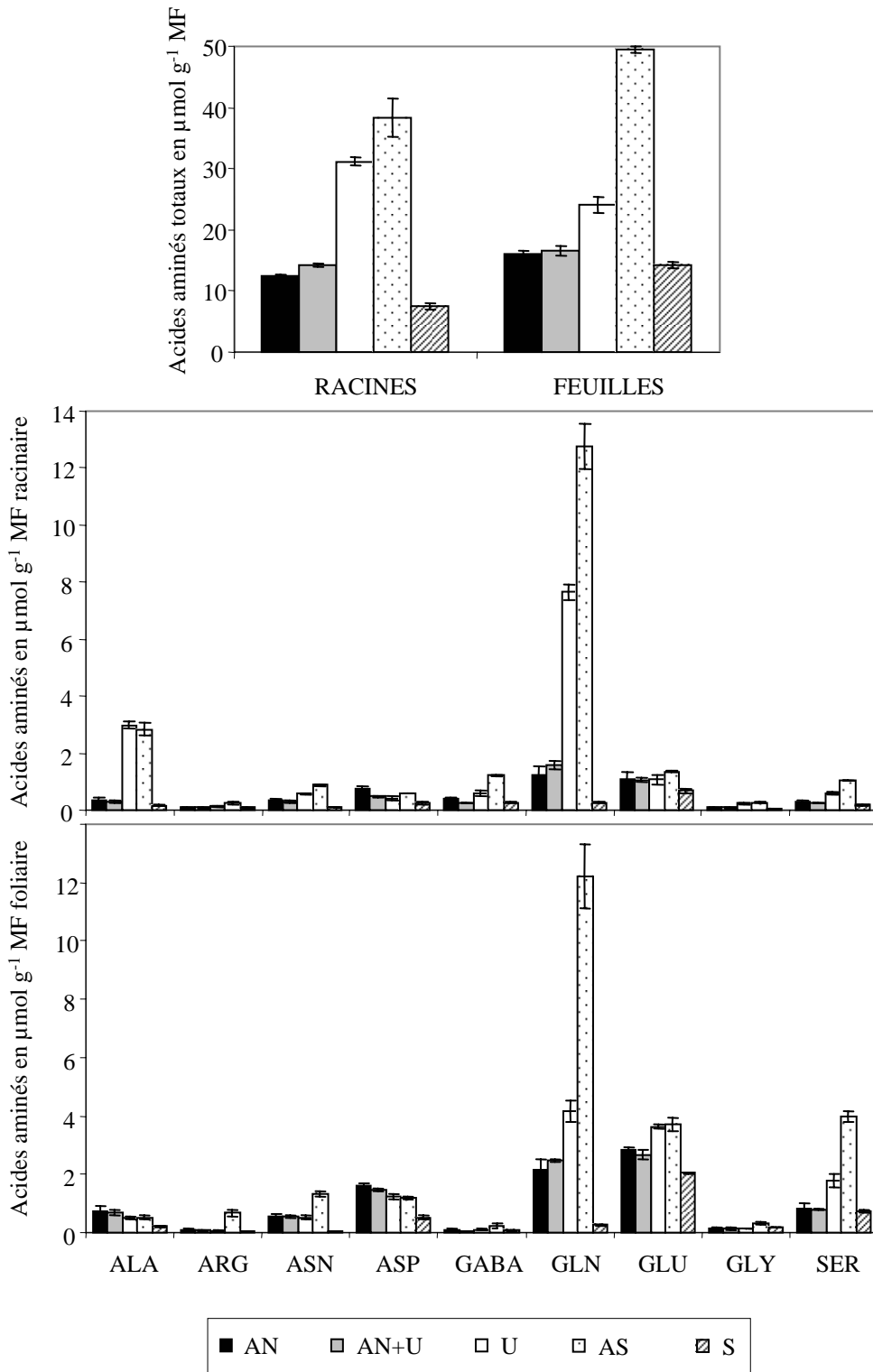
**Figure 24. Contenu en nitrate (A, B), en ammonium (C) et en urée (D) dans les racines et les feuilles des plantes après une semaine de culture sur différentes sources azotées.**

Les conditions de culture sont les mêmes que pour la Figure 23. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions.

racinaire. Cependant des points intéressants ont été observés au cours de ces expérimentations: (i) les plantules se développent bien sur urée : elles sont bien vertes, plus trapues et avec un pétiole plus court que les plantules cultivées sur ammonium nitrate; (ii) de nombreux poils absorbants apparaissent sur toute la longueur de la racine principale et des racines secondaires au contact avec l'urée; (iii) les racines secondaires sont plus longues chez les plantes cultivées sur urée par rapport à celles alimentées avec l'ammonium nitrate; (iv) au contact de l'urée, les racines secondaires et tertiaires se développent de façon importante pour former un réseau branchu au niveau de la partie supérieure de l'appareil racinaire. Depuis ces premiers essais préliminaires de cultures *in vitro* en boîtes verticales, des améliorations du système de culture ont été développées. Le système de culture est désormais bien maîtrisé et donne des résultats beaucoup plus homogènes. Il serait donc intéressant de reprendre cette étude quant à l'effet de l'urée sur l'architecture racinaire, en utilisant ce nouveau système de culture en boîtes verticales.

### **III.A.2. Nutritions uréique et ammoniacale.**

Devant l'absence de répétitions expérimentales, nous avons fait le choix de ne pas publier les données obtenues avec une nutrition exclusivement ammoniacale (AS). Toutefois les résultats que nous avons obtenus nous ont paru significatifs dans la mesure où, notamment, l'analyse des paramètres azotés sur les plantes alimentées avec les autres milieux azotés (AN, AN+U, U et S), est comparable avec nos expérimentations antérieures. Ces résultats sont illustrés sur les Figures 23 à 25. Le développement végétal des plantes cultivées sur U et AS est assez proche (Figure 23). Toutefois des symptômes de toxicité ammoniacale comme un jaunissement au niveau de la rosette des plantes, sont apparus au cours de la culture sur AS, alors qu'ils sont inexistantes chez les plantes alimentées avec l'urée. En outre, la croissance des racines plongées dans la solution ammoniacale est moindre par rapport à celle des racines au contact avec l'urée, alors que la croissance de l'appareil foliaire est similaire (Figure 23). Ceci suggère que cette particularité phénotypique du développement racinaire en présence d'urée soit une réponse spécifique à la molécule d'urée (voir paragraphe précédent). Les données illustrées sur la Figure 24 révèlent un statut azoté similaire entre des plantes cultivées sur U ou sur AS. Cependant l'analyse du contenu en ammonium dans les plantes ne nous permet pas de confondre nutritions ammoniacale et uréique. En effet, si le contenu en ammonium est identique dans les racines entre les traitements U et AS, l'ammonium s'accumule beaucoup plus dans les feuilles des plantes cultivées sur AS (Figure 24C). De façon plus surprenante,

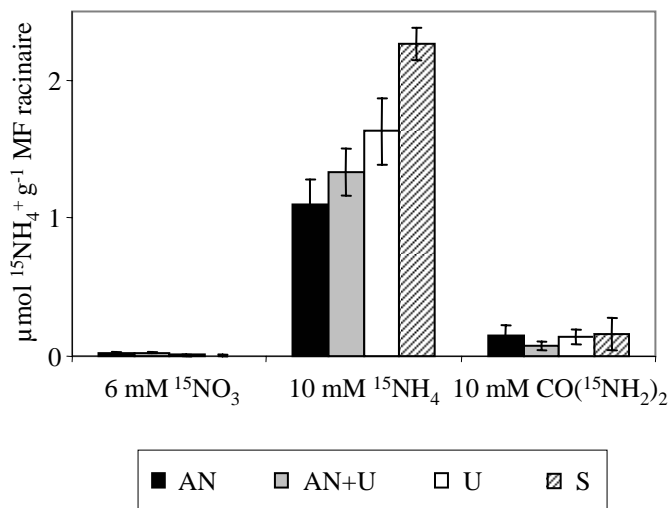


**Figure 25. Contenu en acides aminés dans les racines et les feuilles des plantes après une semaine de culture sur différentes sources azotées.**  
 Les conditions de culture sont les mêmes que pour la Figure 23. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions.

les racines au contact d'AS présentent la plus forte concentration en urée. Cela suggère que la présence d'ammonium induirait la voie de biosynthèse de l'urée dans la cellule racinaire. Nous retrouvons ici une forte accumulation des acides aminés dans les plantes cultivées sur AS (Figure 25), caractéristique de la nutrition ammoniacale (Loqué & von Wirén, 2004). La glutamine est le composé aminé majeur accumulé à la fois dans les racines et dans les feuilles. Le contenu en alanine contribue également à cette forte accumulation dans les racines. Dans les feuilles, la sérine, le glutamate et l'asparagine sont aussi bien représentés (Figure 25). Cet enrichissement en acides aminés est lié à la rapidité d'assimilation de l'ammonium absorbé, sans laquelle l'accumulation des ions  $\text{NH}_4^+$  pourrait atteindre des niveaux toxiques pour la plante. Les acides aminés s'accumulent également chez les plantes alimentées avec de l'urée, mais dans une moindre mesure par rapport à celles placées sur ammonium, en particulier au niveau de la partie aérienne. Ce sont aussi les mêmes acides aminés qui sont à l'origine de cette accumulation (Article 2).

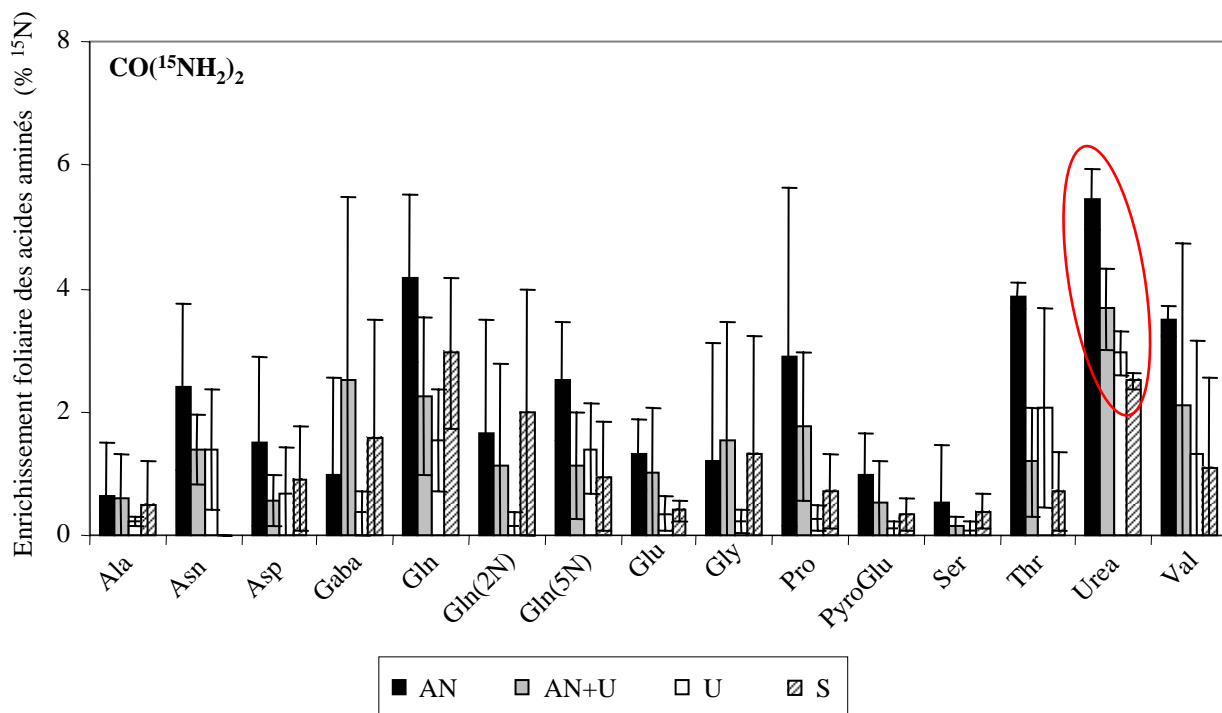
### **III.A.3. Compléments aux analyses par GC-MS.**

Les analyses par spectrométrie de masse couplée à une chromatographie gazeuse (GC-MS) nous ont permis non seulement de suivre l'incorporation du  $^{15}\text{NO}_3$ ,  $^{15}\text{NH}_4$  et  $\text{CO}(^{15}\text{NH}_2)_2$  dans les différents acides aminés (Article 2, Figure 4), mais aussi dans l'ammonium. La Figure 26 illustre les mesures des quantités en  $^{15}\text{NH}_4^+$  retrouvées dans les racines des plantes suite à un influx de 5 minutes de nitrate, d'ammonium ou d'urée enrichis en  $^{15}\text{N}$ . Sans aucune surprise, seulement d'infimes quantités de  $^{15}\text{NH}_4^+$  sont décelées après un influx de  $^{15}\text{NO}_3$ , et inversement l'influx de  $^{15}\text{NH}_4$  est suivi par un enrichissement important en  $^{15}\text{NH}_4^+$ . Cet enrichissement est différent selon le statut azoté de la plante au moment où l'influx est effectué. Si la présence préalable d'urée dans le milieu de culture favorise légèrement cet enrichissement, les racines des plantes carencées en azote sont elles très riches en  $^{15}\text{NH}_4^+$ . Ces résultats sont en accord avec les mesures d'influx (Article 2, Figure 3). Les informations les plus intéressantes de cette analyse du contenu en  $^{15}\text{NH}_4^+$  sont celles obtenues suite à un influx de  $\text{CO}(^{15}\text{NH}_2)_2$ . De l'ammonium enrichi en  $^{15}\text{N}$  est retrouvé dans les racines suite à l'influx de  $\text{CO}(^{15}\text{NH}_2)_2$ , même si les quantités mesurées restent très inférieures à celles qui suivent un influx de  $^{15}\text{NH}_4^+$ . L'hydrolyse de l'urée  $^{15}\text{N}$  est la seule origine possible de cet ammonium  $^{15}\text{N}$ . Soit (i) une partie de l'urée contenue dans la solution de marquage été hydrolysée en  $^{15}\text{N}$ -ammonium au cours de notre expérience d'influx, ammonium alors absorbé par les racines; soit (ii) le  $^{15}\text{NH}_4^+$  provient de l'hydrolyse *in planta* par les uréases des cellules racinaires, de



**Figure 26.** Contenu en  $^{15}\text{NH}_4^+$  dans les racines des plantes après un influx de 5 minutes de nitrate, d'ammonium ou d'urée enrichis au  $^{15}\text{N}$ .

Les plantes d'*Arabidopsis* ont été cultivées pendant 35 jours en hydroponie sur un milieu contenant 0,5 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Les plantes ont alors été transférées sur différents milieux contenant 1 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (AN), 0,5 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ +0,5 mM  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (AN+U), 1 mM  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (U), 1 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (AS), ou ne contenant pas d'azote (S). Les influx ont été réalisés au 42<sup>ième</sup> jour de culture, une semaine après le transfert. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions.



**Figure 27.** Suivi de l'incorporation du  $^{15}\text{N}$  dans les acides aminés des feuilles des plantes après un influx de 5 minutes d'urée 10 mM enrichie au  $^{15}\text{N}$ .

Les conditions de culture sont les mêmes que pour la Figure 26. L'influx d'urée a été réalisé au 42<sup>ième</sup> jour de culture, une semaine après le transfert. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions.

l'urée absorbée. Néanmoins, le contenu en  $^{15}\text{NH}_4^+$  dans les racines végétales n'est pas significativement différent selon la source d'azote apportée, bien que l'influx d'urée soit induit dans les racines préalablement alimentées avec de l'urée (Article 2, Figure 3). Si l'ammonium  $^{15}\text{N}$  mesuré dans ces racines provenait de l'hydrolyse, alors nous nous attendrions à en retrouver davantage par rapport aux racines soumises aux autres régimes azotés. Ce n'est pas le cas, aussi pouvons-nous supposer que les faibles quantités d'ammonium  $^{15}\text{N}$  mesurées dans les racines des plantes suite à un influx d'urée, sont issues d'une hydrolyse partielle de l'urée dans la solution de marquage. Toutefois, une hydrolyse de l'urée semble peu probable puisque nos mesures d'influx ont été effectuées en conditions stériles dans une chambre de culture à 21°C, et l'expérimentation de marquage s'est déroulée sur cinq minutes. Dans l'Article 2, nous avons vu que l'ammonium issu de l'hydrolyse de l'urée dans la racine, était rapidement métabolisé pour former les acides aminés. Le  $^{15}\text{NH}_4^+$  mesuré dans les racines suite à l'influx d'urée pourrait donc aussi correspondre à l'ammonium uréique encore non métabolisé ou alors mis en réserve dans la vacuole.

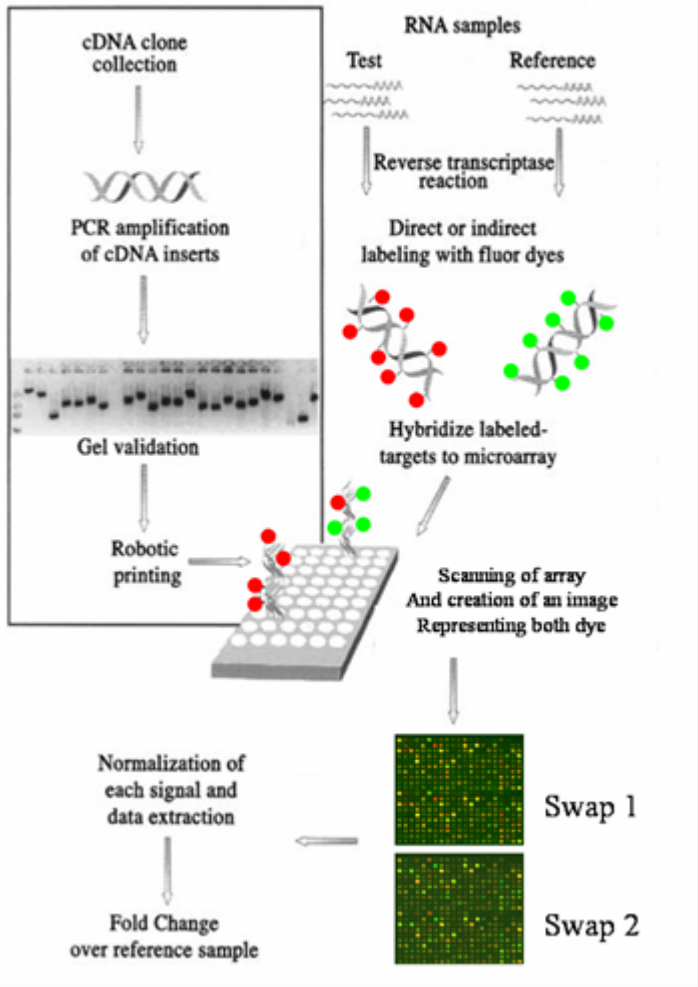
L'allocation vers les feuilles d'une partie de l'urée absorbée avant son hydrolyse par les uréases des cellules racinaires, est l'une des caractéristiques du transport et de l'assimilation de l'urée dans la plante enseignée par nos expérimentations (Article 2). La Figure 27 apporte la preuve directe de cette redistribution de l'urée des racines vers les feuilles en l'espace de seulement cinq minutes. En effet, quelque soit le traitement azoté appliqué aux plantes une semaine avant l'influx (AN, AN+U, U ou S), nous retrouvons de l'urée enrichie en  $^{15}\text{N}$  dans la partie aérienne de la plante suite à un influx d'urée radiomarquée pendant 5 minutes.

### III.B. Analyse génomique globale de la réponse à l'urée chez *Arabidopsis*.

Nous l'avons vu, les analyses physiologiques en réponse à différentes combinaisons d'un régime azoté mixte AN/U (100/0; 50/50; 0/100), ont permis de mettre en évidence des adaptations du métabolisme végétal aux différentes sources d'azote. Afin d'obtenir une plus large caractérisation des effets de l'urée, mais aussi dans le but d'explicitier plus finement les réponses de la plante, nous avons orienté notre étude vers l'échelle moléculaire grâce à une analyse de l'expression génique. L'analyse du transcriptome à grande échelle est aujourd'hui rendue très accessible grâce à la technique des puces à ADN ou microarrays. Celles-ci sont utilisées pour identifier et quantifier la sur- ou sous-expression d'un ensemble de gènes dans une situation biologique donnée. L'analyse d'une masse suffisante de données d'expériences

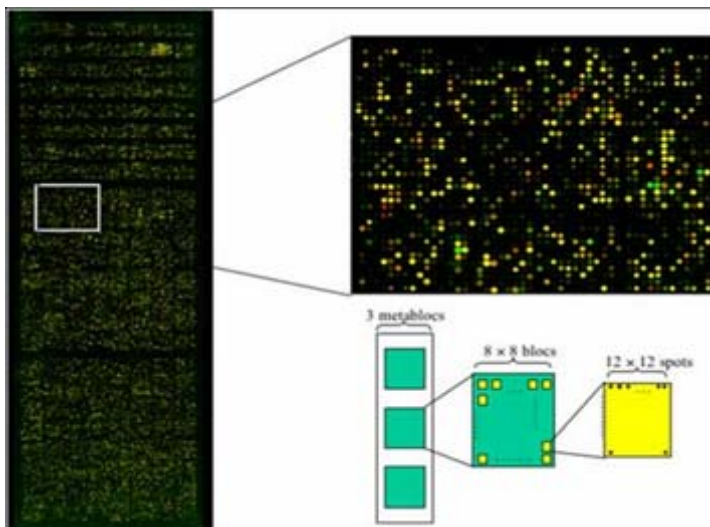
## Production of microarrays

## Processing of RNA samples



**Figure 28. Principe d'une puce à ADN.**

Cette technique repose sur l'hybridation moléculaire, selon un schéma inverse de celui du Northern blot. Des ADNc de séquences connues sont fixés sur un support solide. Le mélange complexe d'ARN à tester est reverse transcrit, amplifié et marqué par deux fluorochromes différents. Le matériel marqué est alors hybridé sur la puce. Les données sont lues au scanner, chaque signal est normalisé puis analysé statistiquement afin de déterminer les gènes différentiellement exprimés.



**Figure 29. La puce CATMA.**

La puce CATMA contient 24576 GSTs réparties en 3 metablocs, chacun composés de 64 blocs de 144 spots, un spot correspondant à un gène.



sur puces peut permettre d'identifier des familles et des réseaux fonctionnels de gènes mis en jeu sous l'effet du stimulus étudié. Nous avons ainsi identifié à l'aide de la puce *CATMA* (Complete Arabidopsis Transcriptome MicroArray) développée par nos collègues de l'Unité de Recherche en Génomique Végétale à Evry (<http://www.catma.org/>), les gènes dont l'expression est modulée par le statut nutritionnel de la plante. Cette lame de verre contient des sondes correspondant aux 25000 gènes d'Arabidopsis annotés au cours du séquençage complet du génome (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Avant d'apporter quelques compléments à l'Article 2 quant à la description des profils d'expression générés par notre analyse transcriptome, nous détaillerons ici quelques points du grand principe d'une analyse par biopuce et plus particulièrement par puce *CATMA*.

### III.B.1. La puce *CATMA*

Le principe de base des puces à ADN est l'hybridation moléculaire d'ARNs ou d'ADNs préalablement marqués (cibles), avec des ADN complémentaires de séquence connue (sonde), fixés sur un support solide. La miniaturisation des techniques de dépôt des ADNs permet l'étude de centaines de milliers d'ADN de séquences différentes en une seule fois.

Concernant la puce *CATMA*, les ADNs déposés sont des sondes gènes spécifiques appelées GSTs (Gene Sequence Tags), générées pour chacun des 25000 gènes d'Arabidopsis. Les GSTs sont des fragments génomiques amplifiés par PCR d'une taille de 150 à 500 paires de base, obtenus à partir de séquences génomiques sur des régions transcrites, sélectionnées pour leur unicité dans le génome. La qualité de toutes les GSTs est vérifiée par électrophorèse sur un gel d'agarose, avant que celles-ci soient déposées mécaniquement sur une lame de verre grâce à un robot (Figure 28). La puce *CATMA* contient 24576 GSTs réparties en 3 métablocs, chacun composés de 64 blocs de 144 spots, un spot correspondant à un gène (Figure 29). Avant de procéder à l'hybridation sur la puce, les ARNs des deux échantillons à comparer sont extraits, reverse transcrits, amplifiés puis marqués par deux fluorochromes différents (Cy5, rouge; et Cy3, vert). Le matériel marqué est alors hybridé sur la puce *CATMA*, et la quantification des signaux vert et rouge permet d'évaluer l'expression différentielle de chaque gène d'un échantillon par rapport à l'autre. Une répétition technique consiste à inverser les fluorochromes (dye-swap) attachés à chacun des deux échantillons (Allemeersch et al., 2005) (Figure 28). Les données obtenues sont normalisées puis soumises à une analyse statistique afin de déterminer les gènes différentiellement exprimés.



Figure 30. Comparaisons réalisées avec la puce CATMA, dans le but d'évaluer l'impact de la fourniture d'urée sur l'expression génique.

Les ARNs racinaire et foliaire ont été extraits de plantules d'Arabidopsis de 42 jours. Les plantes sont cultivées en hydroponie pendant 35 jours sur une solution nutritive contenant 0,5 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Les plantes sont alors transférées sur différents milieux contenant 2 mM d'azote, apporté sous les formes ammonium nitrate (AN), ammonium nitrate et urée (AN+U), et urée (U). Les flèches représentent les conditions comparées sur une même lame.

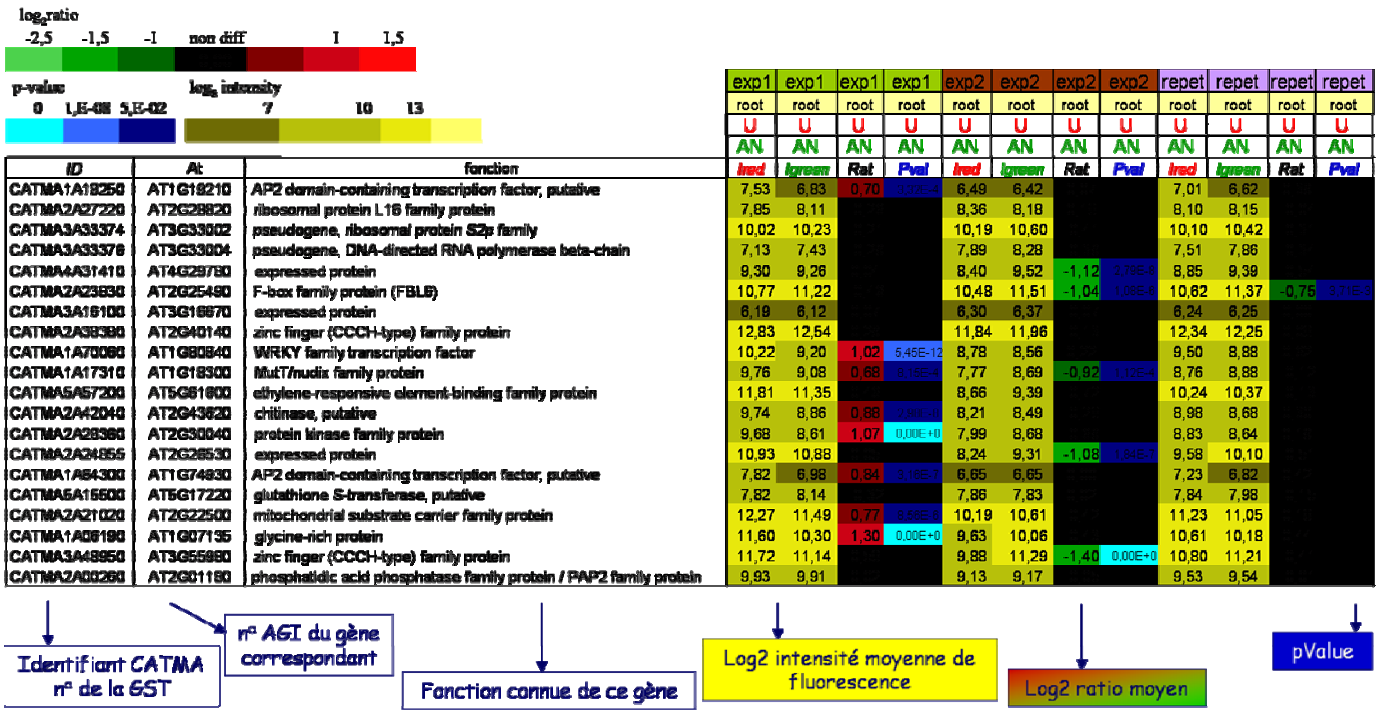


Figure 31. Tableau de présentation des résultats de l'analyse transcriptomique.

Pour chaque répétition biologique ('exp1' et 'exp2'), seule la comparaison urée (U) vs ammonium nitrate (AN) au niveau des racines est représentée. Les moyennes des 'exp1' et 'exp2' sont indiquées dans les colonnes 'repet'. Seulement un nombre très restreint de gènes est également illustré.

Pour la réalisation de notre étude transcriptome cherchant à évaluer l'effet de l'urée sur l'expression génique, nous avons choisi de comparer trois nutritionnements azotés, apportant chacune 2 mM d'azote. Le milieu ammonium nitrate (AN) a constitué notre référence. Il a été comparé à une solution contenant uniquement de l'urée (U), et à un mélange d'ammonium nitrate (AN) et d'urée (U) ajoutés dans les mêmes proportions. De plus nous avons utilisé l'ensemble du matériel végétal à notre disposition, séparé en racines et feuilles, et nous avons réalisé une répétition biologique (répétition expérimentale) (Article 2). Huit comparaisons ont été effectuées (Figure 30).

Les résultats d'analyses différentielles sont présentés sous forme de tableau comportant pour chaque gène et pour chaque comparaison le  $\log_2$  des intensités moyennes (rouge et vert), le ratio moyen des  $\log_2$  des intensités (rouge/vert), et la p-value (mesure statistique de la différence d'expression). Un code couleur permet de visualiser facilement l'échelle des valeurs pour chaque colonne du tableau. Ainsi, une couleur rouge est attribuée aux gènes induits; les gènes réprimés sont indiqués en vert (Figure 31).

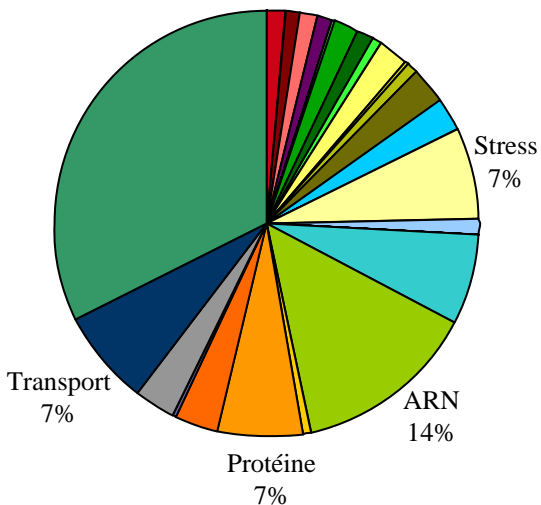
### III.B.2. Interprétation de nos données de transcriptome.

Nous avons choisi l'approche transcriptomique dans le but d'élucider les réseaux de régulation empruntés par la plante pour intégrer l'assimilation de l'urée avec les autres voies métaboliques cellulaires, et ainsi mettre en place les adaptations métaboliques et physiologiques que nous avons pu mesurer précédemment (Article 2; Chapitre II, paragraphe III.A.). L'analyse génomique de la réponse nutritionnelle chez *Arabidopsis*, nous a permis de dresser un catalogue des gènes spécifiquement régulés par l'urée. La liste exhaustive des gènes dont la transcription est modulée en présence d'urée, est détaillée dans l'Article 2. Les résultats présentés ici seront identiques à ceux décrits dans cet article, mais nous avons toutefois choisi des illustrations graphiques différentes, dans le but d'avoir une autre vue d'ensemble des profils d'expression génique générés en réponse à l'urée. Par ailleurs, nous présentons ainsi quelques-unes des applications offertes par l'outil MAPMAN pour interpréter des données génomiques.

Les analyses de transcriptome à haut débit génèrent un énorme set de données. Aussi l'exploitation de cette masse d'informations est-elle limitée par notre capacité à les interpréter. Ces données doivent être hiérarchisées mais aussi replacées dans un contexte biologique déjà connu. Des outils bioinformatiques adaptés et puissants sont alors indispensables pour 'faire parler' l'ensemble des données expérimentales. Leur

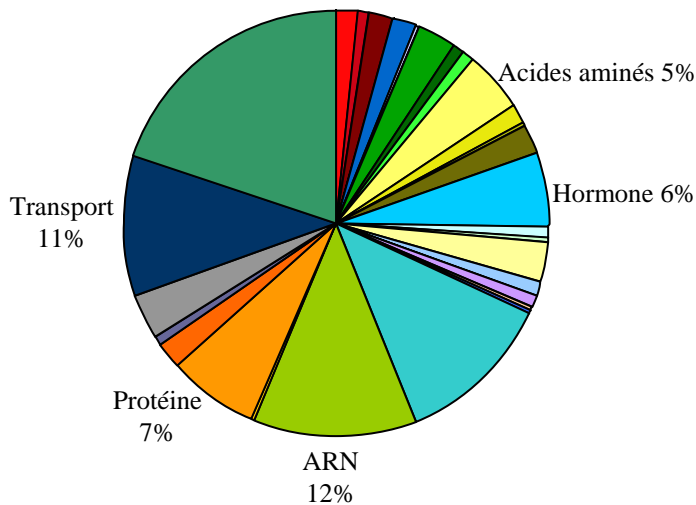
**Processus biologiques induits dans les racines**

U vs AN



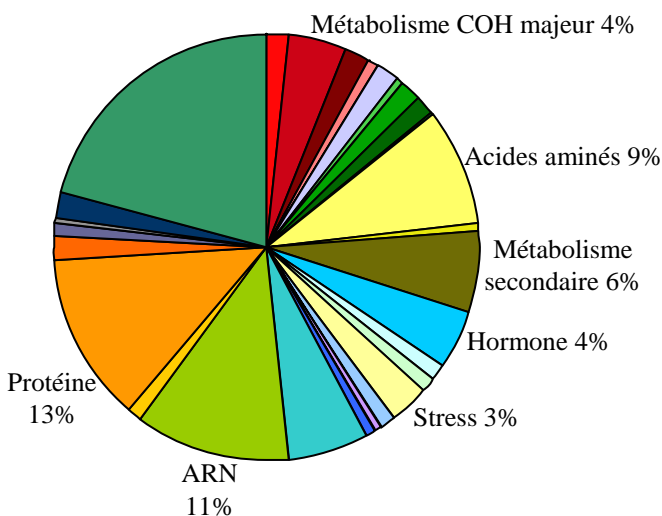
**Processus biologiques réprimés dans les racines**

U vs AN



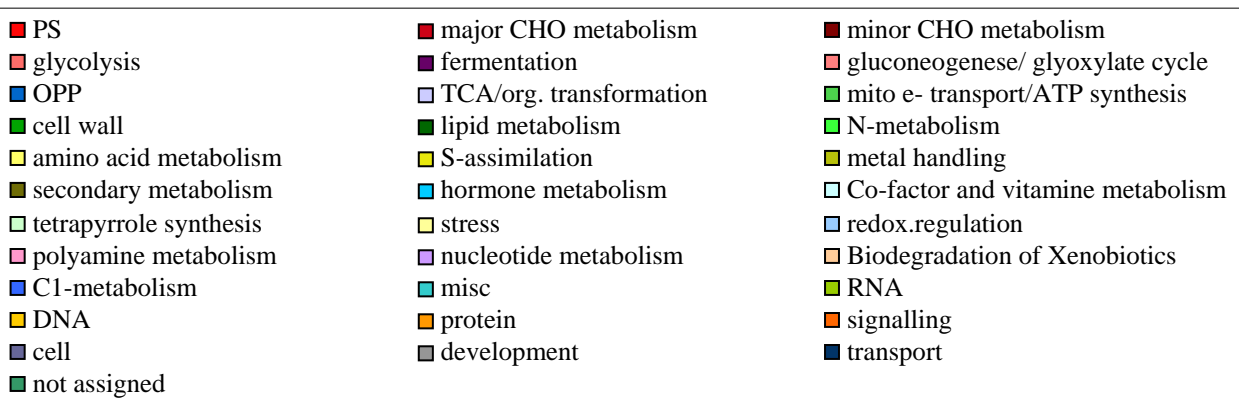
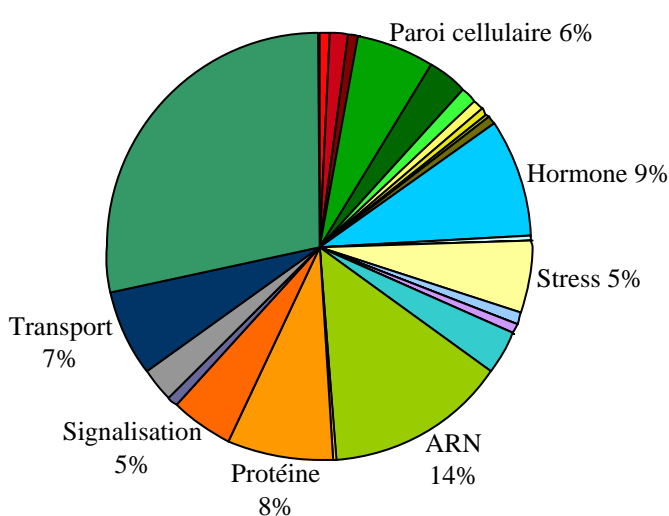
**Processus biologiques induits dans les feuilles**

U vs AN



**Processus biologiques réprimés dans les feuilles**

U vs AN



**Figure 32. Distribution en classes fonctionnelles des gènes racinaires et foliaires différemment exprimés entre des plantes cultivées en présence d'urée (U), et des plantes cultivées en présence d'ammonium nitrate (AN) .**

Les ARNs racinaires et foliaires ont été extraits de plantules d'Arabidopsis de 42 jours. Les plantes sont cultivées en hydroponie pendant 35 jours sur une solution nutritive contenant 0,5 mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Les plantes sont alors transférées sur deux milieux contenant 2 mM d'azote, apporté sous les formes ammonium nitrate (AN), ou urée (U). Classification MAPMAN (Thimm et al., 2004); P-value<0,05.

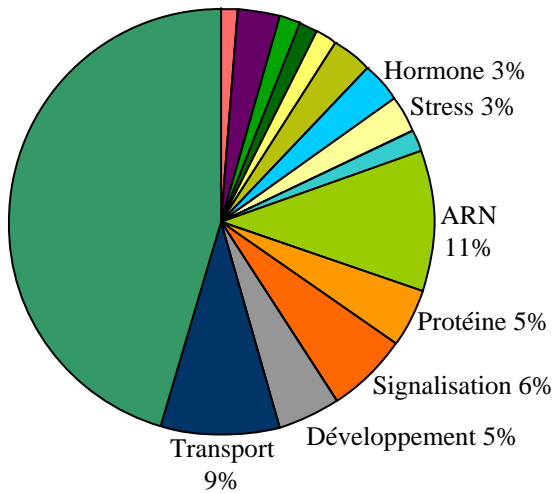
développement a connu un formidable essor parallèlement aux avancées technologiques des approches transcriptomiques. Plusieurs logiciels sont aujourd'hui disponibles. Pour notre étude nous avons choisi le logiciel MAPMAN (Thimm et al., 2004; <http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan/>). MAPMAN permet le classement des données génomiques dans des catégories fonctionnelles hiérarchiques.

Les Figures 32 et 33 illustrent sous forme de diagrammes circulaires cette répartition en classes fonctionnelles des gènes différentiellement exprimés au cours de notre étude. Ce même classement est présenté dans les Tableaux III et VI, complémentaires à l'Article 2. Les classes fonctionnelles les plus représentées selon les comparaisons sont ici facilement visualisées.

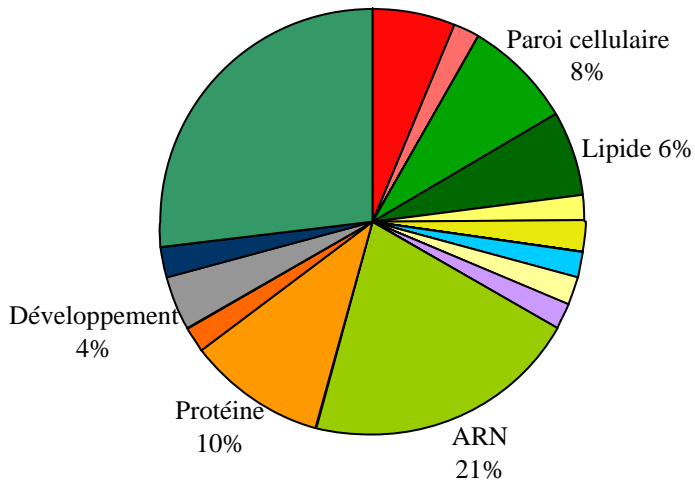
Chaque gène est ainsi assigné à une fonction biologique dès lors que celle-ci soit connue dans les bases de données publiques. Un autre module du logiciel MAPMAN combine ces données fonctionnelles, pour replacer chaque gène au cœur des processus biologiques dans lesquels il intervient. Finalement la masse de données génomiques se traduit par une représentation symbolique des voies métaboliques et autres processus biologiques, où chaque gène mis en jeu sous l'effet du stimulus étudié est représenté par un petit carré. Les gènes impliqués dans un processus particulier sont ainsi groupés dans l'espace, et des orientations biologiques particulières sont facilement mises en évidence, alors qu'elles seraient moins apparentes sur une liste de gènes individuels.

Les diagrammes présentés sur les Figures 34 à 39 sont quelques unes des interprétations graphiques de la compilation de nos données par le logiciel MAPMAN. La visualisation graphique des gènes qui répondent à l'urée montre clairement une plus forte modification des niveaux de transcription lorsque l'urée est la seule source d'azote disponible pour la plante, par rapport à un mélange urée et AN (Figures 34 à 39 A, et B). Les changements de l'expression génique sont aussi plus importants au niveau racinaire que foliaire (Figures 34, 35, 36, et Figures 37, 38, 39). Il apparaît clairement que le passage d'une forme azotée AN vers l'urée, engendre chez le végétal, de profondes variations dans l'expression des gènes assignés à des processus métaboliques très variés (Figures 34 et 37). La forte proportion des gènes répondant à l'urée, impliqués dans la transcription et le métabolisme protéique déjà relevé dans l'Article 2, se retrouve ici (Figures 35 et 38). La dominance de la couleur bleu indique que ces gènes sont majoritairement induits (Figure 35A). Dans les racines, les processus de régulation médiés par les cytokinines et l'acide jasmonique sont réprimés alors que la régulation par les auxines et l'éthylène est plutôt induite. Parmi les gènes cibles différentiellement exprimés, les gènes de biosynthèse des cytokinines *AtIPT3* et *AtIPT5* sont

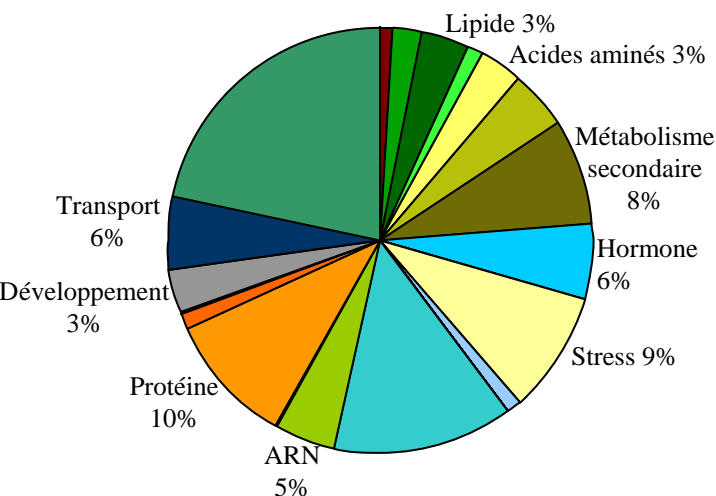
**Processus biologiques induits dans les racines AN+U vs AN**



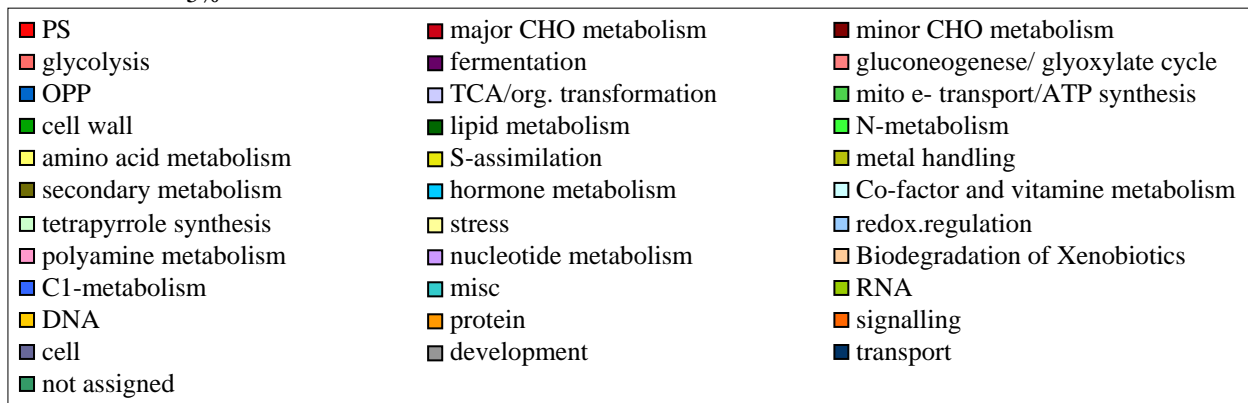
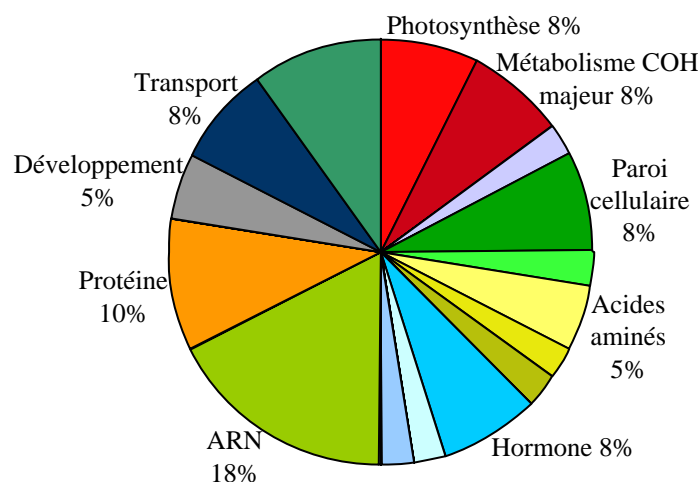
**Processus biologiques réprimés dans les racines AN+U vs AN**



**Processus biologiques induits dans les feuilles AN+U vs AN**



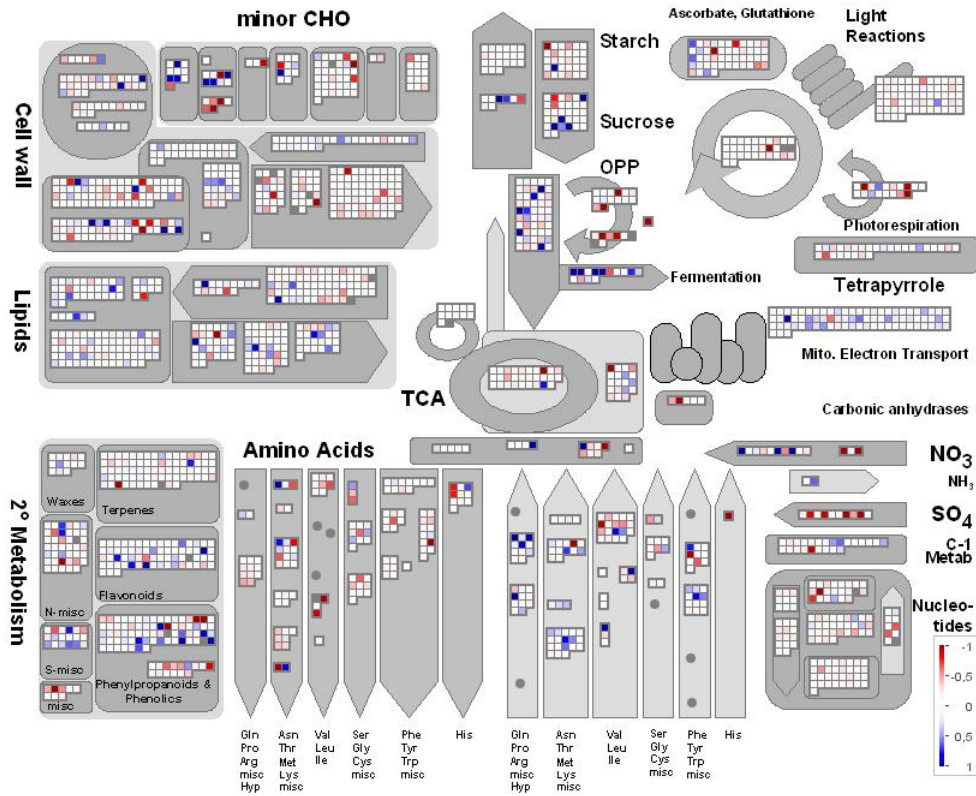
**Processus biologiques réprimés dans les feuilles AN+U vs AN**



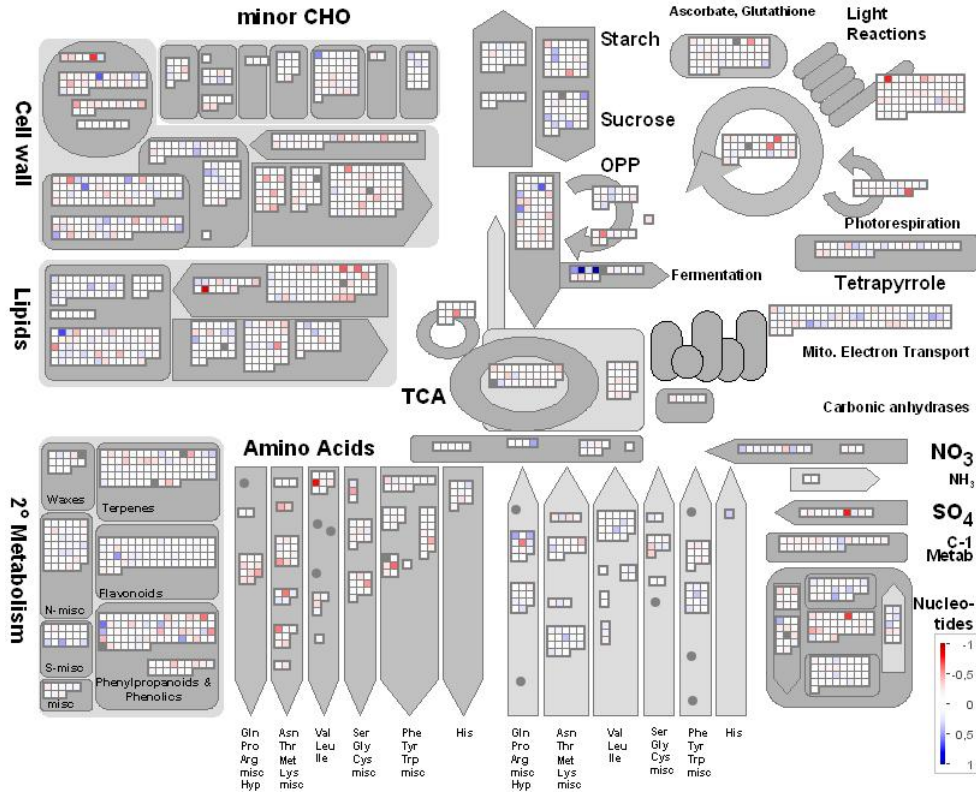
**Figure 33. Distribution en classes fonctionnelles des gènes racinaires et foliaires différemment exprimés entre des plantes cultivées en présence d'ammonium nitrate et d'urée (AN+U), et des plantes cultivées en présence d'ammonium nitrate (AN).**

Les ARNs racinaires et foliaires ont été extraits de plantules d'Arabidopsis de 42 jours. Les plantes sont cultivées en hydroponie pendant 35 jours sur une solution nutritive contenant 0,5 mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Les plantes sont alors transférées sur deux milieux contenant 2 mM d'azote, apporté sous les formes ammonium nitrate (AN), ou urée (U). Classification MAPMAN (Thimm et al., 2004); P-value<0,05.

## A. U vs AN



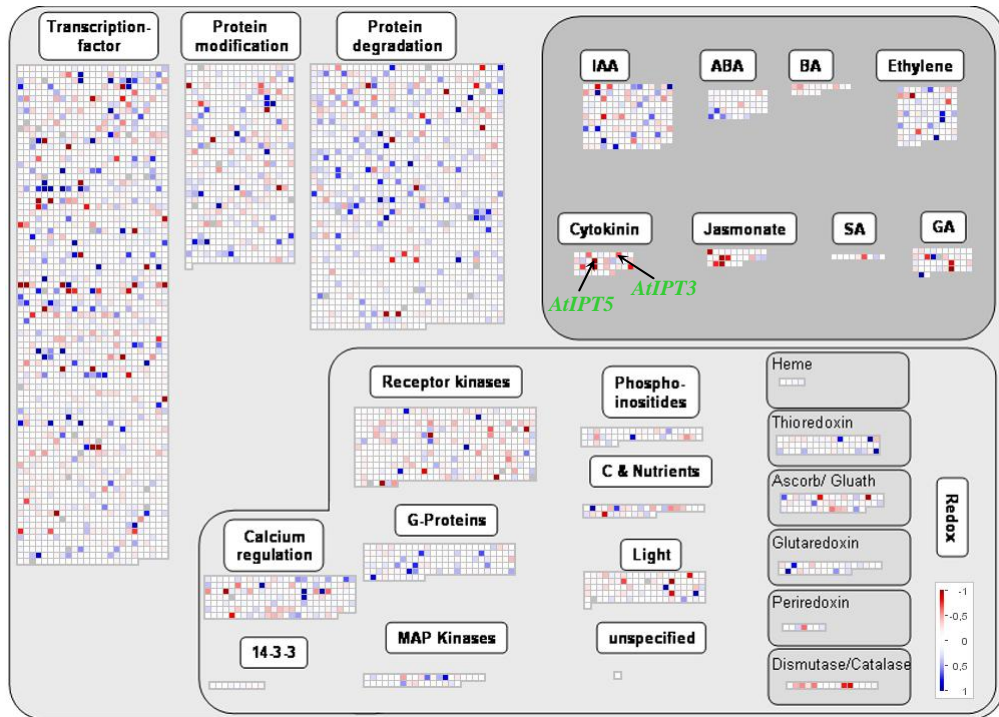
## B. AN+U vs AN



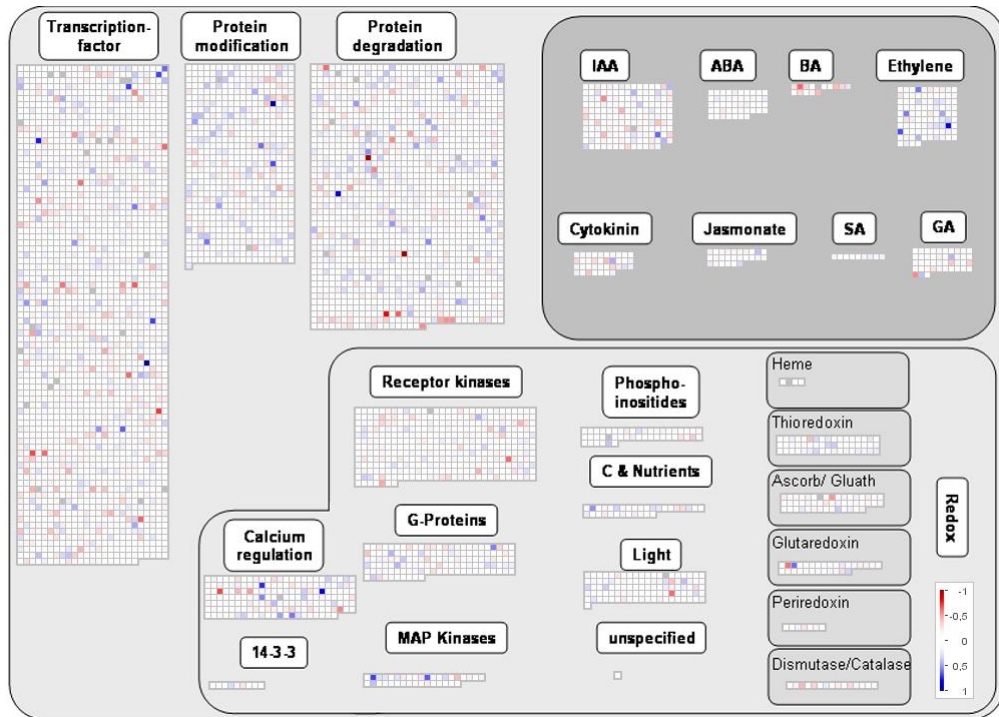
**Figure 34. Vue d'ensemble des gènes racinaires liés au métabolisme.**

Les ARNs ont été extraits sur des racines d'Arabidopsis de 42 jours. Les plantes sont cultivées en hydroponie pendant 35 jours sur une solution nutritive contenant 0,5 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Les plantes sont alors transférées sur deux milieux contenant 2 mM d'azote, apporté sous les formes ammonium nitrate (AN), ou urée (U). Un carré représente un gène. Le carré est bleu si le gène est induit, et rouge s'il est réprimé en présence d'urée. Classification MAPMAN (Thimm et al., 2004); P-value < 0,05.

## A. U vs AN



## B. AN+U vs AN

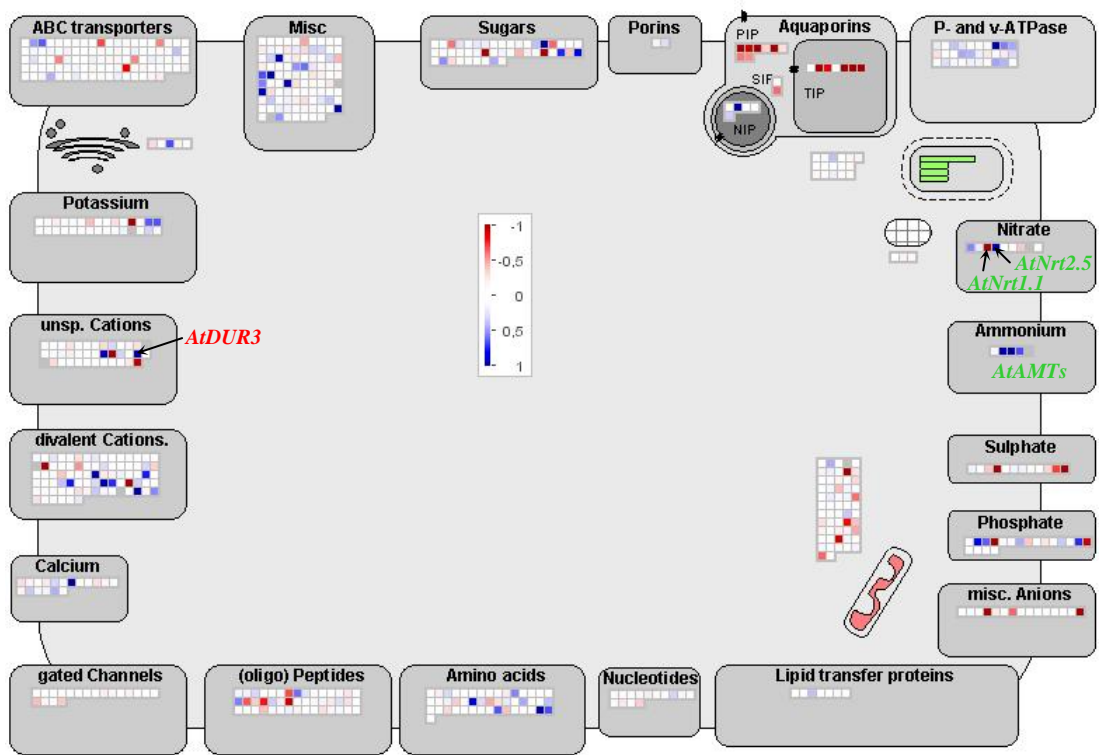


**Figure 35. Vue d'ensemble des gènes racinaires liés aux processus de régulation.**

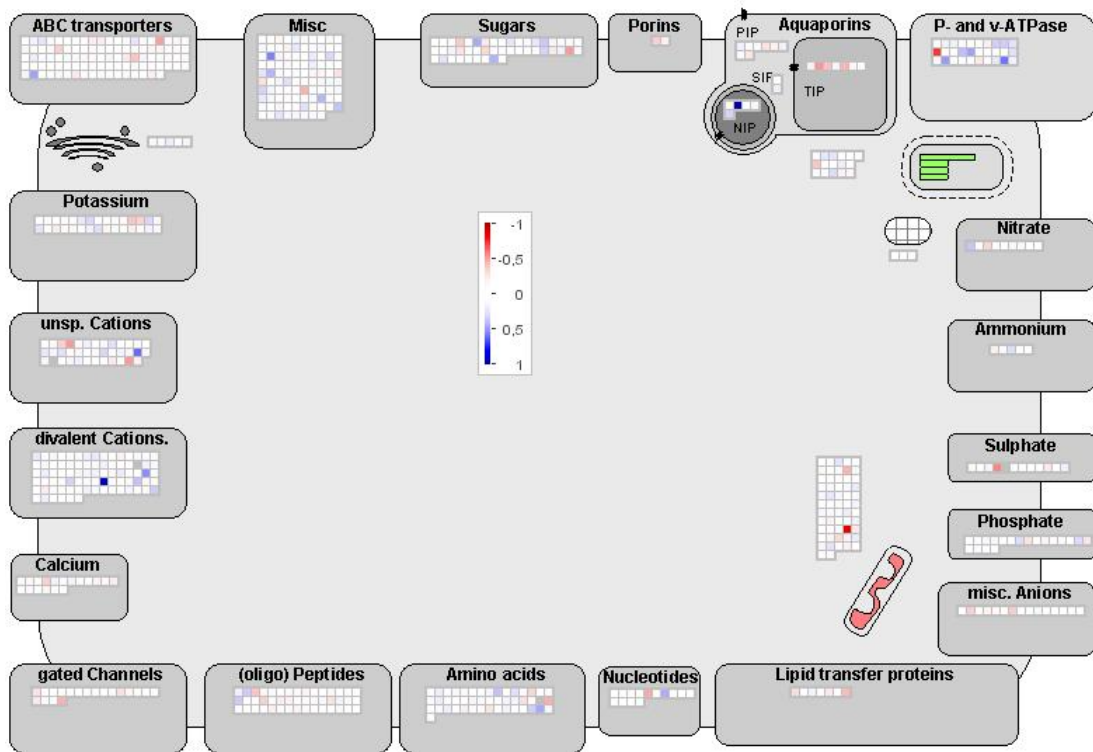
Les ARNs ont été extraits sur des racines d'Arabidopsis de 42 jours. Les plantes sont cultivées en hydroponie pendant 35 jours sur une solution nutritive contenant 0,5 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Les plantes sont alors transférées sur deux milieux contenant 2 mM d'azote, apporté sous les formes ammonium nitrate (AN), ou urée (U). Un carré représente un gène. Le carré est bleu si le gène est induit, et rouge s'il est réprimé en présence d'urée. Classification MAPMAN (Thimm et al., 2004); P-value < 0,05.



## A. U vs AN



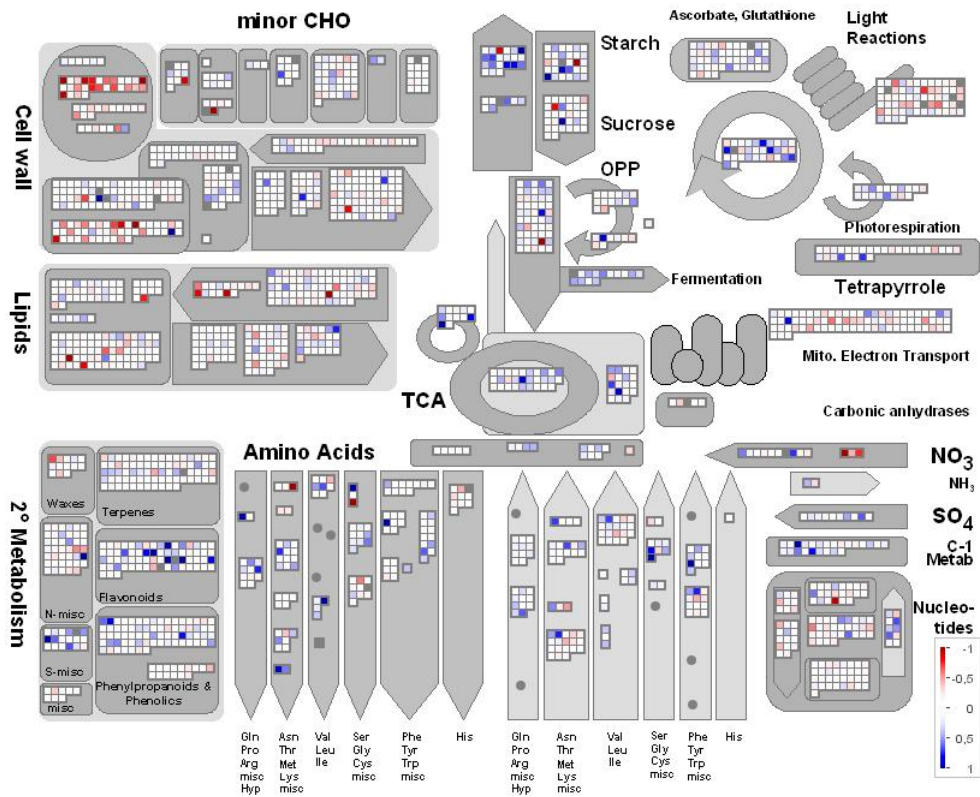
## B. AN+U vs AN



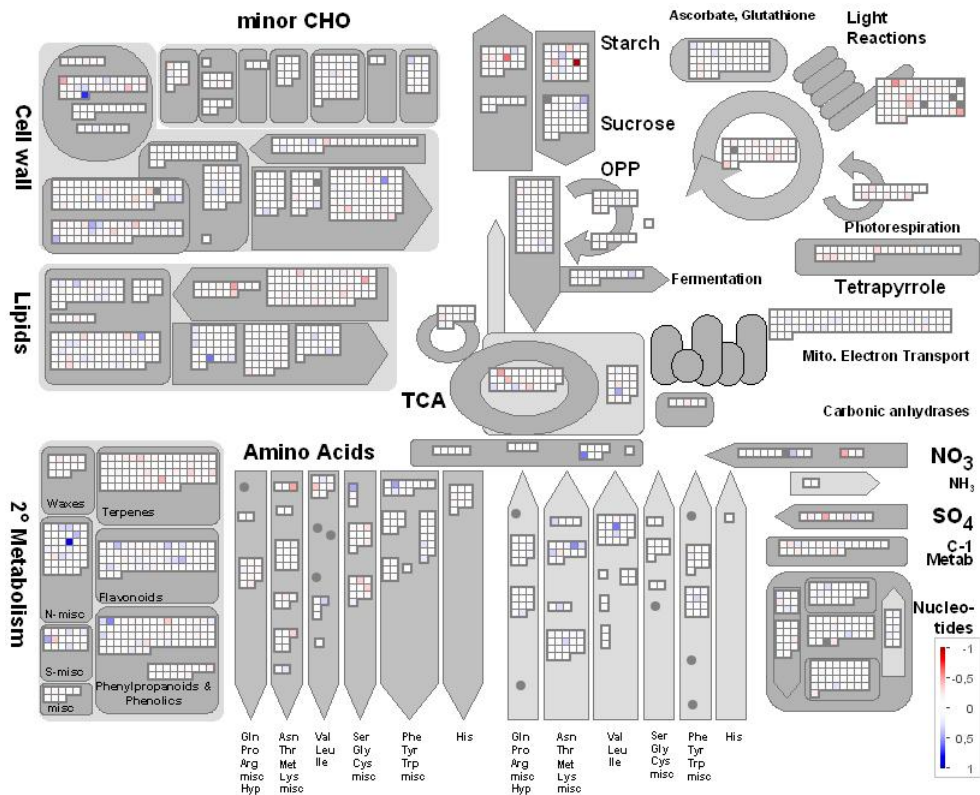
**Figure 36. Vue d'ensemble des gènes racinaires liés aux processus de transport.**

Les ARNs ont été extraits sur des racines d'Arabidopsis de 42 jours. Les plantes sont cultivées en hydroponie pendant 35 jours sur une solution nutritive contenant 0,5 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Les plantes sont alors transférées sur deux milieux contenant 2 mM d'azote, apporté sous les formes ammonium nitrate (AN), ou urée (U). Un carré représente un gène. Le carré est bleu si le gène est induit, et rouge s'il est réprimé en présence d'urée. Classification MAPMAN (Thimm et al., 2004); P-value < 0,05.

## A. U vs AN



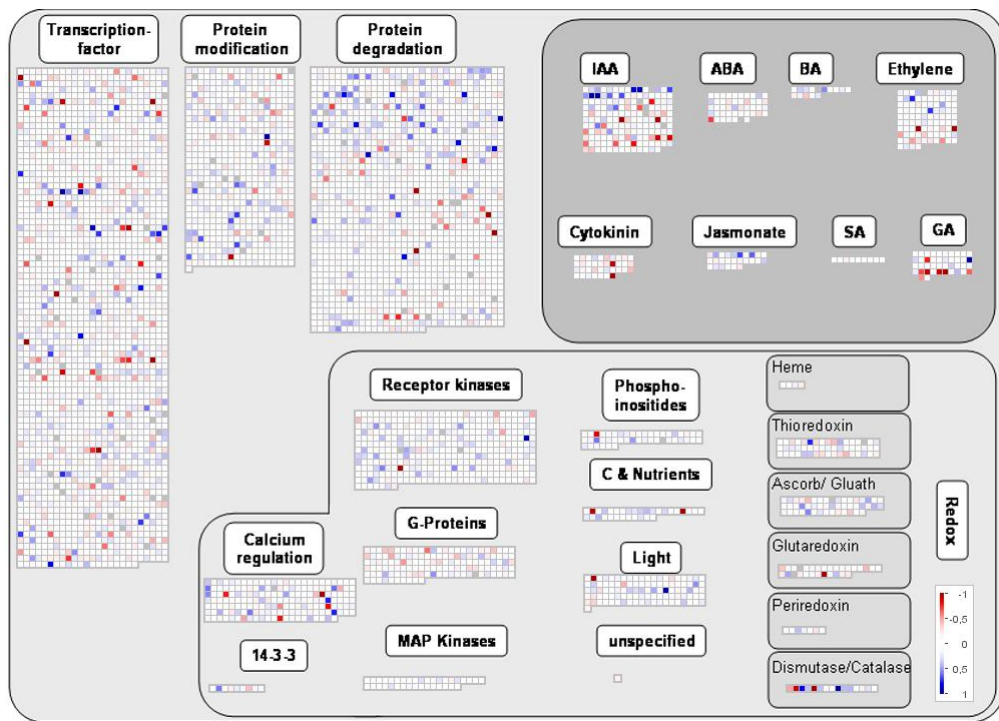
## B. AN+U vs AN



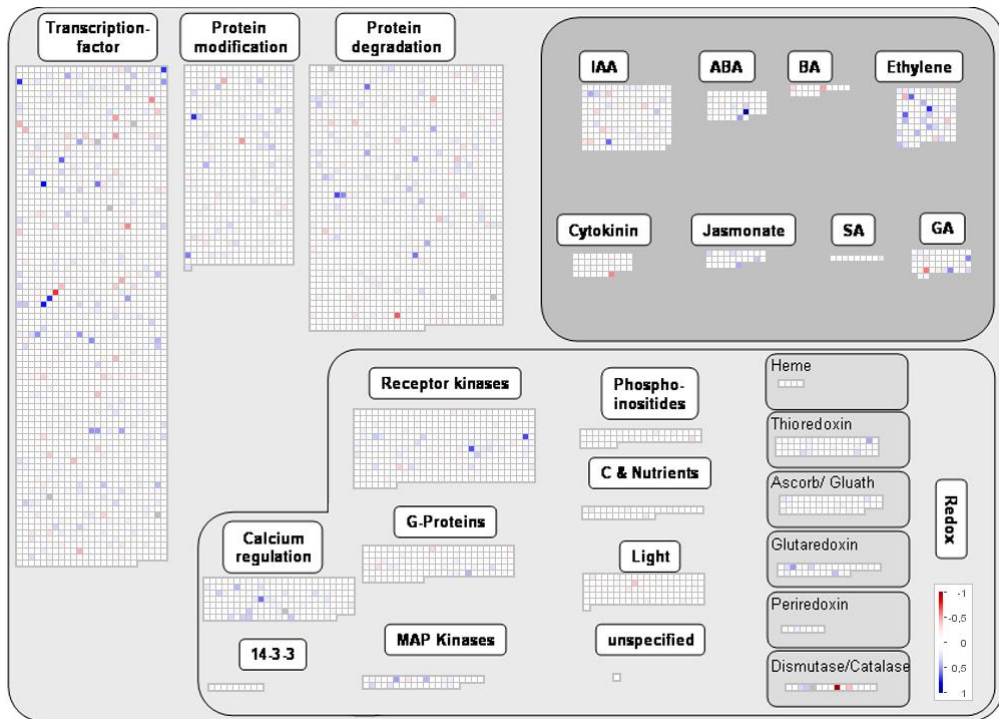
**Figure 37. Vue d'ensemble des gènes foliaires liés au métabolisme.**

Les ARNs ont été extraits sur des rosettes d'Arabidopsis de 42 jours. Les plantes sont cultivées en hydroponie pendant 35 jours sur une solution nutritive contenant 0,5 mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Les plantes sont alors transférées sur deux milieux contenant 2 mM d'azote, apporté sous les formes ammonium nitrate (AN), ou urée (U). Un carré représente un gène. Le carré est bleu si le gène est induit, et rouge s'il est réprimé en présence d'urée. Classification MAPMAN (Thimm et al., 2004); P-value < 0,05.

## A. U vs AN



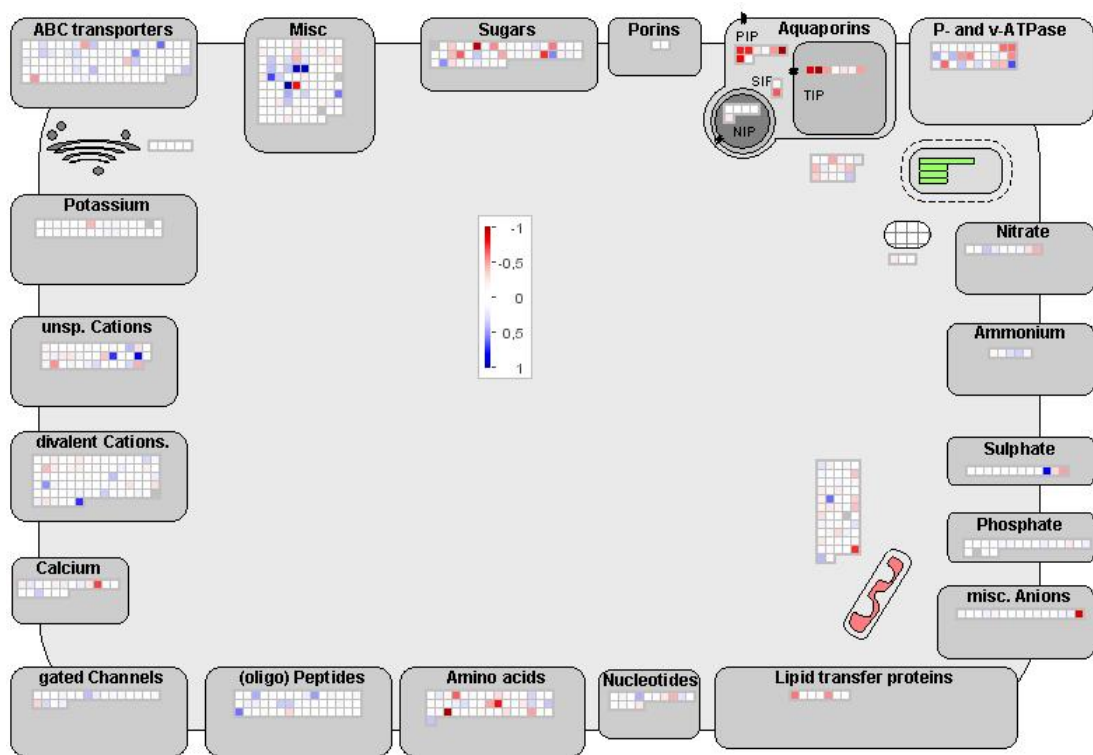
## B. AN+U vs AN



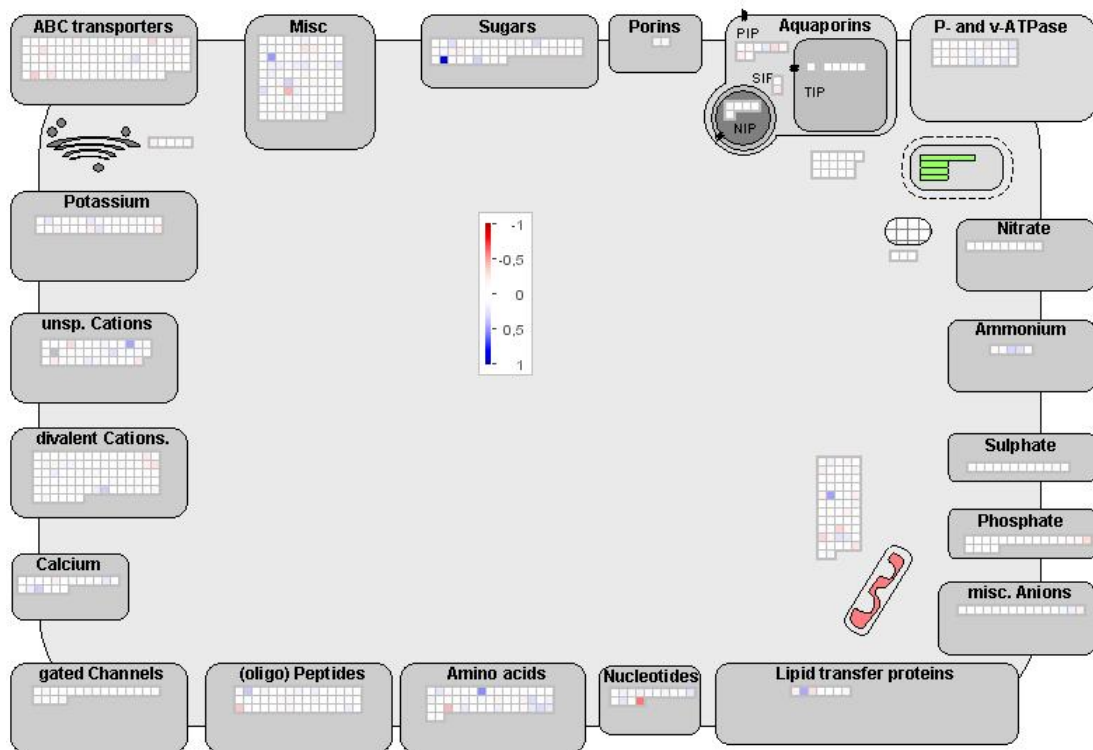
**Figure 38. Vue d'ensemble des gènes foliaires liés aux processus de régulation.**

Les ARNs ont été extraits sur des rosettes d'Arabidopsis de 42 jours. Les plantes sont cultivées en hydroponie pendant 35 jours sur une solution nutritive contenant 0,5 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Les plantes sont alors transférées sur deux milieux contenant 2 mM d'azote, apporté sous les formes ammonium nitrate (AN), ou urée (U). Un carré représente un gène. Le carré est bleu si le gène est induit, et rouge s'il est réprimé en présence d'urée. Classification MAPMAN (Thimm et al., 2004); P-value < 0,05.

## A. U vs AN



## B. AN+U vs AN



**Figure 39. Vue d'ensemble des gènes foliaires liés aux processus de transport.**

Les ARNs ont été extraits sur des rosettes d'Arabidopsis de 42 jours. Les plantes sont cultivées en hydroponie pendant 35 jours sur une solution nutritive contenant 0,5 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Les plantes sont alors transférées sur deux milieux contenant 2 mM d'azote, apporté sous les formes ammonium nitrate (AN), ou urée (U). Un carré représente un gène. Le carré est bleu si le gène est induit, et rouge s'il est réprimé en présence d'urée. Classification MAPMAN (Thimm et al., 2004); P-value < 0,05.

réprimés dans les racines des plantes cultivées sur urée (Figure 35A). Différents gènes de type ARR répondent aussi négativement à l'urée. À l'inverse, les gènes *NIT2* (nitrilase) et *CYP83B1*, gènes de la voie de biosynthèse des auxines (Woodward & Bartel, 2005), sont induits dans les feuilles en présence d'urée. Dans le cas du gène codant pour la nitrilase 2, cette induction semble spécifique à l'urée (Article 2, Tableau III). Dans les feuilles, la différence est moins nette et les gènes de signalisation par les auxines semblent autant induits que réprimés (Figure 38A). Nous pouvons donc envisager que ces variations dans le niveau d'expression des gènes liés aux phytohormones, soient une explication à la stimulation du développement racinaire des plantes sur urée (Article 2). En effet les cytokinines et les auxines ont des rôles antagonistes dans le développement racinaire. Les auxines stimulent la formation des racines latérales et adventives, alors que les cytokinines inhibent la formation des racines et inversent l'effet des auxines (Aloni et al., 2006). L'éthylène est un autre signal hormonal impliqué dans la formation des racines latérales (Aloni et al., 2006). Il est difficile de savoir si cette signalisation hormonale particulière est une réponse à l'urée elle-même, ou si elle traduit un changement du statut azoté interne de la plante sous une alimentation uréique, c'est-à-dire la baisse des ressources en azote (Article 2).

Concernant les processus liés au transport, le transport de l'ammonium est induit, de même que celui des acides aminés et des cations divalents. A l'inverse, les aquaporines et le transport du sulfate sont inhibés (Figure 36A). Nous retrouvons l'induction du gène *AtNrt2.5*, ainsi que la répression du gène *AtNrt1.1*, codant respectivement pour un transporteur à haute et à faible affinité du nitrate (Figure 36A).

#### **IV. Utilisation de l'urée par Arabidopsis: conclusions & perspectives.**

Tout comme le maïs et le blé (Chapitre I), Arabidopsis est capable d'absorber l'urée sous sa forme moléculaire, et d'utiliser l'azote uréique pour assurer sa croissance. Chez les céréales, l'urée représente la source d'azote la moins efficace en terme de rendement par rapport à l'ammonium sulfate et surtout à l'ammonium nitrate (Article 1, Chapitre I). Si une nutrition exclusivement sous forme d'urée est aussi moins efficace par rapport à une nutrition mixte de nitrate et ammonium chez Arabidopsis, l'urée est, en revanche, aussi efficace qu'une nutrition ammoniacale en terme de croissance (Chapitre II, Paragraphe III.).

Les plantes alimentées avec de l'urée comme seule source d'azote présentent aussi des symptômes caractéristiques d'une limitation en azote. Ce manque d'azote n'est pas généré par



une incapacité des plantes à assimiler l'azote issu de l'urée, mais il naît plutôt consécutivement à une moindre efficacité d'absorption de l'urée par les racines, par rapport au nitrate ou à l'ammonium. En effet, l'urée absorbée est rapidement hydrolysée par les uréases des cellules racinaires, et l'ammonium produit est alors assimilé via le cycle GS-GOGAT pour former glutamine et autres acides aminés nécessaires à la croissance de la plante. Une faible partie de l'urée absorbée semble être toutefois, véhiculée vers les parties aériennes par les vaisseaux du xylème (Figure 27).

Nous avons également pu mesurer l'effet de l'addition d'urée à d'autres sources azotées sur l'influx de nitrate, d'ammonium ou d'urée. Le transport d'urée semble positivement régulé par son substrat, l'urée, et inhibé par la présence d'ammonium nitrate. En outre la présence d'urée dans le milieu semble inhiber le transport du nitrate, alors que le transport d'ammonium semble inductible par la présence d'urée (Article 2).

L'originalité de notre étude tient à notre analyse du transcriptome d'*Arabidopsis* en réponse à une addition d'urée. Nous avons ainsi pu relier nos résultats physiologiques et la modulation de l'expression génique en réponse à l'urée chez *Arabidopsis* (Article 2). Nous avons ainsi obtenu un set de gènes cibles qui répondent spécifiquement à l'urée. L'ensemble de nos résultats de transcriptome devra toutefois être validé, par exemple par la confirmation de l'expression différentielle de quelques gènes en RT-PCR quantitative. Préférentiellement nous choisirons comme matériel végétal des plantes issues d'une culture indépendante à celles utilisées pour notre analyse génomique globale. Notre étude transcriptome ainsi validée, nos efforts porteront alors sur la compréhension des mécanismes mis en jeu par ces gènes cibles en réponse à l'urée.





# CONCLUSION GENERALE

## Effacité d'utilisation de l'urée par les végétaux.

Notre travail s'est attaché à mieux comprendre les mécanismes mis en jeu par la plante en réponse à une addition d'azote sous la forme urée. Nous avons tout d'abord mis en place une vaste étude sur différents paramètres métaboliques, afin de caractériser 'l'état physiologique' de la plante soumise à une nutrition uréique. Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence des adaptations du métabolisme végétal en réponse à l'urée. Plantes de grandes cultures (maïs et blé), et Arabidopsis, révèlent des 'états physiologiques' globalement identiques. Ces analyses physiologiques ont été complétées au niveau moléculaire par une analyse de l'expression génique chez Arabidopsis à l'aide des puces CATMA. En cela, ce travail constitue (à notre connaissance), la première étude transcriptomique en réponse à l'urée.

### I. L'absorption de l'urée & le problème de son hydrolyse.

L'étude de l'absorption de l'urée implique un strict contrôle de son processus d'hydrolyse. Nous avons ainsi multiplié les précautions afin d'empêcher l'hydrolyse de l'urée dans nos conditions de culture. Nous avons tout d'abord fait le choix d'un système de culture en hydroponie, dans lequel les paramètres de la nutrition minérale sont parfaitement contrôlés. Nous avons aussi renouvelé les solutions nutritives tous les deux jours dans le cas du maïs et du blé, et quotidiennement pour Arabidopsis. Enfin, au cours de nos cultures sur céréales, nous avons suivi l'évolution de la solution uréique par des contrôles réguliers de pH, contenus en urée, ammonium et nitrate. Malgré tout, nous ne pouvons pas affirmer qu'une petite partie de l'urée apportée n'a pas été hydrolysée dans nos conditions de culture en hydroponie (Articles 1 et 2). S'il y a effectivement eu une hydrolyse partielle de l'urée, le phénomène reste néanmoins très faible dans nos conditions de culture.

Nous avons aussi obtenu des résultats assez puissants, notamment grâce à l'utilisation d'urée marquée à l'azote 15 et aux mesures d'influx d'urée, pour pouvoir affirmer que l'urée est effectivement absorbée par les racines des plantes sous sa forme moléculaire, et ceci aussi bien chez le maïs et le blé que chez Arabidopsis.



## II. Absorption & Assimilation de l'urée.

Maïs, blé et *Arabidopsis* sont non seulement capables d'absorber l'urée sous sa forme moléculaire, mais aussi d'assimiler l'azote issu de l'urée afin d'assurer leur croissance. L'urée reste toutefois une source d'azote moins efficace, en terme de rendement, qu'une solution mixte de nitrate et d'ammonium, mais aussi efficace par rapport à une nutrition ammoniacale, du moins pour *Arabidopsis*.

Cette plus faible efficacité d'utilisation d'urée par les plantes semble davantage due à une plus faible efficacité d'absorption de l'urée, plutôt qu'à une plus faible assimilation de l'azote issu de l'urée, par rapport au nitrate et à l'ammonium. En effet, la nutrition uréique est associée à une forte augmentation des quantités de glutamine dans la plante. L'ammonium issu de l'hydrolyse de l'urée par les uréases des cellules racinaires, est alors incorporé aux différents acides aminés via le cycle GS-GOGAT, de la même façon que l'ammonium absorbé, issu de la photorespiration, ou de la réduction du nitrate (Article 2).

Nous avons apporté la preuve physique d'un transport d'urée à travers les racines des plantes, mais qu'en est-il des modalités du transport de l'urée au niveau moléculaire? L'équipe de Nicolaus von Wirén a identifié un transporteur à haute affinité de l'urée chez *Arabidopsis*, *AtDUR3* (Liu et al., 2003a), ainsi que quatre protéines tonoplastiques (*AtTIPs*) assurant le transport facilité de l'urée (Liu et al., 2003b). Notre étude du transcriptome montre que l'expression du gène *AtDUR3* est fortement induite dans les racines des plantes alimentées avec de l'urée par rapport à celles au contact d'ammonium nitrate. Nous avons aussi montré que l'influx d'urée dans les racines est positivement régulé par la présence préalable d'urée dans le milieu de culture (Article 2). Ainsi, nous pouvons supposer que le transport d'urée que l'on a mis en évidence se fait, du moins en partie, via la protéine *AtDUR3*. Cependant il peut exister d'autres systèmes de transport de l'urée. Alors que Liu et collaborateurs ont montré une surexpression du gène *AtDUR3* au cours de la carence azotée (Liu et al., 2003a), nous n'avons pas mesuré d'augmentation de l'influx d'urée chez nos plantes carencées (Article 2). Cela suggère l'existence d'un autre niveau de régulation du transport d'urée par *AtDUR3*, en aval de la transcription. Le niveau d'expression d'aucun des quatre transcrits *AtTIPs* n'est modifié en réponse à l'urée dans notre analyse transcriptome. Par contre la transcription de deux aquaporines *At2g29870* et *At2g34390* est spécifiquement induite par l'urée (Article 2). Le transport d'urée via les aquaporines a déjà été montré par système d'expression



hétérologues dans les ovocytes de xénopes (Eckert et al., 1999; Gerbeau et al., 1999). Nous pouvons donc penser que ces deux aquaporines soient aussi des transporteurs potentiels d'urée. Des études complémentaires comme l'étude d'expression de ces gènes par RT-PCR quantitative ou l'analyse de mutants, sont à envisager pour obtenir de nouvelles informations quant à la fonction de ces gènes et leur éventuelle implication dans le transport de l'urée.

### III. L'urée: facteur nutritionnel régulateur du transport de l'azote.

L'urée a un rôle nutritionnel en tant que tel en permettant la croissance végétale lorsqu'elle constitue la seule source d'azote disponible pour la plante. La présence d'urée régule également les systèmes de transport dédiés aux trois formes azotées, nitrate, ammonium et urée.

L'urée semble directement impliquée dans la régulation de son propre transport. L'augmentation de l'influx d'urée dans les racines des plantes préalablement alimentées avec l'urée comme seule source d'azote le prouve. En revanche cette augmentation s'avère être contrebalancée par l'ajout d'ammonium nitrate dans la solution nutritive. La présence d'ammonium nitrate semble donc inhiber le transport d'urée (Article 2). Cette observation est en accord avec notre analyse transcriptome qui montre que le gène *AtDUR3* est fortement induit dans les racines en présence d'urée. Lorsque l'on ajoute de l'ammonium nitrate, le gène reste induit dans les racines, mais cette induction est fortement réduite dans l'une de nos répétitions biologiques (pour l'autre répétition, le gène est aussi induit mais la *P*value est supérieure à 0,05). Quant aux systèmes de transport du nitrate et de l'ammonium, nos résultats montrent qu'ils sont aussi régulés par la présence d'urée. Alors que l'influx de nitrate est réduit suite à une période de culture des plantes sur une solution nutritive contenant uniquement de l'urée, comparée à une solution mixte d'urée et d'ammonium nitrate, l'influx d'ammonium est quant à lui stimulé (Article 2). Si ces observations sont parfaitement confirmées au niveau moléculaire dans le cas du transport de l'ammonium, les réponses concernant le pattern d'expression des gènes de transport du nitrate sont plus contrastées. En effet, notre analyse génomique révèle une augmentation du niveau d'expression des transcrits de trois transporteurs d'ammonium en réponse à la seule présence d'urée (*AtAMT1.3*, *AtAMT1.1* et *AtAMT2*). Quant au nitrate, si la présence d'urée stimule l'expression des gènes *AtNRT2.5* et *AtNRT2.4*, elle diminue le niveau de transcription du gène *AtNRT1.1*. Le gène *AtNRT2.1*, le plus abondamment transcrit dans les racines et majoritaire dans l'influx du



nitrate à haute affinité (Orsel et al., 2002), n'est pas différentiellement exprimé en réponse à l'urée. Des études complémentaires seront nécessaires afin de comprendre les modalités des mécanismes de régulation par l'urée du transport du nitrate, mais aussi de l'ammonium et de l'urée.

#### IV. L'urée: molécule signal ?

Outre son rôle nutritionnel, l'urée semble être impliquée dans le développement de la racine. En effet maïs, blé, et Arabidopsis présentent tous le même phénotype racinaire en réponse à la présence d'urée, à savoir un développement accru de la racine (Articles 1 et 2). Dans l'état actuel de nos différentes expérimentations, il nous est difficile de savoir si c'est un effet propre à la molécule urée, ou si ce phénomène traduit plus une réponse à la limitation en azote. Toutefois, nous pouvons penser que l'urée jouerait bien un rôle de molécule signal dans la mise en place de l'architecture racinaire. Même si ce ne sont que des études préliminaires qu'il faudra étoffer, nos cultures *in vitro* en boîtes verticales semblent montrer un effet local de l'urée sur le développement racinaire (voir Chapitre II, Paragraphe III.A.1.). Nos analyses transcriptome montrent également une corrélation étroite entre apport d'urée et expression de différents gènes liés à la signalisation et à la synthèse des hormones auxine et cytokinine, faisant plus penser à un effet systémique de l'urée (voir Chapitre II, Paragraphe III.B.2.).

Notre travail apporte donc de réelles avancées dans la compréhension des mécanismes d'absorption et d'assimilation de l'urée chez les plantes. De nombreuses questions restent cependant sans réponses à l'issue de ce travail, ce qui ouvre un vaste champ d'investigations pour de futures recherches. Forts de ces connaissances, nous pourrions ainsi améliorer l'efficacité d'absorption et d'assimilation de l'urée chez les plantes, et réhabiliter l'urée en tant que fertilisant azoté, dans un souci d'une agriculture durable, moins coûteuse et plus respectueuse de l'environnement.





# CHAPITRE I

## Etudes biochimiques & physiologiques.

### I. Descriptif des extraits marins.

Trois extraits d'algues marines ont été utilisés au cours de notre étude. Les algues ont été récoltées sur l'Archipel de Bréhat (côte nord bretonne, France) et préparées selon les processus de fabrication de notre partenaire industriel, la société BiotechMarine, une filiale du groupe Roullier basée à Pontrieux (Côtes d'Armor, 22). Chacun des trois extraits a été choisi pour sa composition chimique particulière.

#### I.A. Extrait 1116.

C'est un extrait d'algues vertes (*Ulva spp.*) obtenu selon une méthode d'extraction aqueuse à chaud. Il est essentiellement composé de polysaccharides, et en particulier d'acides uroniques et de sucres neutres qui représentent respectivement 17 et 43% des sucres totaux. L'activité élicitrice de cet extrait a été caractérisée, pour la première fois, grâce à une étude du transcriptome par microarray chez *Medicago Truncatula* (Cluzet et al., 2004). L'expression de nombreux gènes de défense est induite suite à la pulvérisation de l'extrait d'algue, et cet extrait génère aussi une protection accrue des plantes contre les attaques pathogènes (Cluzet et al., 2004).

#### I.B. Extrait 1208.

Cet extrait a été obtenu par une hydrolyse aqueuse en milieu alcalin d'algues brunes. C'est un extrait auxinique, désigné ainsi du fait de sa richesse en auxines estimées à 4269  $\mu\text{g L}^{-1}$ .



## I.C. Extrait NA9158.

Cet extrait a été préparé à partir d'algues brunes selon une extraction aqueuse en milieu acide et à chaud. Il est riche en cytokinines (5600 ng L<sup>-1</sup>).

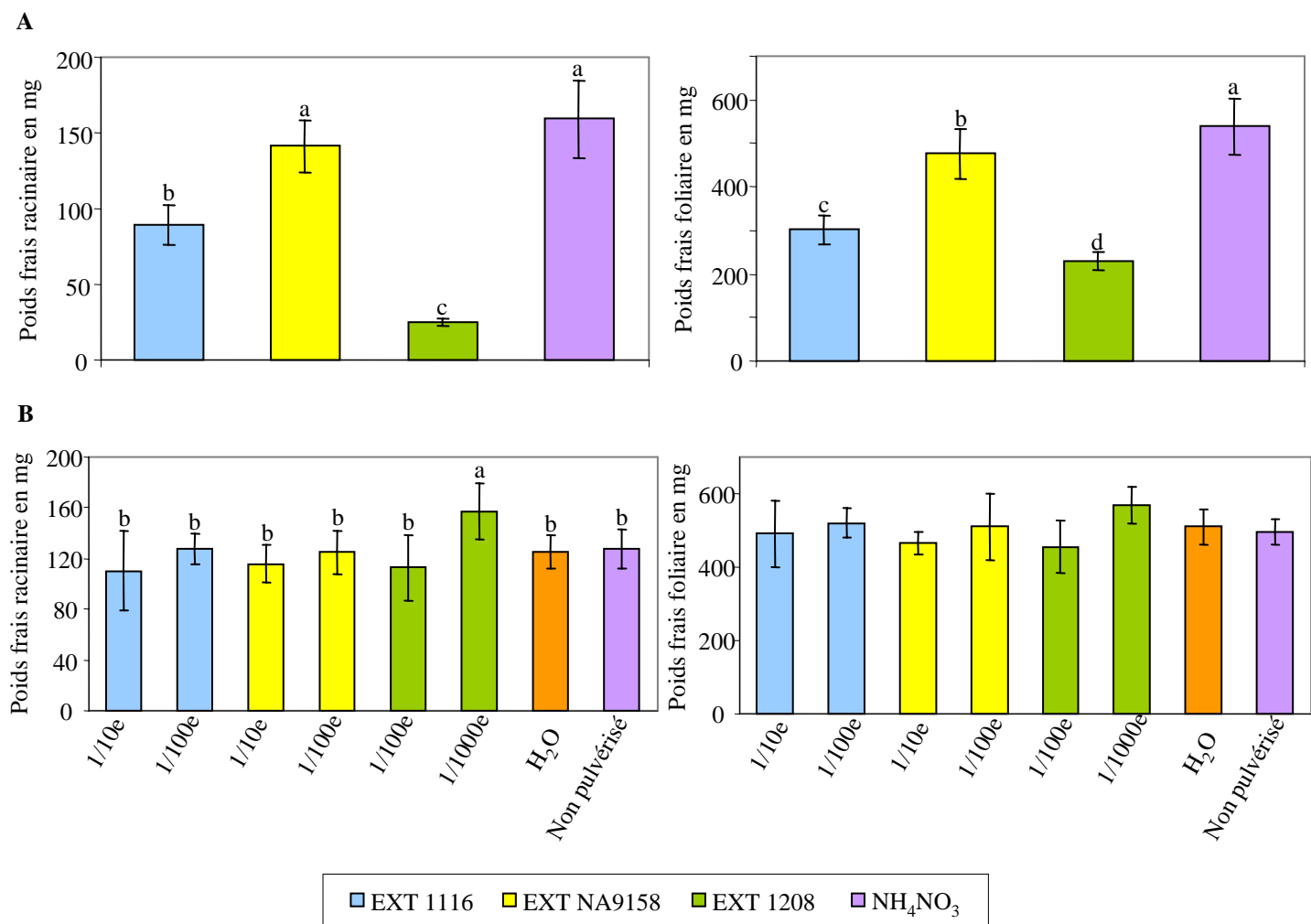
## II. Effets des extraits d'algues sur la croissance & le statut azoté de la plante.

### II.A. Mise au point du dispositif expérimental de culture.

Nous avons choisi la culture en hydroponie d'Arabidopsis afin de tester l'effet des extraits d'algues sur les paramètres azotés de la plante. Les extraits d'algues ont été apportés aux plantes, soit par pulvérisation foliaire, soit ils ont été directement ajoutés à la solution nutritive.

Des graines d'Arabidopsis ont été semées puis cultivées en conditions contrôlées sur une solution nutritive contenant 1 mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (Article 3). Le milieu de culture a été renouvelé tous les deux jours. Après 35 jours de culture, les plantules ont été séparées en deux lots. Des pulvérisations d'extraits d'algues ont été réalisées sur les feuilles des plantes de l'un des lots (Article 3). Les trois extraits d'algues ont été testés, chacun à deux concentrations différentes suivant les recommandations de BiotechMarine: 10 et 1% pour les extraits 1116 et NA9158; 1% et 1‰ pour l'extrait 1208. Certaines plantes ont été pulvérisées avec de l'eau, et d'autres n'ont subi aucune pulvérisation, en terme de contrôles. Afin de faciliter l'absorption, un agent mouillant (Silwet) a été ajouté aux solutions de pulvérisation à une concentration finale de 0,01%. Pour le second lot, les différents extraits d'algues ont été ajoutés directement dans la solution nutritive à une concentration de 1‰ (v, v). La solution nutritive a été renouvelée tous les deux jours, et l'ensemble des plantes a été récolté au 42<sup>ème</sup> jour de culture. Racines et feuilles ont été séparés, pesés, puis congelés dans l'azote liquide afin d'être analysés. Les contenus en azote total, en nitrate et en acides aminés ont été mesurés afin de caractériser le statut azoté des plantes selon le traitement imposé.

Une seconde expérimentation réalisée dans les mêmes conditions, s'est attachée à faire une étude cinétique de l'effet des substances marines sur la croissance, les paramètres azotés et l'expression des gènes chez Arabidopsis. Les plantes ont été récoltées une heure, puis un,



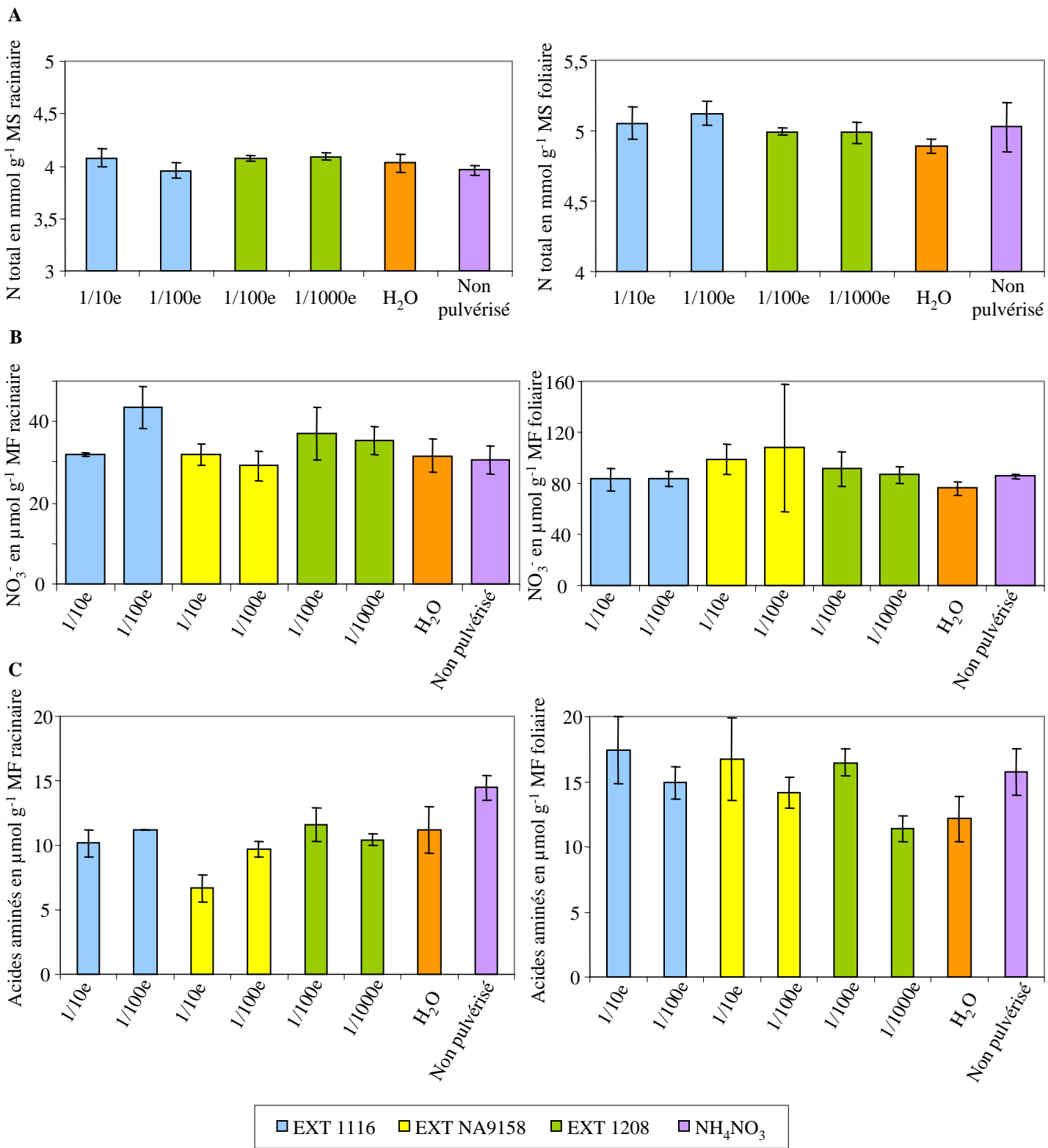
**Figure 40. Distribution de la masse fraîche entre les racines et les feuilles des plantes après l'apport des extraits d'algues directement dans la solution (A) ou par pulvérisation foliaire (B).**

Les plantes d'*Arabidopsis* ont été cultivées pendant 35 jours en hydroponie sur un milieu contenant 1 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Les plantes ont alors été séparées en 2 lots, puis 3 extraits d'algues ont été ajoutés à la solution nutritive (1‰), ou pulvérisés sur les feuilles à différentes concentrations. Les plantes sont récoltées à 42 jours, une semaine après l'apport d'algues. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions. Les différentes lettres correspondent aux groupes significativement différents à P<0,05.

trois et sept jours après pulvérisation des extraits 1116 (10%), 9158 (10%) et 1208 (1‰). Enfin, nous avons répété cette dernière culture mais en la simplifiant. Seul l'extrait 1208 a été pulvérisé, avec deux points de cinétique, une heure et sept jours. Les paramètres azotés n'ont pas été mesurés lors de cette expérimentation.

## II.B. Effets des extraits d'algues sur la croissance et les paramètres azotés des plantes.

Les plantes répondent différemment aux extraits d'algues selon qu'ils soient ajoutés directement dans la solution nutritive ou pulvérisés sur la rosette (Figure 40). Lorsque les extraits sont directement dilués dans le milieu de culture, l'effet sur la croissance des plantes est globalement négatif sauf pour l'extrait NA9158 (Figure 40A). Les plantes cultivées sur l'extrait 1208 étaient extrêmement chétives (pourrissement de la racine). La concentration utilisée était certainement trop forte pour cet extrait. En revanche, quel que soit le type d'extrait et sa concentration, peu de différences de croissance sont apparues entre les contrôles et les plantes pulvérisées avec les extraits d'algues. Cependant l'extrait 1208 utilisé à 1‰ a conduit à un effet de croissance positif sur l'ensemble de la plante et plus particulièrement sur la racine (Figure 40B). Nous n'avons toutefois observé aucune différence quant à l'aspect des racines entre ces plantes traitées avec l'extrait 1208 et les plantes témoins. Compte tenu de la faible croissance des plantes nourries avec les extraits d'algues apportés en solution, nous avons choisi d'effectuer les analyses uniquement sur les plantes soumises à la pulvérisation des extraits d'algues. Aucune différence du contenu en azote total n'est apparue suite à la pulvérisation des extraits 1116 et 1208 (l'azote total n'a pas été mesuré pour la pulvérisation de l'extrait NA9158) (Figure 41A). De même, les concentrations en nitrate et en acides aminés totaux ont peu varié suite aux pulvérisations (Figure 41B, C). La pulvérisation avec l'extrait 1116 à 1% a toutefois entraîné une légère augmentation de la concentration en nitrate dans les racines. L'ensemble de ces résultats a été confirmé lors de notre deuxième expérimentation (Figure 42A, B, et C).

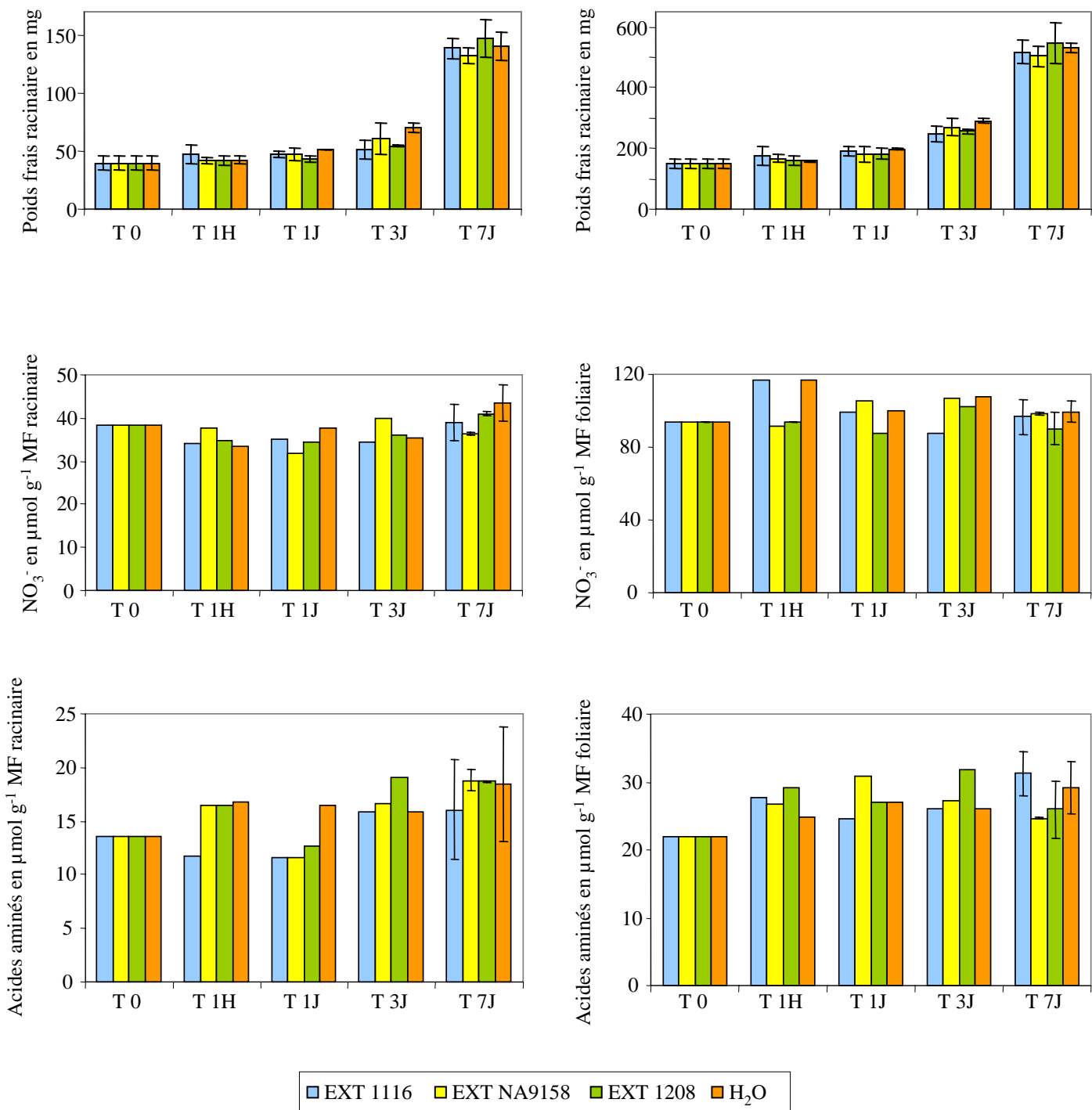


**Figure 41. Contenu en azote total (A), en nitrate (B) et en acides aminés (C) dans les racines et les feuilles des plantes après la pulvérisation foliaire des extraits d'algues.**

Les plantes d'*Arabidopsis* ont été cultivées pendant 35 jours en hydroponie sur un milieu contenant 1 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. 3 extraits d'algue ont alors été pulvérisés sur les feuilles des plantes à différentes concentrations. Les plantes sont récoltées à 42 jours, une semaine après l'apport d'algues. Les valeurs sont des moyennes de 5 répétitions.

## II.C. Conclusions.

L'absence d'effets constatés des extraits d'algues sur la croissance et les paramètres azotés de la plante a été un résultat décevant. L'extrait 1208 a toutefois retenu notre attention. L'apport de cet extrait par pulvérisation foliaire a montré un effet positif sur la croissance des plantes, et en particulier au niveau de la racine. Cette réponse phénotypique de la plante n'est certes pas significative, mais elle pourrait facilement s'expliquer par la composition chimique de l'extrait algal. Celui-ci se caractérise par sa richesse en auxines, phytohormones impliquées dans l'initiation des racines latérales chez *Arabidopsis* (Casimiro et al., 2003). Le développement des racines latérales est un déterminant majeur de l'architecture racinaire. Elles assurent non seulement l'ancrage de la racine dans le sol, mais elles contribuent aussi à l'efficacité d'utilisation de l'eau par la plante de même qu'elles facilitent l'extraction des éléments nutritifs du sol. L'architecture racinaire détermine la surface d'échange entre la racine et le sol, et l'utilisation de l'extrait d'algue 1208 sur les cultures montre ainsi toute son importance agronomique. Toutefois, cet effet de l'extrait 1208 sur le développement racinaire doit être confirmé et demande davantage d'études notamment en système de boîtes verticales. Il serait aussi intéressant de tester l'effet de cet extrait d'algue sur des plantes carencées en azote, dans l'espoir d'obtenir une réponse plus prononcée. Durand et collaborateurs ont ainsi pu montrer que la stimulation de l'activité nitrate réductase est accrue lorsque l'extrait N PRO est apporté sur des plantes cultivées en conditions limitantes de nitrate (Durand et al., 2003).



**Figure 42. Distribution de la masse fraîche (A) et contenu en nitrate (B) et en acides aminés (C) dans les racines et les feuilles des plantes après la pulvérisation foliaire des extraits d’algues.**

Les plantes d’*Arabidopsis* ont été cultivées pendant 35 jours en hydroponie sur un milieu contenant 1 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Les extraits d’algues 1116, NA9158 et 1208 ont alors été pulvérisés sur les feuilles, respectivement à une concentration de 10%, 10% et 1%. Les plantes sont récoltées à 42 jours, une semaine après l’apport d’algues. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions.



# CHAPITRE II

## Etudes transcriptomiques.

Même si notre étude physiologique sur les effets d'une pulvérisation foliaire de trois extraits d'algues sur la croissance et le métabolisme végétal, n'a pas révélé des effets forts, les substances marines sont reconnues pour leur intérêt agronomique. Cependant les voies de signalisation des substances algales sont encore très obscures. L'utilisation des nouveaux outils de biologie moléculaires comme les puces à ADN, est apparue comme la meilleure approche afin d'aborder ce problème. Le caractère systémique de l'approche transcriptome nous permet ainsi d'ouvrir au maximum les champs d'investigation sur les modalités d'action des substances marines.

Dans le but d'identifier les gènes dont l'expression est modulée en réponse à la pulvérisation foliaire de substances marines, nous avons utilisé deux types de puces à ADN. Nous avons, d'une part, rassemblé sur une membrane macroarray des sondes correspondant aux gènes clefs des métabolismes azoté et carboné. D'autre part, afin d'élargir les données de transcriptome, nous avons utilisé la puce CATMA (voir Partie I). Seul l'extrait algal ayant montré un effet positif sur la croissance des plantes a été étudié au niveau moléculaire, à savoir l'extrait 1208. Il sera désigné par l'abréviation AE (Extrait Auxinique) dans la suite du manuscrit.

### I. Mise au point d'un filtre macroarray.

Les membranes sont, parmi les trois types essentiels de puces (membranes, lames de verre, et genechips (Affimérix)), les outils les plus accessibles dans la plupart des laboratoires de biologie moléculaire. Nous avons choisi de construire notre propre membrane dédiée aux gènes clefs des métabolisme azoté et carboné, afin d'étudier les éventuelles interactions entre la transcription de ces gènes et la présence d'extraits d'algues.

**Tableau 5. Gènes spottés sur la membrane macroarray.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	14-3-3-like	sulfite reductase	Fd-GOGAT	putative hexose transporter MSS1	ADP-GPP	GLU2	PEPC1	Putative protein/hypothetical protein	ARR6	anhydrase carbonique	chalcone synthase	Nrt2.4
B	Ca <sup>2+</sup> dep protein kinase	pyruvate kinase	microbody NAD-dep malate dehydrogenase	leucine zipper HBP-1B-like	transporteur sucre	ICDH	Unknown Prot contains 2 kelch motifs	GASA2	salt-stress induced gamma TIP	PR proteine	Fd-Nitrite Reductase	Nrt2.5
C	APS reductase	IDH2	RING zinc finger prot	UDP-GPP	NADH-GOGAT	beta-1,3 glucanase	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanging protein	noduline	GAI	G6P deshydrogenase	Nrt1.1	Nrt2.6
D	pyruvate kinase	AMP-binding protein	beta fructosidase 4	PIP3	PEPC	HXK2	serine acetyltransferase	GASA3	phosphogluconate deshydrogenase	SUC1	GS1	Nrt2.7
E	MAP2K5alpha	serine acetyltransferase 2	NaCl-inducible Ca <sup>2+</sup> binding prot	anhydrase carbonique	ferredoxin-NADP Reductase	Cyclopropane fatty acyl Phospholipide synthase	UDP-GPP	proline oxidase	NOI (gène induit par le nitrate)	GST	AMT1	GS2
F	ICDH	mitochondrial citrate synthase	homologue gène induit par nitrate	histidine decarboxylase	GDH2	transketolase DEF	delta tonoplast protein	Arginosuccinate synthase	Lipase	ABRE (bZIP)	N2R15	AtHVA22b-like protein
G	nicotianamine synthase	CAB Protein 4 precursor homolog	ATHB12	NR1	pyrroline carboxylate reductase T5r	PEPC3	glutamine-dep ASN1	leucine-rich repeat protein	CLC-a	transporteur phosphate	Nrt2.1	Témoin + Apt
H	IDH1	lectine	MADS-box transcription factor AGL18	P2	ketol-acid reductoisomerase	GDH2	régulation aluminium/auxine	isocitrate lyase	Monoxygenase 2 MO2	SAG29	Nrt2.3	Témoin - pKS

## I.A. Le choix des gènes.

La liste des 96 gènes que nous avons choisi de déposer sur le filtre a été définie par l'ensemble des membres du laboratoire. Nous avons fait appel à chacun d'entre eux afin qu'ils répertorient les principaux gènes du métabolisme azoté et carboné qu'ils souhaiteraient voir apparaître sur la membrane. Nous avons réuni l'ensemble de leurs propositions, fait un tri et sélectionné 96 gènes. Ceux-ci sont listés dans le Tableau 5, en fonction de leur position sur le filtre.

## I.B. La préparation du filtre à moyenne densité.

Pour la réalisation de notre projet puce à ADN, nous avons utilisé une banque de clones cDNA d'*Arabidopsis* (27 plaques de 384 puits contenant 9877 ESTs et 6000 gènes) fournis par l'Unité de Recherche en Génomique Végétale d'Evry (collaboration avec Pierre Hilson).

L'ensemble des 27 plaques de 384 puits a été dupliqué afin d'avoir une réplique de secours en cas de problème. Pour cela, toutes les colonies ont été repiquées manuellement une à une à l'aide de cônes pour pipette stériles dans du milieu 2-YT contenant de l'ampicilline (150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) et 10% de glycérol, à raison de 50  $\mu\text{L}$  de milieu de culture par puits. Les colonies repiquées sont alors incubées une nuit à 37°C puis conservées à - 80°C.

Une autre étape du travail de préparation a consisté à faire une recherche informatique afin d'assigner une EST (Expressed Sequence Tag) à chacun des gènes choisis pour figurer sur le filtre. Les séquences des 96 gènes candidats proviennent des bases de données publiques. Ces séquences ont été utilisées pour rechercher les ESTs correspondantes grâce au programme BLASTN (Altschul et al., 1997) contre les bases de données EST chez *Arabidopsis thaliana*, disponibles au NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Des recherches complémentaires d'ESTs correspondantes aux gènes d'intérêt ont été effectuées sur TAIR (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>).

Nous avons ensuite recherché les ESTs correspondantes dans le fichier décrivant l'ensemble des colonies bactériennes rassemblées en plaques 384 puits (URGV, Evry). La position des clones d'intérêt ayant été identifiée sur l'ensemble des 27 plaques de 384 puits, ceux-ci ont été repiqués sur une plaque 96 puits, incubés une nuit à 37°C et conservés à - 80°C.

Les produits de PCR correspondant aux ADNc ont été amplifiés à partir d'une culture bactérienne grâce aux amorces universelles M13 sens et reverse (94°C 5 min, puis 94°C 30



sec, 55°C 45 sec, 72°C 2,30 min pour 40 cycles, et un dernier cycle à 72°C 15 min), puis purifiés sur filtres Microcon<sup>®</sup>-PCR. Chaque produit de PCR a été examiné sur un gel d'agarose et validé uniquement si une seule bande claire et de taille attendue était observée. Le dépôt sur gel nous a aussi permis une estimation de la concentration du produit de PCR. L'ensemble des 96 clones a été séquencé par la société Eurogentec, le séquençage ayant été amorcé du côté 3' par l'oligonucléotide reverse M13. La qualité des séquences a été confirmée par l'estimation du nombre total de nucléotides indéterminés inférieur à 0,1%. Les séquences ont alors été analysées et comparées aux ESTs grâce au programme Bestfit sur le logiciel du GCG (Genetics Computers Group, Wisconsin, USA) mais aussi en utilisant le programme BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

### I.C. Le spotting.

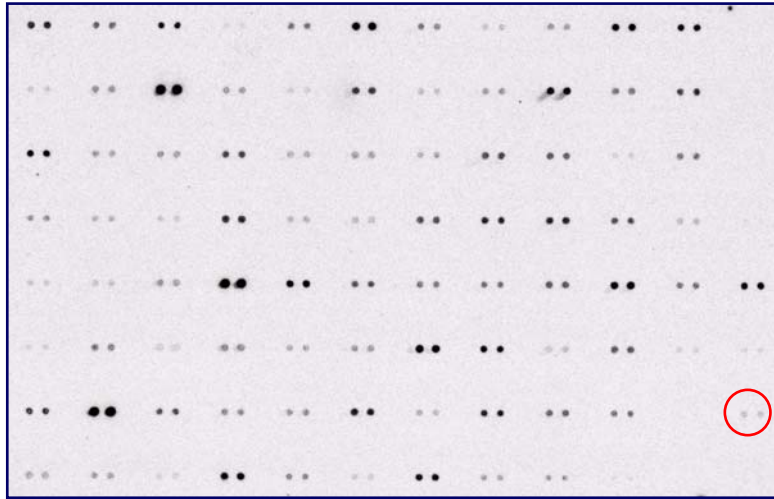
La concentration des produits de PCR purifiés a été ajustée autour de 100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , puis ceux-ci ont été rassemblés dans une plaque 96 puits en attendant le dépôt sur membrane. Les ADNc ont été déposés sur des membranes de nylon Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup> 8 X 12 cm (Amersham) puis fixés aux UV. Le dépôt a été réalisé par un robot QBot (Genetix) en collaboration avec François Piumi sur le site du CRB GADIE (Centre de Ressources Biologiques Génomique des Animaux Domestiques et d'Intérêt Economique) localisé sur le site de Jouy en Josas. Pour chaque clone, le dépôt a été dupliqué afin d'apporter un élément de contrôle supplémentaire au moment de l'analyse des résultats d'hybridation. La qualité du dépôt a été vérifiée par le CRB en utilisant comme sonde un pool d'une dizaine de produits de PCR choisis parmi ceux déposés sur la membrane. Cette démarche contrôle qualité a permis de vérifier le schéma de dépôt, la présence d'un signal pour chaque spot déposé, la forme et l'aspect des spots ainsi que la reproductibilité des dépôts.

Cent copies de ce filtre thématique 'gènes du métabolisme azoté et carboné' ont ainsi vu le jour, ce nombre important se justifiant par la nécessité de reproduire au maximum les expériences, mais aussi pour une utilisation plus générale du filtre par l'ensemble des membres du laboratoire.

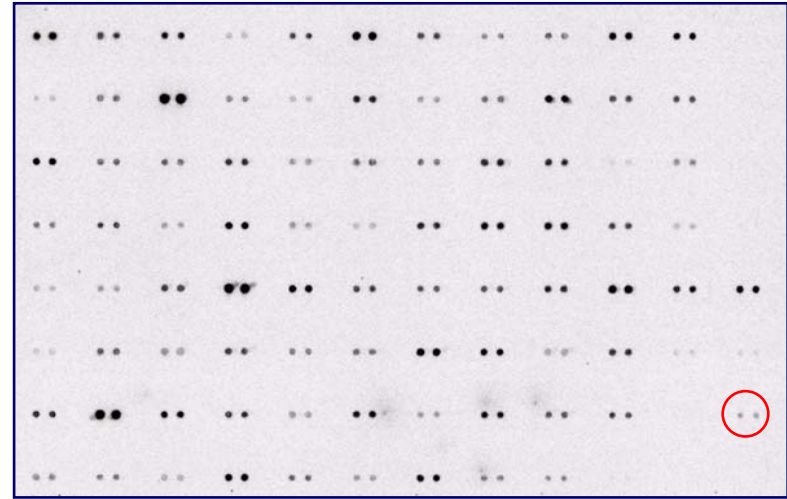
### I.D. Les hybridations différentielles.

Les profils comparés sont obtenus par hybridation avec des sondes complexes synthétisées à partir d'ARNs prélevées sur des plantes traitées ou non. Les quantités d'ARNs servant de

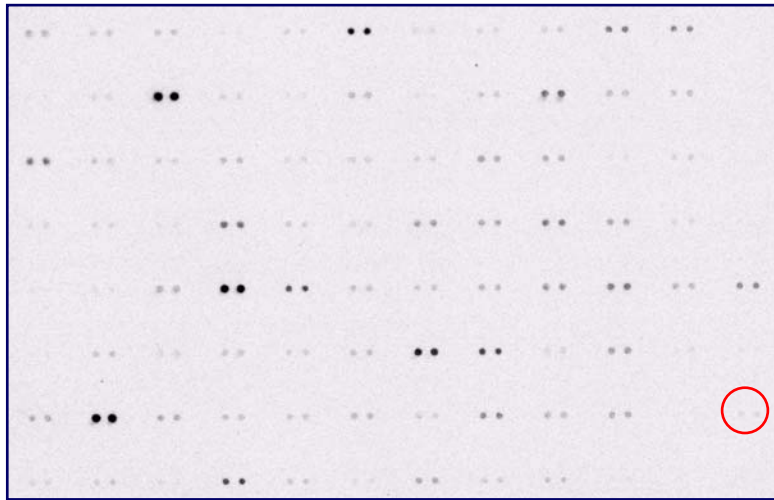
A. H<sub>2</sub>O 1H



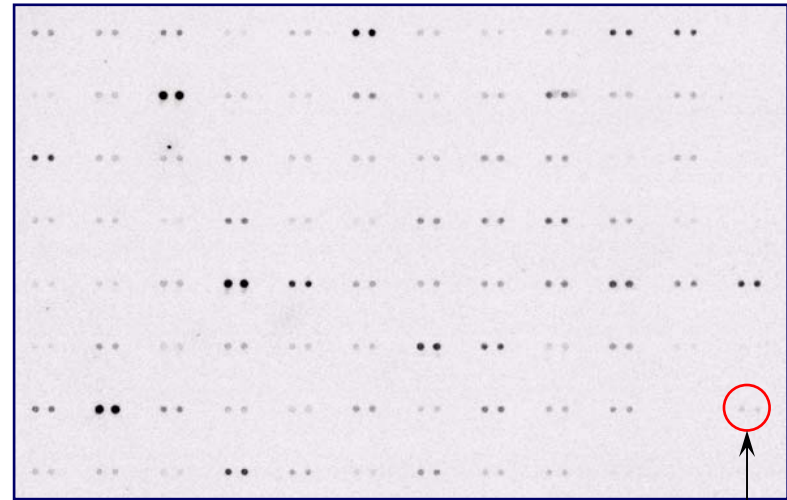
B. AE 1H



C. H<sub>2</sub>O 7J



D. AE 7J



Témoin positif Apt: gène  
constitutif chez Arabidopsis

**Figure 43. Révélation de la membrane macroarray au PhosphorImager.**

Les plantes sont cultivées en hydroponie pendant 35 jours sur une solution nutritive contenant 1 mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Les rosettes des plantes sont alors pulvérisées avec un extrait d'algue (AE) ou de l'eau. Les plantes sont récoltées une heure (1H) et sept jours (7J) après le spray. Les ARNs totaux sont extraits de la partie aérienne des plantes, reverse transcrits et marqués au <sup>33</sup>P, puis hybridés sur la membrane pendant une nuit. Une paire de points représente un gène, chaque gène étant spotté en doublon.

matrice pour synthétiser les ADNc marqués au  $\alpha$ -dCTP33 sont importantes (50  $\mu$ g) et nécessitent 50  $\mu$ Ci de radioélément. Aussi ces expériences demandent-elles beaucoup de matériel et nous avons été contraints de travailler uniquement sur du matériel foliaire. Le protocole suivi a été le suivant. Tout d'abord les ARNs issus de la partie feuillée ont été extraits soit au phénol chaud, soit au trizol, ce qui nous permettait d'avoir un bon rendement d'extraction avec des ARNs de qualité. Les sondes ont été préparées par reverse transcription, en présence d'un  $\alpha$ - $^{33}$ P dCTP et de 50  $\mu$ g d'ARNs totaux. L'incorporation des radionucléotides a été vérifiée sur un compteur à radioactivité (Wallac, type 1410, Perkin-Elmer). Suite à la préhybridation des membranes (4 h), celles-ci ont été hybridées avec la sonde une nuit à 42°C dans un tampon Church (Church & Gilbert, 1984). Puis les membranes sont lavées comme il a déjà été décrit par Divol et collaborateurs (2005). Les filtres ont été exposés sur écran au minimum 16 h et les signaux radioactifs de chaque hybridation sont lus et retranscrits en image par un PhosphorImager FLA 5000 (Fuji). Les intensités des signaux d'hybridation ont été quantifiées en utilisant le logiciel Multi Gauge V2.2 (Fuji). Une grille prédéfinie de 96 spots permet le calcul des intensités de chaque spot par rapport au témoin positif, ainsi que la comparaison de ces intensités entre deux membranes.

### I.E. Les résultats.

Devant l'extrême variabilité des résultats d'hybridation, nous ne développerons pas cette partie. Toutefois la Figure 43 illustre le type de résultats que l'on a pu obtenir avec la membrane macroarray. Comme nous le voyons sur cette figure, l'exploitation des filtres n'a pas été limitée ni par la qualité, ni par la reproductibilité du dépôt. Les principales difficultés auxquelles nous avons été confrontées ont plutôt concerné la normalisation de nos données d'hybridation, étape clef de l'analyse d'image. En effet pour pouvoir comparer les résultats d'hybridation entre eux, il faut s'affranchir des différences de dépôt entre les membranes, mais également des différences de marquage des diverses sondes complexes. Le signal d'hybridation n'est pas strictement quantitatif puisque les quantités d'ADN déposées n'ont pas été complètement homogénéisées (concentration moyenne de 100 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>). Or, quantité d'ADN déposée et signal d'hybridation ne sont pas toujours reliés linéairement (Desprez et al., 1998). C'est le cas lorsque de faibles quantités d'ADN sont déposées (limite de sensibilité de détection), ou lorsque ces quantités sont trop importantes (limite de saturation du signal). Ainsi est-il impossible de rapporter le signal d'hybridation à la quantité déposée pour la





normalisation des signaux. De plus le logiciel d'analyse d'image Multi Gauge V2.2 (Fuji) n'était pas un outil assez puissant pour la normalisation de nos images. Enfin une analyse statistique de variance aurait été nécessaire afin de déterminer les gènes dont la dérégulation était significative.

Nous avons donc choisi d'abandonner ces analyses de transcriptome à échelle réduite, pour passer à l'analyse complète du génome d'*Arabidopsis* grâce à la puce microarray CATMA. Ces analyses du transcriptome d'*Arabidopsis* en réponse à une pulvérisation foliaire d'un extrait d'algues brunes riche en auxines, sont décrites dans l'Article 3 ci-après.

## II. Article 3 - Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in response to an auxin-rich brown algae extract -

Cet article décrit la première étude (à notre connaissance) du transcriptome d'*Arabidopsis* en réponse à la pulvérisation foliaire d'un extrait d'algues brunes riche en auxines. Nous avons ainsi identifié toute une batterie de gènes impliqués dans la transduction de différents signaux hormonaux au cœur de la plante, ainsi que dans la mise en place des mécanismes de défense chez la plante.





**Tableau 6. Liste des gènes différentiellement exprimés dans les parties aériennes d'Arabidopsis une heure et sept jours après pulvérisation foliaire de l'extrait d'algue.**

Sont indiqués: les numéros CATMA et AGI de chaque gène. La fonction assignée à chaque gène a été désignée selon le "TIGR Arabidopsis gene index" (Release 5, January 2004). Un ratio positif indique que le gène est sur-exprimé en réponse à l'extrait d'algue (cases rouges); un ratio négatif indique que le gène est sous-exprimé en réponse à l'extrait d'algue (cases vertes). Les P-values ont été corrigées selon Bonferroni. Les gènes sont considérés comme différentiellement exprimé pour une P-value < 0,05.

CATMA Number	At Number	Putative Gene ID	FEUILLE 1 heure		FEUILLE 7 jours	
			log <sub>2</sub> ratio1	P-Value1	log <sub>2</sub> ratio2	P-Value2
CATMA1A18400	AT1G19380	expressed protein	1,06	2,46E-7	-1,27	2,72E-9
CATMA1A26550	AT1G28370	ERF domain protein 11 (ERF11)	0,75	3,68E-2	-1,18	1,65E-7
CATMA2A21020	AT2G22500	mitochondrial substrate carrier family protein	0,76	3,29E-2	-1,48	0,00E+0
CATMA2A24855	AT2G26530	expressed protein	1,01	2,89E-6	-0,88	6,99E-3
CATMA3A01430	AT3G02480	ABA-responsive protein-related	-0,75	4,19E-2	-1,26	5,39E-9
CATMA3A50440	AT3G57450	expressed protein	0,88	4,44E-4	-0,86	1,39E-2
CATMA4A01260	AT4G01080	expressed protein	1,33	0,00E+0	0,95	6,99E-4
CATMA4A41393	AT4G39980	2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase 1 / 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase 1 / DAHP synthetase 1 (DHS1)	1,02	1,35E-6	1,00	1,13E-4
CATMA5A02320	AT5G03210	expressed protein	1,43	0,00E+0	-1,25	5,99E-9
CATMA5A15740	AT5G17460	expressed protein	0,81	4,64E-3	-0,90	3,38E-3
CATMA5A17020	AT5G18670	beta-amylase, putative (BMY3) / 1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase, putative	-1,39	0,00E+0	-1,56	0,00E+0
CATMA5A23890	AT5G26220	ChaC-like family protein	0,84	1,87E-3	-0,85	1,79E-2
CATMA5A44770	AT5G48850	male sterility MS5 family protein	1,05	4,12E-7	-1,33	1,91E-10

**Tableau 7. Liste des gènes différentiellement exprimés dans les racines d'Arabidopsis une heure et sept jours après pulvérisation foliaire de l'extrait d'algue.**

Sont indiqués: les numéros CATMA et AGI de chaque gène. La fonction assignée à chaque gène a été désignée selon le "TIGR Arabidopsis gene index" (Release 5, January 2004). Un ratio positif indique que le gène est sur-exprimé en réponse à l'extrait d'algue (cases rouges); un ratio négatif indique que le gène est sous-exprimé en réponse à l'extrait d'algue (cases vertes). Les P-values ont été corrigées selon Bonferroni. Les gènes sont considérés comme différentiellement exprimé pour une P-value < 0,05.

CATMA Number	At Number	Putative Gene ID	RACINE 1 heure		RACINE 7 jours	
			log <sub>2</sub> ratio1	P-Value1	log <sub>2</sub> ratio2	P-Value2
CATMA1A06190	AT1G07135	glycine-rich protein	0,84	3,59E-4	-2,09	0,00E+0
CATMA1A17310	AT1G18300	Mut/nudix family protein	0,77	6,44E-3	-2,43	0,00E+0
CATMA1A25965	AT1G27730	zinc finger (C2H2 type) family protein (ZAT10) / salt-tolerance zinc finger protein (STZ)	1,02	1,76E-7	-2,17	0,00E+0
CATMA1A26690	AT1G28480	glutaredoxin family protein	0,80	1,58E-3	-1,32	1,92E-4
CATMA1A31210	AT1G32920	expressed protein	0,76	6,82E-3	-2,07	0,00E+0
CATMA1A33350	AT1G35210	expressed protein	0,82	8,91E-4	-2,06	0,00E+0
CATMA1A70060	AT1G80840	WRKY family transcription factor	0,71	4,40E-2	-1,42	1,36E-3
CATMA2A21360	AT2G22880	VQ motif-containing protein	0,90	3,00E-5	-1,13	2,00E-2
CATMA2A24855	AT2G26530	expressed protein	1,19	2,80E-11	-2,17	0,00E+0
CATMA2A38220	AT2G40000	expressed protein	0,93	1,11E-5	-2,83	0,00E+0
CATMA2A43300	AT2G44840	ethylene-responsive element-binding protein, putative	1,08	1,07E-8	-1,78	1,80E-10
CATMA3A08930	AT3G10040	expressed protein	1,08	8,31E-9	-2,20	0,00E+0
CATMA3A09980	AT3G10930	expressed protein	1,03	1,16E-7	-2,15	0,00E+0
CATMA3A22775	AT3G22840	chlorophyll A-B binding family protein / early light-induced protein (ELIP)	-0,80	3,24E-2	1,09	4,82E-2
CATMA3A23245	AT3G23250	myb family transcription factor (MYB15)	1,58	0,00E+0	-2,56	0,00E+0
CATMA3A43940	AT3G50930	AAA-type ATPase family protein	1,09	4,84E-9	-1,58	1,01E-7
CATMA3A54340	AT3G61190	BON1-associated protein 1 (BAP1)	0,90	3,07E-5	-2,31	0,00E+0
CATMA4A13560	AT4E13260	eugene prediction	0,77	6,24E-3	-1,80	8,43E-11
CATMA4A29280	AT4G27652	expressed protein	1,14	4,71E-10	-1,80	8,43E-11
CATMA4A38060	AT4G36500	expressed protein	0,85	3,28E-4	-1,30	2,76E-4
CATMA5A39860	AT5G44110	ABC transporter family protein	-1,03	9,04E-8	1,12	2,57E-2
CATMA5A43205	AT5G47220	ethylene-responsive element-binding factor 2 (ERF2)	0,71	4,33E-2	-1,48	2,49E-6
CATMA5A44770	AT5G48850	male sterility MS5 family protein	-1,41	0,00E+0	1,09	4,08E-2
CATMA5A47120	AT5G51190	AP2 domain-containing transcription factor, putative	1,08	1,09E-8	-2,25	0,00E+0
CATMA5A50340	AT5G54490	calcium-binding EF-hand protein, putative	0,79	3,00E-3	-1,43	9,35E-4
CATMA5A57200	AT5G61600	ethylene-responsive element-binding family protein	0,96	2,64E-6	-2,68	0,00E+0

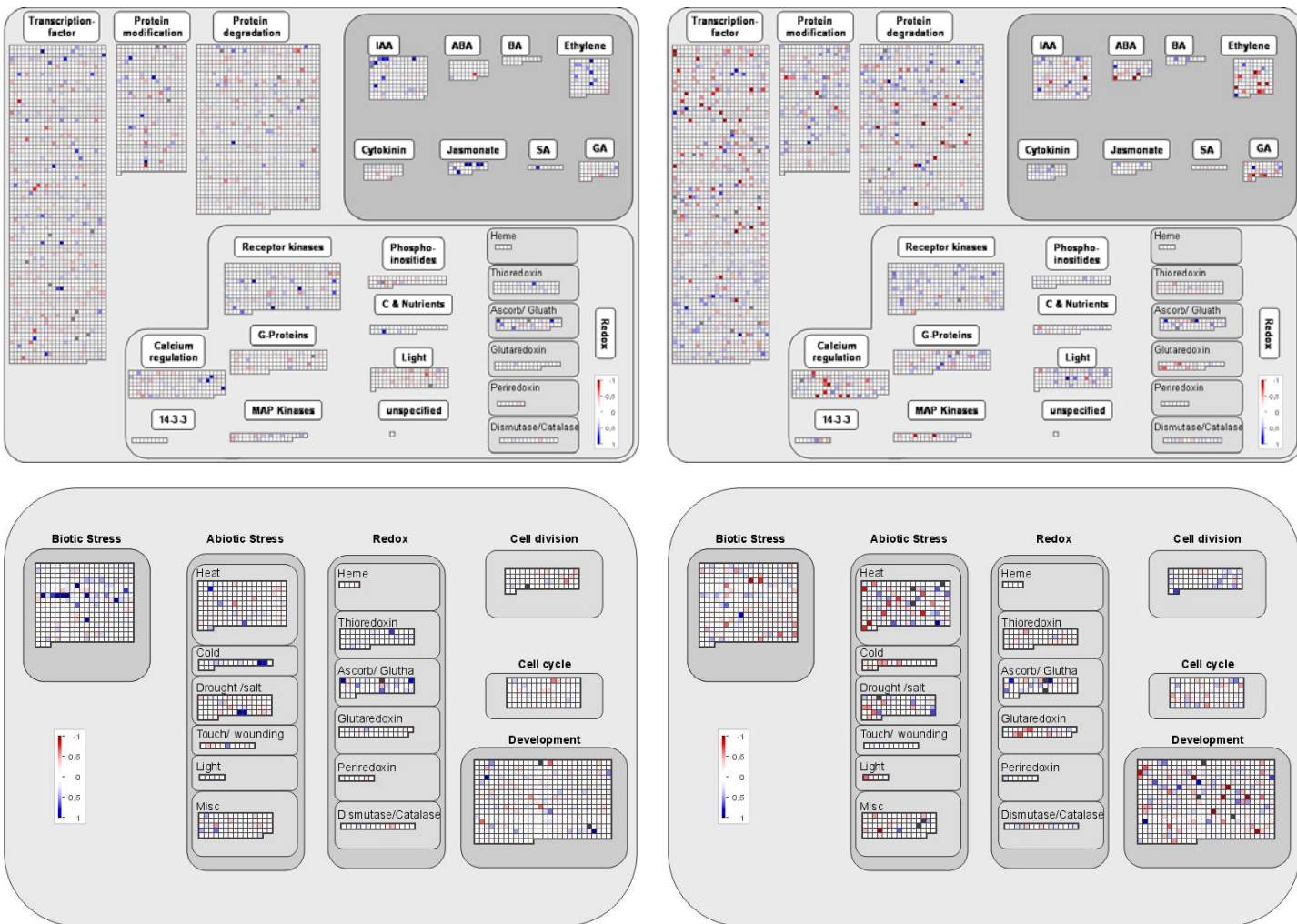
### III. Résultats complémentaires à l'analyse génomique globale en réponse à l'application foliaire de l'extrait d'algues chez *Arabidopsis*.

Dans l'Article 3, nous avons établi la liste des gènes différentiellement exprimés à la fois dans les racines et dans la partie feuillée, une heure et sept jours après avoir pulvérisé les rosettes d'*Arabidopsis* avec un extrait d'algue riche en auxines (AE) concentré à 1%. Nous avons aussi cherché à identifier les gènes dont la transcription est modulée par l'apport de AE aux temps 1 heure et 7 jours, et ceci dans chacun des deux organes de la plante, racines ou feuilles. Ces gènes sont listés dans les Tableaux 6 et 7. Treize et 26 gènes sont différentiellement exprimés respectivement dans les parties aérienne et racinaire. Excepté 3 gènes foliaires qui répondent de la même façon, à la fois aux points 1 heure et 7 jours (Tableau 6), les gènes induits à 1 heure sont réprimés à 7 jours et inversement, quelque soit l'organe végétal considéré (Tableaux 6 et 7). Parmi ces 3 gènes, 2 sont induits une heure et 7 jours après le traitement algal. L'un code pour une protéine inconnue (AT4G01080), le gène *DHS1* code pour une 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase, une enzyme qui catalyse la première réaction de la biosynthèse des acides aminés aromatiques (Keith et al., 1991). Chez les plantes, les acides aminés aromatiques sont les précurseurs de métabolites secondaires variés, parmi lesquels les lignines, les anthocyanes, les auxines, ou les phytoalexines (Keith et al., 1991). Ces composés interviennent dans de nombreux processus comme le contrôle de la croissance (auxines), le maintien de la plante et le contrôle des flux d'eau (lignines), ou encore la résistance aux attaques extérieures (phytoalexines). Le gène *DHS1* est induit en réponse à une blessure physique, à l'acide jasmonique (McConn et al., 1997), ou à une attaque pathogène (Keith et al., 1991). Le profil d'expression du gène *DHS1* révélé par notre analyse transcriptome est ainsi en accord avec l'orientation de la réponse végétale à l'AE vers les processus de défense que nous avons mise en évidence dans l'Article 3. Nous retrouvons aussi dans ces Tableaux 6 et 7, différents facteurs de réponse à l'éthylène (ERF) (Article 3).

La représentation visuelle de nos données de transcriptome à l'aide du logiciel MAPMAN nous amène aux mêmes conclusions (Figures 44 et 45): de nombreux gènes liés aux processus de signalisation sont activés en réponse à la pulvérisation foliaire de l'extrait d'algue. La réponse rapide de la plante (1 heure) fait intervenir l'activation de nombreux gènes liés à la signalisation par les hormones (auxine, éthylène, acide jasmonique), ainsi qu'au stress (Figures 44A et 45A). Celle-ci disparaît à 7 jours, et les voies de signalisation hormonale et de

**A. Profil d'expression 1 heure après la pulvérisation de l'extrait d'algue.**

**B. Profil d'expression 7 jours après la pulvérisation de l'extrait d'algue.**



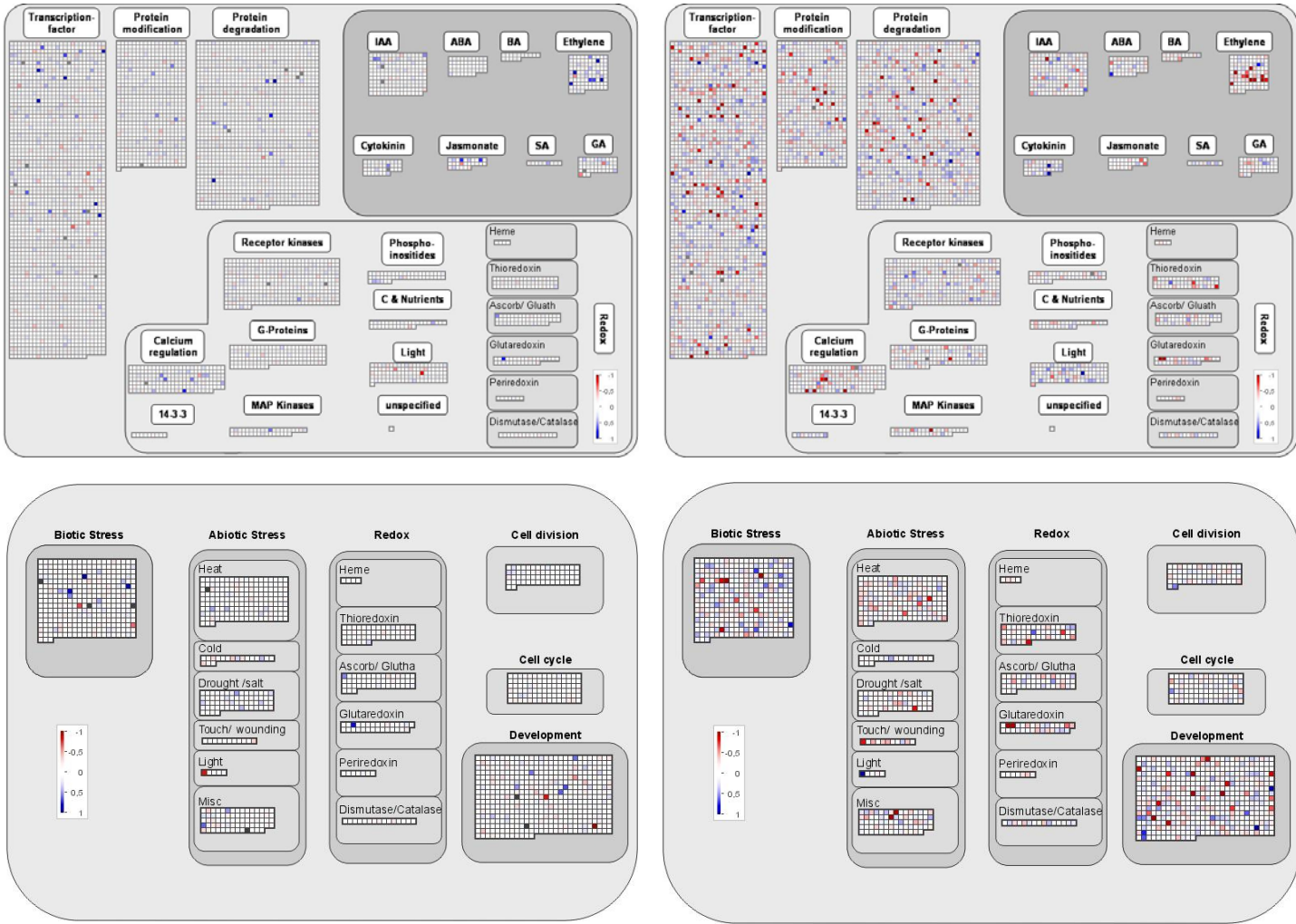
**Figure 44. Vue d'ensemble de la régulation par l'extrait d'algues des gènes liés aux processus de signalisation dans la feuille.**

Les ARNs ont été extraits sur des rosettes d'Arabidopsis de 35 et 42 jours. Les plantes sont cultivées en hydroponie pendant 35 jours sur une solution nutritive contenant 1 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . L'extrait d'algues (AE) a alors été pulvérisé sur les feuilles à une concentration de 1%. Une partie des plantes est récoltée 1 heure après le traitement algal (A., diagrammes de gauche), l'autre 7 jours après (B., diagrammes de droite). Un carré représente un gène. Le carré est bleu si le gène est induit, et rouge s'il est réprimé en réponse à l'AE. Classification MAPMAN (Thimm et al., 2004); P-value<0,05.

réponse au stress sont plutôt réprimées, comme en témoigne la prépondérance de la couleur rouge sur les Figures 44B et 45B. Notre comparaison entre une plante pulvérisée avec l'extrait d'algue et avec de l'eau, nous permet de dire que cet arsenal de réactions de défense mis en place par la plante en réponse à la pulvérisation de l'extrait d'algues est spécifique à l'extrait d'algue lui-même, et n'est pas dû à un stress inhérent à la technique de pulvérisation.

**A. Profil d'expression 1 heure après la pulvérisation de l'extrait d'algue.**

**B. Profil d'expression 7 jours après la pulvérisation de l'extrait d'algue.**



**Figure 45. Vue d'ensemble de la régulation par l'extrait d'algues des gènes liés aux processus de signalisation dans la racine.**

Les ARNs ont été extraits sur des racines d'Arabidopsis de 35 et 42 jours. Les plantes sont cultivées en hydroponie pendant 35 jours sur une solution nutritive contenant 1 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . L'extrait d'algues (AE) a alors été pulvérisé sur les feuilles à une concentration de 1%. Une partie des plantes est récoltée 1 heure après le traitement algal (A., diagrammes de gauche), l'autre 7 jours après (B., diagrammes de droite). Un carré représente un gène. Le carré est bleu si le gène est induit, et rouge s'il est réprimé en réponse à l'AE. Classification MAPMAN (Thimm et al., 2004); P-value<0,05.



# CONCLUSION GENERALE

## **Etude de l'effet d'un extrait d'algue riche en auxine chez Arabidopsis : aspects physiologiques et moléculaires.**

Notre travail s'est attaché à mieux comprendre les mécanismes mis en jeu par Arabidopsis en réponse à la pulvérisation foliaire d'extraits d'algues marines. Nous avons tout d'abord étudié les réponses de la plante en terme de développement, mais aussi les réponses métaboliques et en particulier celles liées à l'azote. Nous avons alors axé notre travail sur les effets de la fertilisation foliaire avec un extrait d'algue particulièrement riche en auxine (AE). Pour cela nous avons entrepris la caractérisation des réponses de la plante au niveau moléculaire par une approche globale du transcriptome d'Arabidopsis. Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence une réponse rapide de la plante à l'application de l'AE, orientée vers les mécanismes de défense et la signalisation hormonale.

Nous avons testé les effets de la pulvérisation foliaire, ainsi que d'un apport direct dans la solution de culture de trois extraits d'algues, mais aucun phénotype particulier n'a été observé chez les plantes traitées par rapport aux plantes non traitées. De même les mesures des différents paramètres azotés définissant le statut azoté de la plante n'ont pas révélé de différences. Devant ces absences de réponses physiologiques, il nous fallait une méthode pour accéder aux réseaux de régulation les plus fins, au cœur de la cellule végétale. L'analyse de l'expression des gènes en réponse à la pulvérisation de l'AE à l'aide des puces à ADN nous a semblé l'approche la plus appropriée. Cette approche systématique nous a ainsi permis de n'avoir aucun a priori sur le type de résultats obtenus, et d'ouvrir au maximum les champs d'investigation sur les applications des substances marines. Notre analyse du transcriptome d'Arabidopsis nous a permis d'identifier les gènes cibles de l'extrait d'algue au cœur de la cellule végétale. Les auxines apportées par l'extrait d'algue sont vraisemblablement impliquées dans les mécanismes de défense et d'adaptation mobilisés par la plante. Cependant



d'autres phytohormones algales semblent aussi participer à ces effets. Reste désormais à poursuivre les recherches afin de, non seulement, mieux comprendre le mode d'action des auxines, mais aussi identifier les autres molécules algales biologiquement actives.



# CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

## Urée, substances marines, azote & agriculture.

Nous l'avons déjà évoqué: l'urée est une source d'azote peu exploitée par les agriculteurs français. Un apport d'urée sur les cultures est effectivement moins efficace que la fertilisation plus traditionnelle avec du nitrate et de l'ammonium. Cependant nous pouvons espérer que ce travail amène à reconsidérer l'urée comme une source d'azote attractive, et en particulier pour une utilisation combinée avec l'ammonium nitrate. En effet, nous avons montré que dans ce cas, la croissance des plantes était comparable avec celle des plantes ayant reçu un apport d'ammonium nitrate. En outre la présence d'urée permet une réduction de la teneur en nitrate dans la plante. Notre analyse transcriptomique a aussi mis en évidence des adaptations du métabolisme végétal intéressantes, et en particulier concernant le métabolisme des acides aminés, et donc la qualité nutritive de la plante. Ainsi, dans un souci d'une agriculture durable, moins onéreuse et respectueuse de l'environnement, l'urée pourrait avoir toute sa place.

Les algues sont une autre ressource naturelle de phyto-nutriments, également peu exploitée en agriculture, notamment faute de connaissances sur leurs modalités d'action sur la plante. L'étude de l'efficacité de ces substances marines sur les cultures bénéficie aujourd'hui des dernières avancées technologiques comme la génomique. Les potentialités des nouvelles technologies d'étude des gènes permettent d'espérer l'identification de nouvelles cibles au cœur du métabolisme du végétal. C'est dans cet objectif que nous avons entrepris une analyse globale du transcriptome d'*Arabidopsis* en réponse à la pulvérisation d'un extrait d'algues brunes. Le travail doit se poursuivre non seulement afin de mieux comprendre le réseau de signalisation mis en place par la plante en réponse à l'extrait d'algue étudié, mais aussi pour identifier les autres molécules biologiquement actives contenues dans l'extrait marin. Nous envisageons aussi de comparer les réponses de la plante aux substances marines avec celles obtenues avec des hormones synthétiques (auxine, cytokinine, ...). Nous pourrions ainsi identifier les molécules responsables des effets des substances marines.



A l'issue de cette évaluation biologique, les molécules les plus prometteuses, candidates aux nouvelles générations de produits destinés à l'amélioration de la nutrition et de la santé végétales, pourront quitter le laboratoire pour tester leur efficacité au champ, sur les grandes cultures (comme les céréales, les protéagineux), la vigne, les cultures fruitières, les cultures fourragères, maraîchères et horticoles, et les cultures tropicales. Ces phyto-nutriments naturels, fort de leur expérience du monde marin, pourront renforcer la performance des végétaux terrestres et répondre ainsi aux attentes en matière de productivité, de qualité et de respect de l'environnement.

Enfin, lorsque nos connaissances sur l'utilisation de l'urée par les plantes ainsi que sur les modalités d'action des substances marines seront mieux établies, nous pourrons envisager l'étude des interactions entre les différentes sources d'azote (urée, nitrate et ammonium) et les phytohormones marines. Les réponses de la plante soumise à une nutrition sous forme urée, nitrate ou ammonium seront analysées suite à l'ajout de différentes substances marines, soit au niveau de la feuille, soit au niveau de la racine.





- Abe H, Uchiyama M, Sato R** (1972) Isolation and identification of native auxins in marine algae. *Agric Biol Chem* **36**: 2259-2260
- Abe H, Uchiyama M, Sato R** (1974) Isolation of phenyl acetic acid and its p-hydroxy derivative as auxin-like substances from *Undaria pinnatifida*. *Agr Biol Chem* **38**: 897-898
- Abetz P** (1980) Seaweed extracts: have they a place in Australian agriculture or horticulture? *J Aust Inst Agric Sci* **46**: 23-29
- Aitken JB, Sern TL** (1965) Seaweed products as a fertilizer and soil conditioner for horticultural crops. *Bot Mar* **8**: 144-148
- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI** (2006) Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann Bot* **97**(5): 883-893
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**(17): 3389-33402
- Aubert S, Bligny R, Douce R, Gout E, Ratcliffe RG, Roberts JK** (2001) Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by <sup>13</sup>C and <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance. *J Exp Bot* **52**(354): 37-45
- Augier H** (1976a) Les hormones des algues. Etat actuel des connaissances I. Recherche et tentative d'identification des auxines. *Bot Mar* **19**: 127-143
- Augier H** (1976b) Les hormones des algues. Etat actuel des connaissances II. Recherche et tentatives d'identification des gibbérellines, des cytokinines et diverses autres substances de nature hormonale. *Bot Mar* **19**: 245-254
- Aziz A, Poinssot B, Daire X, Adrian M, Bezier A, Lambert B, Joubert JM, Pugin A** (2003) Laminarin elicits defence responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol. Plant Microbe In* **16**: 1118-1128
- Bacanamwo M, Witte CP, Lubbers MW, Polacco JC** (2002) Activation of the urease of *Schizosaccharomyces pombe* by the UreF accessory protein from soybean. *Mol Genet Genomics* **268**: 525-534
- Beckett RP, van Staden J** (1989) The effect of seaweed concentrate on the growth and yield of potassium stressed wheat. *Plant Soil* **116**: 29-36
- Beckett RP, van Staden J** (1990a) The effect of seaweed concentrate on the yield of nutrient stressed wheat. *Bot Mar* **33**: 147-152
- Beckett RP, van Staden J** (1990b) The effect of seaweed concentrate on the uptake of foliar applied Cu, Mn and Zn by tomato seedlings. *S Afric J Bot* **56**: 389-392
- Benini S, Rypniewsky WR, Wilson KS, CiurliS, Mangani S** (2001) Structure-based rationalization of urease inhibition by phosphate: novel insights into the enzyme mechanism. *J Biol Inorg Chem* **6**: 778-790
- Bernart M, Gerwick WH** (1990) 3(hydroxyacetyl)indole, a plant growth regulator from the Oregon red alga *Prionitis lanceolata*. *Phytochemistry* **29**: 3697-3698
- Bernhard WR., Matile P** (1994) Differential expression of glutamine synthetase genes during the senescence of *Arabidopsis thaliana* rosette leaves. *Plant science* **98**(1): 7-14
- Beusichem ML van, Neeteson JJ** (1982) Urea nutrition of young maize and sugar-beet plants with emphasis on ionic balance and vascular transport of nitrogenous compounds. *Neth J Agric Sci* **30**: 317-330.
- Bhosle NB, Untawala AG, Dhargalkar VK** (1975) Effect of seaweed extract on the growth of *Phaseolus vulgaris* L.. *Indian J. Mar. Sci.* **4**: 208-210
- Bhalerao RP, Eklöf J, Ljung K, Marchant A, Bennett M, Sandberg G** (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* **29**: 326–332
- Bloom AJ, Sukrapanna SS** (1990) Effects of exposure to ammonium and transplant shock upon the induction of nitrate absorption. *Plant Physiol* **94**: 85-90



- Blunden G** (1972) The effect of aqueous seaweed extract as a fertilizer additive. In *Proc. 7<sup>th</sup> International Seaweed Symposium*. University of Tokyo Press, 584-589
- Blunden G** (1977) Cytokinin activity of seaweed extracts. *NATO Conf. Ser. 4*: 337-344
- Blunden G, Cripps AL, Gordon SM, Mason TG, Turner CH** (1986) The characterisation and quantitative estimation of betaines in commercial seaweed extracts. *Bot Mar* **29**: 155-160
- Blunden G, Gordon SM, Smith BE, Fletcher RL** (1985) Quaternary ammonium compounds in species of the fucaceae (Phaeophyceae) from Britain. *Br Phycol J* **20**: 105-108
- Blunden G, Jerkins T, Liu YW** (1997) Enhanced leaf chlorophyll levels in plants treated with seaweed extract. *J Appl Phycol* **8**: 535-543
- Blunden G, Rogers DJ, Barwell CJ** (1984) Biologically active compounds from the British marine algae. In *Natural Products and Drug Development Alfred Benzon Symposium* **20**: 179-190. Edited by Krogsgaard-Larsen CP, Brogger S, Christensen S, Kofod H, Munksgaard, Copenhagen
- Blunden G, Wildgoose PB** (1977) The effects of aqueous seaweed extract and kinetin on potato yield. *J Sci Food Agri* **28**: 121-125
- Blunden G, Wildgoose PB, Nicholson FE** (1974) The effects of aqueous seaweed extract on sugar beet. In *Proc. 8<sup>th</sup> International Seaweed Symposium*, Bangor, North Wales, 667-672
- Blunden G, Wildgoose PB, Nicholson FE** (1979) The effects of aqueous seaweed extract on sugar beet. *Bot Mar* **22**: 539-541
- Booth CO** (1964) Seaweed has possibilities apart from its fertiliser use. *The Grower* **62**: 442-443
- Booth E** (1966) Some properties of seaweed manures. In *Proc. 5<sup>th</sup> International Seaweed Symposium*. Pergamon Press, London, 349-357
- Boyer GL, Dougherty SS** (1988) Identification of abscisic acid in the seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* **27**: 1521-1522
- Bradley DP, Morgan MA, O'Toole P** (1989) Uptake and apparent utilization of urea and ammonium nitrate in wheat seedlings. *Fert Res* **20**: 41-49
- Bradley PM** (1991) Plant hormones do have a role in controlling growth and development of algae. *J phycol* **27**: 317-321
- Brain KR, Chalopin MC, Turner TD, Blunden G, Wildgoose PB** (1973) Cytokinin activity of commercial aqueous seaweed extract. *Plant Sci Lett* **1**: 241-245
- Bremner JM** (1995) Recent research on problems in the use of urea as a nitrogen fertilizer. *Fert Res* **42**: 321-329
- Bremner JM, Kromeier MJ** (1989) Evidence that the adverse effect of urea fertilizer on seed germination in soil is due to ammonia formed through hydrolysis of urea by soil urease. *Proc Natl Acad Sci* **86**: 8185-8188
- Button EF, Noyes CF** (1964) Effect of a seaweed extract upon emergence and survival of seedlings of creeping red fescue. *Agron J* **56**: 444-445
- Canivenc G** (2005) Implication des gènes PTR d'*Arabidopsis thaliana* dans le transport de nitrate. Thèse, Université de Montpellier II
- Cardinale F, Jonak C, Lioterink W, Niehaus K, Boller T, Hirt H** (2000) Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *J Biol Chem* **275**: 36734-36740
- Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ** (2003) Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci* **8**(4): 165-171
- Chaillou S, Vessey JK, Morot-Gaudry JF, Raper CD, Henry LT, Boutin JP** (1991) Expression of characteristics of ammonium nutrition as affected by pH of the root medium. *J Exp Bot* **42**: 189-196



- Chang Z, Kchar J, Hausinger RP** (2004) Chemical cross-linking and mass spectrometric identification of sites of interaction for UreD, UreF and urease. *J Biol Chem* **279**(15): 15305-15314
- Chen YG, Ching TM** (1988) Induction of barley leaf urease. *Plant Physiol* **86**: 941-945
- Cheng CL, Acedo GN, Dewdney J, Goodman HM, Conkling MA** (1991) Differential expression of two *Arabidopsis* nitrate reductase genes. *Plant Physiol* **96**: 275-279
- Cheng CL, Dewdney J, Nam HG, den Boer BG, Goodman HM** (1988) A new locus (NIA1) in *Arabidopsis thaliana* encoding nitrate reductase. *EMBO J* **7**: 3309-3314
- Chiu CC, Lin CS, Hsia AP, Su RC, Lin HL, Tsay YF** (2004) Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1:4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. *Plant Cell Physiol* **45**(9): 1139-1148
- Church GM, Gilbert W** (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci* **81**(7): 1991-1995
- Cluzet S, Torregrosa C, Jacquet C, Lafitte C, Fournier J, Mercier L, Salamagne S, Briand X, Esquerré-Tugayé MT, Dumas B** (2004) Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva spp.* *Plant Cell Environ* **27**: 917-928
- Coïc Y, Lesaint C** (1971) Comment assurer une bonne nutrition en eau et en ions minéraux en horticulture. *Horticulture Française* **8**: 11-14
- Coïc Y, Lesaint C** (1975) La nutrition minérale et en eau des plantes en horticulture avancée. Le Document Technique de la SCPA **23**: 1-22
- Coruzzi GM** (2003) Primary N-assimilation into Amino Acids in *Arabidopsis*. In *The Arabidopsis Book*. Edited by Meyerowitz E, Somerville C, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, **31**(1): 1-17
- Coschigano KT, Melo-Oliveira R, Lim J, Coruzzi GM** (1998) *Arabidopsis* gls mutants and distinct Fd-GOGAT genes. Implications for photorespiration and primary nitrogen assimilation. *Plant Cell* **10**(5): 741-52
- Court MN, Stephen RC, Waid JS** (1964) Toxicity as a cause of the inefficiency of urea as a fertilizer. *J Soil Sci* **15**: 42-48
- Crawford NM, Forde BG** (2002) Molecular and Developmental Biology of Inorganic Nitrogen Nutrition. In *The Arabidopsis Book*. Edited by Meyerowitz E, Somerville C, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0011, 1-25
- Crawford NM, Glass ADM** (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant science* **3**: 389-395
- Crawford NM, Smith M, Bellissimo D, Davis RW** (1988) Sequence and nitrate regulation of the *Arabidopsis thaliana* mRNA encoding nitrate reductase, a metalloflavoprotein with three functional domains. *Proc Natl Acad Sci* **85**: 5006-5010
- Crouch IJ, Smith MT, van Staden J, Lewis MJ, Hoad GV** (1992) Identification of auxins in a commercial seaweed concentrate. *J Plant Physiol* **138**: 590-594
- Crouch IJ, van Staden J** (1991) Evidence for rooting factors in a seaweed concentrate prepared from *Ecklonia maxima*. *J Plant Physiol* **137**: 319-322
- Crouch IJ, van Staden J** (1993) Effect of seaweed concentrate from *Ecklonia maxima* (osbeck) Papenfuss on *Meloidogyne incognita* infection on tomato. *J Appl Phycol* **5**: 37-43
- Crouch IJ, van Staden J** (1993) Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products. *Plant Growth Regul* **13**: 21-29
- Crowford N** (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* **7**: 859-868
- D'Agostino IB, Deruere J, Kieber JJ** (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol* **124**(4): 1706-1717
- Daniel-Vedele F, Filleur S, Caboche M** (1998) Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. *Curr. Opin. Plant Biol* **1**: 235-239



- De Villiers J, Kotze WAG, Joubert M** (1983) Effect of seaweed foliar spray on fruit quality and mineral nutrition. *Decid Fruit Grow* **33**: 97-101
- Dekker J** (1963) Effect of cytokinin on powdery mildew. *Nature* **197**: 1027-1028
- Deléens E, Morot-Gaudry JF, Martin F, Thoreux A & Gojon A** (1997) Méthodologie  $^{15}\text{N}$ . In *Assimilation de l'azote chez les plantes* 265-280. Editions INRA, Mieux comprendre
- Delhon P, Gojon A, Tillard P, Passama L** (1996) Diurnal regulation of  $\text{NO}_3^-$  uptake in soybean plants. 4. Dependence on current photosynthesis and sugar availability to the roots. *J Exp Bot* **47**: 893-900
- Desprez T, Amselem J, Caboche M, Hofte H** (1998) Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. *Plant J* **14**(5): 643-652
- Diaz C, Saliba-Colombani V, Loudet O, Belluomo P, Moreau L, Daniel-Vedele F, Morot-Gaudry JF, Masclaux-Daubresse C** (2006) Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **47**(1):74-83
- Divol F, Vilaine F, Thibivilliers S, Amselem J, Palauqui JC, Kusiak C, Dinant S** (2005) Systemic response to aphid infestation by *Myzus persicae* in the phloem of *Apium graveolens*. *Plant Mol Biol* **57**(4): 517-540
- Dixon NE, Gazzola C, Blakely RL, Zerner B** (1975) Jack-bean urease (E.C. 3.5.1.5.3). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel. *J Am Chem Soc* **97**: 4131-4133
- Dubois F, Terce-Laforgue T, Gonzalez-Moro MB, Estavillo JM, Sangwan R, Gallais A, Hirel B** (2003) Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? *Plant Physiol Biochem* **41**: 565-576
- Durand N, Briand X, Meyer C** (2003) The effect of marine bioactive substances (N PRO) and endogenous cytokinins on nitrate reductase activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plantarum* **119**: 489-493
- Eckert M, Biela A, Siefritz F, Kaldenhoff R** (1999) New aspects of plant aquaporin regulation and specificity. *J Exp Bot* **50**: 1541-1545
- El-Sheekh MM, El-Saied AAF** (2000) Effect of crude seaweed extracts on seed germination, seedling growth and some metabolic processes of *Vicia faba* L.. *Cytobios* **101**: 23-25
- FAO** 2005. FAOSTAT Database Collection (<http://faostat.fao.org/>). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy
- Featonby-Smith BC, van Staden J** (1983) The effect of seaweed concentrate on the growth of tomato plant in nematode-infested soil. *Scientia Horti* **20**: 137-146
- Featonby-Smith BC, van Staden J** (1983) The effect of seaweed concentrate and fertilize on the growth of *Beta vulgaris*. *Z Pflanzenphysiol* **112**: 155-162
- Featonby-Smith BC, van Staden J** (1984) Identification and seasonal variation of endogenous cytokinins in *Ecklonia maxima* (osbeck) Papenf. *Bot Mar* **27**: 527-531
- Featonby-Smith BC, van Staden J** (1987) Effects of seaweed concentrate on grain yield in barley. *South Afric J Bot* **53**: 125-128
- Feldmann J** (1978) Précis de botanique Tome I Végétaux Inférieurs. Edited by Masson, Paris
- Filleur S, Daniel-Vedele F** (1999) Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta* **207**: 461-469
- Forde BG** (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 219-235
- Forde BG** (2002) Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 203-224
- Freyermuth SK, Bacanamwo M, Polacco JC** (2000) The soybean *Eu3* gene encodes a Ni-binding protein necessary for urease activity. *Plant J* **21**(1): 53-60





- Galangau F, Daniel-Vedele F, Moureaux T, Leydecker MT, Caboche M** (1988) Expression of leaf nitrate reductase genes from potato and tobacco in relation to light-dark regimes and nitrate supply. *Plant Physiol* **88**: 383-388
- Galluci E, Micelli C, Lippe C** (1971) Non-electrolyte permeability across thin lipid membranes. *Arch Int Physiol Biochem* **79**: 881-887
- Gansel X, Munos S, Tillard P, Gojon A** (2001) Differential regulation of the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporter genes AtNRT2.1 and AtAmt1.1 in *Arabidopsis*: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. *Plant J* **26**: 143-155
- Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, von Wirén N** (1999) Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* **11**: 937-948
- Gerbeau P, Guclu J, Ripoche P, Maurel C** (1999) Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J* **18**: 577-587
- Gerendás J, Polacco JC, Freyermuth SK, Sattelmacher B** (1999) Significance of nickel for plant growth and metabolism. *J. Plant Nutr. Soil Sci* **162**: 241-256
- Gerendás J, Zhu Z, Sttelmacher B** (1998) Influence of nitrogen and Ni supply on nitrogen metabolism and urease activity in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot* **49**(326): 1545-1554
- Glass ADM, Siddiqi MY** (1995) Nitrogen absorption by plants roots. In *Nitrogen Nutrition In Higher Plants*. Edited by H.S.Srivastava and R.P.Singh., Associated Pub.Co. New Delhi., 21-56
- Glibert PM, Harrison J, Heil C, Seizinger S** (2006) escalating worldwide use of urea – a global change contributing to coastal eutrophication. *Biogeochemistry* **77**: 441-463
- Goldraij A, Beamer LJ, Polacco JC** (2003) Interallelic complementation at the ubiquitous urease coding locus of soybean. *Plant Physiol* **132**: 1801-1810
- Goldraij A, Coello P, Polacco JC** (1998) Nucleotide sequence of a cDNA encoding a soybean seedlings axes arginase (accession n° AF035671)(PGR 98-016). *Plant Physiol* **116**: 867
- Goldraij A, Polacco JC** (1999) Arginase is inoperative in developing soybean embryos. *Plant Physiol* **119**: 299-303
- Goldraij A, Polacco JC** (2000) Arginine degradation by arginase in mitochondria of soybean seedling cotyledons. *Planta* **210**: 652-658
- Gooding MJ, Davies WP** (1992) Foliar urea fertilization of cereals: a review. *Fert Res* **32**: 209-222
- Gould WD, Hagedorn C, McCready GL** (1986) Urea transformations and fertilizer efficiency in soil. *Adv. in Agronomy* **40**: 209-238
- Guo FQ, Wang R, Chen M, Crawford NM** (2001) The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene AtNRT1.1 (CHL1) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. *Plant Cell* **13** 1761-1777
- Guo FQ, Wang R, Crawford NM** (2002) The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene AtNRT1.1 (CHL1) is regulated by auxin in both shoots and roots. *J Exp Bot* **53**(370): 835-844
- Hart LC** (1982) Auxins as plant growth regulators in the marine alga *Pelagophycusporra* (Leman) *Setchell* (Phaeophyta Caminales). PhD Thesis, University of Southern California, Los Angeles
- Hausinger RP, Colpas GJ, Soriano A** (2001) Urease; a paradigm for protein-assisted metallocenter assembly. *ASM News* **67**(2): 78-84
- Hine JC, Spent JI** (1988) Growth of *Phaseolus vulgaris* on various nitrogen sources: the importance of urease. *J Exp Bot* **39**: 1505-1512
- Hinsvark ON, Wittwer SH, Tukey HB** (1953) The Metabolism of Foliar-Applied Urea. I. Relative Rates of C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> Production by Certain Vegetable Plants Treated with Labeled Urea. *Plant Physiol* **28**(1): 70-76



- Hirel B, Lea PJ** (2001) Ammonia assimilation. In *Plant Nitrogen*. Edited by Lea PJ, Morot-Gaudry JF: Springer, 79-99
- Hirsch RW, Hartung W, Gimmler H** (1989) Abscisic acid content of Algae under stress. *Bot Acta* **162**: 326-334
- Hoff T, Truong HN, Caboche M** (1994) The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. *Plant Cell Environ* **17**: 489-506
- Huang NC, Chiang CS, Crawford NM, Tsay YF** (1996) *CHL1* encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis* and shows cell type-specific expression in roots. *Plant Cell* **8**: 2183-2191
- Huang NC, Liu KH, Lo HJ, Tsay YF** (1999) Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell* **11**: 1381-1392
- Jacobs WP, Falkenstein K, Hamilton RH** (1985) Nature and amount of auxin in algae: IAA from extracts of *Culerpa paspaloides* (Siphonales). *Pl Physiol* **78**: 844-848
- Jolivet E, Langlais-Jeannin I, Morot-Gaudry JF** (1991) Les extraits d'algues marines: propriétés phytoactives et intérêt agronomique. *Année Biologique*: 109-126
- Joubert JM, Méry A, Héry P** (2002) Comment l'extrait d'algue "GA7" stimule la nutrition azotée des blés. *Phytoma* **552**: 20-22
- Joubert JM, Yvin JC, Barchietto T, Serg JM, Plesse B, Klarzynski O, Kopp M, Fritig B, Kloareg B** (1998) A  $\beta$ -1,3 glucan, specific to a marine alga, stimulates plant defense reactions and induces broad range resistance against pathogens. In *The 1998 Brighton Conference: Pests and Diseases*, 441-448
- Keith B, Dong XN, Ausubel FM, Fink GR** (1991) Differential induction of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase genes in *Arabidopsis thaliana* by wounding and pathogenic attack. *Proc Natl Acad Sci* **88**: 8821-8825
- Kingman AR, Moore J** (1982) Isolation, purification and quantitation of several growth regulating substances in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyta). *Bot Mar* **25**: 149-153
- Klarzynsky O, Descamps V, Plesse B, Yvin JC, Kloareg B, Fritig B** (2003) Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus. *Mol. Plant Microbe In* **16**(2): 115-122
- Klarzynsky O, Esnault D, Euzen M, Joubert JM** (2005) Mécanismes d'action de l'extrait d'algue GA7. *Phytoma* **585**: 42-44
- Klarzynsky O, Plesse B, Joubert JM, Yvin JC, Kopp M, Kloareg B, Fritig B** (2000) Linear  $\beta$ -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol* **124**: 1027-1037
- Klein I, Weinbaum SA** (1985) Foliar application of urea to almond and olive: leaf retention and kinetics of uptake. *J Plant Nutr* **8**: 117-129
- Kleinhofs A, Warner RL** (1990) Advances in nitrate assimilation. In *The biochemistry of plants*. Edited by Mifflin BJ, Lea PJ: Academic Press, **16**: 89-120
- Kloareg B, Quatrano RS** (1988) Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* **26**: 259-315
- Krapp A, Truog HN** (2005) Regulation of C/N interaction in model plant species. *Journal of Crop Improvement* **15**(2): 127-173
- Krogmeier MJ, McCarty GW, Bremner JM** (1989) Phytotoxicity of foliar-applied urea. *Proc Natl Acad Sci* **86**: 8189-8191
- Krumpelman PM, Freyermuth SK, Cannon JF, Fink GR, Polacco JC** (1995) Nucleotide sequence of *Arabidopsis thaliana* arginase expressed in yeast (accession n° U15019). *Plant Physiol* **107**: 1479-1480



- Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melooliveira R, Coruzzi GM** (1996) The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **47**: 569-593
- Lam HM, Hsieh MH, Coruzzi G** (1998) Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 345-353
- Lam HM, Peng SS, Coruzzi GM** (1994) Metabolic regulation of the gene encoding glutamine-dependent asparagine synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **106**: 1347-1357
- Lam HM, Wong P, Chan HK, Yam KM, Chen L, Chow CM, Coruzzi GM** (2003) Overexpression of the ASN1 gene enhances nitrogen status in seeds of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **132**(2): 926-35
- Laurent F, Bouthier A, Bonnefoy M** (1998) Pulvérisation foliaire d'azote sur blé. Une technique qui doit encore faire ses preuves. *Perspect Agric* **234**: 17-22
- Le Souder C, Taureau JC** (1997) Engrais azotés. Leur devenir dans le sol. *Perspect Agric* **221**: 64-66
- Le Tutour B** (1990) Antioxydative activities of algal extracts, synergistic effect with vitamin E. *Phytochemistry* **29**: 3759-3765
- Le Tutour B, Benslimane F, Gouleau MP, Gouygou JP, Saadan B, Quemeneur F** (1998) Antioxydant and pro-oxydant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himanthalia elongata*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum*. *J Appl Phycol* **10**: 121-129
- Lee MH, Mulrooney SB, Hausinger RP** (1990) Purification, characterization, and in vivo reconstitution of *Klebsiella aerogenes* urease apoenzyme. *J Bacteriol* **172**(8): 4427-4431
- Lee MH, Pankratz HS, Wang S, Scott RA, Finnegan MG, Johnson MK, Ippolito JA, Christianson DW, Hausinger RP** (1993) Purification and characterization of *Klebsiella aerogenes* UreE protein: a nickel binding protein that functions in urease metallocenter assembly. *Protein Sci* **2**: 1042-1052
- Lee RB, Drew MC** (1989) Rapid, reversible inhibition of nitrate influx in barley by ammonium. *J Exp Bot* **40**: 741-752
- Lejay L, Gansel X, Cerezo M, Tillard P, Müller C, Krapp A, von Wirén N, Daniel-Vedele F, Gojon A** (2003) Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *Plant Cell* **15**: 2218-2232
- Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive F, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A** (1999) Molecular and functional regulation of two NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *Plant J* **18**: 509-519
- Letham DS** (1978) Cytokinins. In *Phytohormones and related Compounds: a comprehensive Treatise I*. Edited by Letham DS, Goodwin PB, Higgins TJ, Elsevier/Holland, Amsterdam, 205-251
- Liu KH, Huang CY, Tsay YF** (1999) CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell* **11**: 865-874
- Liu KH, Tsay YF** (2003) Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J* **22**: 1005-1013.
- Liu LH, Ludewig U, Frommer WB, von Wirén N** (2003a) AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/H<sup>+</sup> symporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 790-800
- Liu LH, Ludewig U, Gassert B, Frommer WB, von Wirén N** (2003b) Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **133**: 1220-1228
- Loqué, D, von Wirén N** (2004) Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *J Exp Bot* **55**: 1293-1305
- Loudet O, Chaillou S, Merigout P, Talbotec J, Daniel-Vedele F** (2003) Quantitative Trait Loci Analysis of Nitrogen Use Efficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **131**: 345-358



- Ludewig U, von Wirén N, Frommer WB** (2002) Uniport of  $\text{NH}_4^+$  by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. *J Biol Chem* **277**: 13548-13555
- Ludewig U, von Wirén N, Rentsch D, Frommer WB** (2001) Rhesus factors and ammonium: a function in efflux? *Genome Biol* **2**: reviews 1010.1-1010-5
- Malamy JE, Ryan KS** (2001) Environmental regulation of lateral root initiation in Arabidopsis. *Plant Physiol* **127**(3):899-909
- Marschner M** (1995) Mineral Nutrition in Higher Plants. 2 ed. London: Academic Press
- Martin-Tanguy J** (2001) Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regul* **34**: 135-148
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Pageau K, Lelandais M, Grandjean O, Kronenberger J, Valadier MH, Feraud M, Jouglet T, Suzuki A** (2006) Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiol* **140**: 444-456
- Matsumoto H, Hasegawa Y, Kobayashi M, Takahashi E** (1968) Inducible formation of urease in *Canavalia ensiformis*. *Physiol. Plantarum* **21**: 872-881
- Matsumoto H, Yasuda K, Kobayashi M, Takahashi E** (1966) The inducible formation of urease in rice plants. *Soil Sci Plant Nutr* **12**: 239-244
- McClure PR, Israel DW** (1979) Transport of Nitrogen in the Xylem of Soybean Plants. *Plant Physiol* **64**: 411-416
- McConn M, Creelman RA, Bell E, Mullet JE, Browse J** (1997) Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* **94**(10): 5473-5477
- Melo-Oliveira R, Oliveira IC, Coruzzi GM** (1996) Arabidopsis mutant analysis and gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. *Proc Natl Acad Sci* **93**(10): 4718-4723
- Menard R, Alban S, de Ruffray P, Jamois F, Franz G, Fritig B, Yvin JC, Kauffmann S** (2004)  $\beta$ -1,3 glucan sulfate, but not  $\beta$ -1,3 glucan, induces the salicylic acid signalling pathway in tobacco and Arabidopsis. *The Plant Cell* **16**: 3020-3032
- Mercier L, Lafitte C, Borderies G, Briand X, Esquerré-Tugayé MT, Fournier J** (2001) The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defense. *New Phytol* **149**: 43-51
- Meyer C, Stitt M** (2001) Nitrate reduction and signalling. In *Plant nitrogen*. Edited by Lea PJ, Morot-Gaudry JF, Berlin, Springer-Verlag, 61-78
- Micallef BJ, Shelp BJ** (1989) Arginine metabolism in developing soybean cotyledons. I. Relationship to nitrogen nutrition. *Plant Physiol* **90**: 624-630
- Miesak BH, Coruzzi GM** (2002) Molecular and physiological analysis of *Arabidopsis* mutants defective in cytosolic or chloroplastic aspartate aminotransferase. *Plant Physiol* **129**: 650-660
- Mifflin BJ, Habash DZ** (2002) The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J Exp Bot* **53**: 979-987
- Miller CO** (1963) Kinetin and kinetin-like compounds. In *Modern Methods of Plant Analysis* **6**: 194-202. Edited by Linskens HF, Tracy MV, Springer-Verlag, Berlin
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T** (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J* **37**(1): 128-38
- Mobley HLT, Hausinger RP** (1989) Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol Reviews* **53**(1): 85-108
- Mobley HLT, Island MD, Hausinger RP** (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Reviews* **59**(3): 451-480





- Mohan VR, Venkataraman K, Murugeswari R, Muthusamy S** (1994) Effect of crude and commercial seaweed extract on seed germination and seedling growth in *Cajanus cajan* L.. *Phykos* **33**: 47-51
- Mok MC** (1994) Cytokinins and plant development: an overview. In *Cytokinins: chemistry, activity and function* 155-166. Edited by Mok DWS, Mok MC, CRC Press, Boca Raton, Florida
- Mooney PA, van Staden J** (1985) Effect of seaweed concentrate on the growth of wheat under conditions of water stress. *South Afric. J Sci* **81**: 632-633
- Mooney PA, van Staden J** (1986) Algae and cytokinins. *J Plant Physiol* **27**: 317-321
- Mourey-Bringuier A** (1986) Recherche des modalités d'action de la préparation algale GA14 sur les plantes supérieures. Thèse de doctorat, UER Rennes I
- Muller B, Tillard P, Touraine B** (1995) Nitrate fluxes in soybean seedling roots and their response to amino acids: An approach using N-15. *Plant Cell Environ* **19**: 1267-1279
- Mulrooney SB, Hausinger RP** (2003) Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol Reviews* **27**: 239-261
- Muñoz A, Piedras P, Aguilar M, Pineda M** (2001) Urea is a product of ureidoglycolate degradation in chickpea. Purification and characterization of the ureidoglycolate urea-lyase. *Plant Physiol* **125**: 828-834
- Muñoz A, Raso MJ, Pineda M, Piedras P** (2006) Degradation of ureidoglycolate in French bean (*Phaseolus vulgaris*) is catalysed by a ubiquitous ureidoglycolate urea-lyase. *Planta* **224**(1): 175-184
- Nelson WR, van Staden J** (1984a) The effect of seaweed concentrate on growth of nutrient-stressed, greenhouse cucumbers. *Hortscience* **19**: 81-82
- Nelson WR, van Staden J** (1984b) The effect of seaweed concentrate on wheat culms. *J Plant Physiol* **115**: 433-437
- Nelson WR, van Staden J** (1985) 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in seaweed concentrate. *Bot Mar* **28**: 415-418
- Nelson WR, van Staden J** (1986) Effect of seaweed concentrate on the growth of wheat. *South Afric J Sci* **82**: 199-200
- Ninnemann O, Jauniaux JC, Frommer WB** (1994) Identification of a high affinity  $\text{NH}_4^+$  transporter from plants. *EMBO J* **13**:3464-3471
- Oliveira IC, Coruzzi GM** (1999) Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **121**(1): 301-10
- Ördög V, Stirk WA, van Staden J, Novák O, Strnad M** (2004) Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the chlorophyta. *J Phycol* **40**: 88-95
- Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F** (2002) Analysis of the NRT2 nitrate transport family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiol* **129**(2): 886-896
- Ourry A, Macduff JH, Prudhomme MP, Boucaud J** (1996) Diurnal variation in the simultaneous uptake and sink allocation of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  by *Lolium perenne* in flowing solution culture. *J Exp Bot* **47**: 1853-1863
- Palta JA, Fillery IR, Mathews EL, Turner NC** (1991) Leaf feeding of ( $^{15}\text{N}$ ) urea for labelling wheat with nitrogen. *Aust. J Plant Physiol* **18**: 627-636
- Peoples MB, Gifford RM** (1993) Long distance transport of carbon and nitrogen from sources to sinks in higher plants. In *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Edited by DT Dennis DT, Turpin DH. New York, 434-47
- Peterman TK, Goodman HM** (1991) The glutamine synthetase gene family of *Arabidopsis thaliana*: light-regulation and differential expression in leaves, roots and seeds. *Mol Gen Genet* **230**(1-2): 145-54



- Plettner I, Steinke M, Malin G** (2005) Ethene (ethylene) production in the marine macroalga *Ulva* (Enteromorpha) *intestinalis* L. (Chlorophyta, Ulvophyceae): effect of light-stress and co-production with dimethylsulphide. *Plant Cell Environ* **28**: 1136-1145
- Polacco JC, Freyermuth SK, Gerendás J, Cianzo SR** (1999) Soybean genes involved in nickel insertion into urease. *J Exp Bot* **50**(336): 1149-1156
- Polacco JC, Holland MA** (1993) Roles of urease in plant cells. *Int rev cyt* **145**: 65-103
- Polacco JC, Holland MA** (1994) Genetic control of plant ureases. In *Genetic Engineering*. Edited by Setlow JK: Plenum Press, New-York, **16**: 33-48
- Pourtau N, Jennings R, Pelzer E, Pallas J, Wingler A** (2006) Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta* **224**(3): 556-68
- Pouteau S, Cheral I, Vaucheret H, Caboche M** (1989) Nitrate reductase mRNA regulation in *Nicotiana plumbaginifolia* nitrate reductase-deficient mutants. *Plant Cell* **1**: 1111-1120
- Povolny M** (1966) Investigation of the effectiveness on an extract of sea-weeds on the yield and quality of cucumbers for pickling I. Part. *Rostlinna Vyroba* **12**: 335-340
- Povolny M** (1969) The influence of sea-weeds extracts on the storability of apples. *Rostlinna Vyroba* **15**: 545-554
- Povolny M** (1972) The effect of the seaweed on ripening and storage capacity of peaches and apricots. *Rostlinna Vyroba* **18**: 703-710
- Povolny M** (1974) The effect of the steeping of peat-cellulose flowerpots (Jiffy-pots) in extracts of seaweeds on the quality of tomato seedlings. In *Proc. 8<sup>th</sup> International Seaweed Symposium*, Bangor, North Wales, 730-733
- Povolny M** (1977) Effects of seaweed extract on the yield, ripening and shelf life of tomatoes. *J Phycol* **13**, suppl. 55
- Pozsar Bl, El Hammady M, Kiraly Z** (1967) Cytokinin effect of benzaldenine: increase of nucleic acid and protein synthesis in bean leaves. *Nature* **214**: 273-274
- Prasad R** (1998) Fertilizer urea, food security, health and the environment. *Curr Sci* **75**(7): 677-683
- Rajeshwari M, Lakshmanan KK, Chitra AS** (1983) Effect of seaweed on tomato. *Proc. Of National Seminar on the Production Technology of Tomato and Chillies*, TNAU, Coimbatore, 87-89
- Rao DLN** (1987) Slow release urea fertilizers-effect on flood water chemistry, ammonia volatilization and rice growth in alkali soil. *Fert Res* **13**: 209-221
- Raven JA, Wollenweber B, Handley LL** (1992) A comparison of ammonium and nitrate as nitrogen sources for photolithotrophs. *New Phytologist* **121**: 19-32
- Rawat SR, Silim SN, Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass AD** (1999) AtAMT1 gene expression and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *Plant J* **19**: 143-152
- Recous S** (1987) Les mécanismes de transformation de l'azote dans le sol. *Perspectives Agricoles* **115**: 100-105
- Reddy DD, Sharma KL** (2000) Effect of amending urea fertilizer with chemical additives on ammonia volatilization loss and nitrogen-use efficiency. *Biol Fertil Soils* **32**: 24-27
- Riddles PW, Whan V, Blakeley RL, Zerner B** (1991) Cloning and sequencing of a jack bean urease encoding cDNA. *Gene* **108**: 265-268
- Sanderson KJ, Jameson PE** (1986) The cytokinins in a liquid seaweed extract: could they be the active ingredients? In *5<sup>th</sup> International Symposium on Growth Regulators in Fruit Production I.* Edited by Luckwill LC. *Acta Hort* **179**: 113-116
- Sanderson KJ, Jameson PE, Zabkiewick JA** (1987) Auxin in a seaweed extract; identification and quantification of indole-3-acetic acid by gas chromatography-mass spectrometry. *J Plant Physiol* **129**: 363-367



- Schlegel AJ, Nelson DW, Sommers LE** (1987) Use of urease inhibitors and urea fertilizers on winter wheat. *Fert Res* **11**: 97-111
- Schubert KR, Boland MJ** (1990) The ureides. In *The Biochemistry of Plants* **16**: 197-283. Edited by Miñón BJ, Lea PJ, Academic Press, San Diego
- Schultz CJ, Coruzzi GM** (1995) The aspartate aminotransferase gene family of Arabidopsis encodes isoenzymes localized to three distinct subcellular compartments. *Plant J* **7**(1): 61-75
- Senn TL, Kingman AR** (1978) Seaweed research in crop production. *Econ. Admin. US Dept. of Commerce, Washington DC*, 1-25
- Shaw M, Bhattacharya PK, Quick WA** (1965) Chlorophyll, protein and nucleic acid levels in detached, senescing wheat leaves. *Can J Bot* **43**:739-746
- Sieciechowicz KA, Joy KW, Ireland RJ** (1988) The metabolism of asparagine in plants. *Phytochemistry* **27**: 663-671
- Sirko A, Brodzik R** (2000) Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochim Pol* **47**(4) 1189-1195
- Sivasankari S, Venkatesalu V, Anantharaj M, Chandrasekaran M** (2006) Effect of seaweed extracts on the growth and biochemical constituents of *Vigna sinensis*. *Bioresour Technol* **97**(14): 1745-1751
- Sjöling S, Glaser E** (1998) Mitochondrial targeting peptides in plants. *Trends Plant Sci* **3**: 136-140
- Skelton BJ, Sern TL** (1968) Effect of seaweed sprays on quality and shelf-life of peaches. In *Proc. 6<sup>th</sup> International Seaweed Symposium*, Santiago de Compostela, Spain, 731-735
- Sohlenkamp C, Sheldon M, Howitt S, Udvardi M** (2000) Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a novel ammonium transporter in plants. *FEBS Lett* **467**: 273-278
- Sohlenkamp C, Wood CC, RoebGW, Udvardi M** (2002) Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane. *Plant Physiol* **130**: 1788-1796
- Soubies L, Gadet R, Lenain M** (1955) Recherches sur l'évolution de l'urée dans les sols et sur son utilisation comme engrais azoté. *Ann Agron* 997-1033
- Stebbins N, Holland MA, Cianzio SR, Polacco JC** (1991) Genetics tests of the roles of the roles of the embryonic ureases of soybean. *Plant Physiol* **97**: 1004-1010
- Stebbins NE, Polacco JC** (1995) Urease is not essential for ureide degradation in soybean. *Plant Physiol* **109**: 169-175
- Stephenson WM** (1966) The effect of hydrolysed seaweed on certain plant pests and diseases. In *Proc. 5<sup>th</sup> International Seaweed Symposium* **5**: 405-415, Halifax, Canada
- Stirk WA, Novák O, Strnad M, van Staden J** (2003) Cytokinins in macroalgae. *Plant Growth Regul* **41**: 13-24
- Stitt M, Muller C, Matt P, Gibon Y, Carillo P, Morcuende R, Scheible WR, Krapp A** (2002) Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J Exp Bot* **53**(370): 959-70
- Sumner JB** (1926) The isolation and crystallization of the enzyme urease. *J Biol Chem* **69**: 435-441
- Takei K, Sakakibara H, Taniguchi M, Sugiyama T** (2001) Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant Cell Physiol* **42**(1): 85-93
- Takei K, Takahashi T, Sugiyama T, Yamaya T, Sakakibara H** (2002) Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *J Exp Bot* **53**(370): 971-977
- Takei K, Ueda N, Aoki K, Kuromori T, Hirayama T, Shinozaki K, Yamaya T, Sakakibara H** (2004) AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **45**(8): 1053-1062



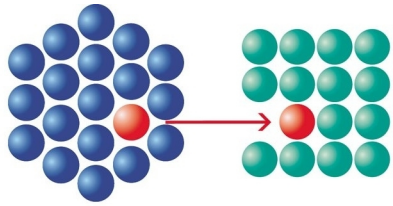
- Takishima K, Suga T, Mamiya G** (1988) The structure of jack bean urease. The complete amino acid sequence, limited proteolysis and reactive cysteine residues. *Eur J Biochem* **175**: 151-165
- Taniguchi M, Kiba T, Sakakibara H, Ueguchi C, Mizuno T, Sugiyama T** (1998) Expression of Arabidopsis response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. *FEBS Lett* **429**(3): 259-262
- Tay SAB, MacLeod JK, Palni LMS, Letham DS** (1985) Detection of cytokinins in a seaweed extract. *Phytochemistry* **24**: 2611-2614
- Tay SAB, Palni LMS, MacLeod JK** (1987) Identification of cytokinins glucosides in a seaweed extract. *J. Plant Growth Regul* **5**: 133-138
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408** (6814): 796-815
- Thimm O, Blasing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Kruger P, Selbig J, Muller LA, Rhee SY, Stitt M** (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* **37**: 914-39
- Todd CD, Polacco JC** (2004) Soybean cultivars 'Williams 82' and 'Maple Arrow' produce both urea and ammonia during ureide degradation. *J Exp Bot* **55**(398): 867-877
- Torisky RS, Griffin JD, Yenofsky RL, Polacco JC** (1994) A single gene (*Eu4*) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. *Mol Gen Genet* **242**: 404-414
- Tsay YF, Schroeder JI, Feldmann KA, Crawford NM** (1993) The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*. **72**: 705-713
- Turley RH, Ching TM** (1986) Physiological responses of barley leaves to foliar applied urea-ammonium. *Crop sci* **26**(5): 987-993
- Vadez V, Sinclair TR** (2000) Ureide degradation pathways in intact soybean leaves. *J Exp Bot* **51**(349): 1459-1465
- Van Overbeek J** (1940) Auxin in marine algae. *Pl Physiol Lancaster* **15**: 291-299
- Vanden Driessche T, Kevers C, Collet M, Gaspar T** (1988) *Acetabularia mediterranea* and ethylene; production in relation with development, circadian rhythms in emission, and response to external application. *J Plant Physiol* **133**: 635-639
- Venkataraman K, Mohan VR, Murugeswari R, Muthusamy M** (1993) Effect of crude and commercial seaweed extract on seed germination and seedling growth in green gram and black gram. *Seaweed Res Utiln* **16**: 23-28
- Verkleij FN** (1992) Seaweed extracts in agriculture and horticulture: a review. *Biol Agric Hort* **8**: 309-324
- Vincent V** (1924) Les Algues marines et leurs emplois agricoles, alimentaires, industriels. Edouard Menez, Quimper, France, 206 p
- Von Wirén N, Gazzarrini S, Gojon A, Frommer WB** (2000) The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Curr Opin Plant Biol* **3** (3): 254-261
- Walch-Liu P, Filleur S, Gan Y, Forde BG** (2005) Signaling mechanisms integrating root and shoot responses to changes in the nitrogen supply. *Photosynth Res* **83**(2): 239-250
- Wang R, Guegler K, LaBrie ST, Crawford NM** (2000) Genomic analysis of a nutrient response in Arabidopsis reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes that are induced by nitrate. *Plant Cell* **12**: 1491-1510
- Webster GC, Berner RA, Gansa AN** (1957) The effect of biuret on protein synthesis in plants. *Plant Physiol* 60-61
- Whapham CA, Blunden G, Jerkins T, Hankins SD** (1993) Significance of betaines in the increased chlorophyll content of plants treated with seaweed extract. *J Appl Phycol* **5**: 231-234





- Whapman C, Jenkins T, Blunden G, Hankins SD** (1994) The role of seaweed extracts, *Ascophyllum nodosum*, in the reduction in fecundity of *Meloidogyne javanica*. *Fundam Appl Nematol* **17**: 181-183
- Wheeler AW** (1973) Endogenous growth substances. Rep Rothamsted exp Stn **Part I**: 101-102
- Wilkie SE, Roper JM, Smith AG, Warren MJ** (1995) Isolation, characterisation and expression of a cDNA clone encoding plastid aspartate aminotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **27**(6): 1227-33
- Wilkinson JQ, Crawford NM** (1991) Identification of the *Arabidopsis CHL3* gene as the nitrate reductase structural gene *NIA2*. *Plant Cell* **3**:461-471
- Williams DG, Brain KR, Blunden G, Wildgoose PB, Jewers K** (1974) Plant growth regulatory substances in commercial seaweed extracts. In *Proc. 8<sup>th</sup> International Seaweed Symposium*, Bangor, North Wales, 760-763
- Witte CP** (2001) Modifying nitrogen use efficiency: molecular manipulation of urea metabolism in leaves of *Solanum tuberosum*. PhD thesis. Scottish Crop Research Institute, University of Dundee, Dundee, UK
- Witte CP, Isidore E, Tiller SA, Davies HV, Taylor MA** (2001) Functional characterization of urease accessory protein G (ureG) from potato. *Plant Mol Biol* **45**: 169-179
- Witte CP, Medina-Escobar N** (2001) In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction. *Anal Biochem* **290**: 102-107
- Witte CP, Rosso MG, Romeis T** (2005b) Identification of three urease accessory proteins that are required for urease activation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**: 1155-1162
- Witte CP, Tiller SA, Taylor MA, Davies HV** (2002) Leaf urea metabolism in potato. Urease activity profile and patterns of recovery and distribution of <sup>15</sup>N after foliar urea application in wild-type and urease-antisense transgenics. *Plant Physiol* **128**: 1129-1136
- Witte CP, Tiller S, Isidore E, Davies HV, Taylor MA** (2005a) Analysis of two alleles of the urease gene from potato polymorphisms, expression and extensive alternative splicing of the corresponding mRNA. *J Exp Bot* **56**(409): 91-99
- Wong HK, Chan HK, Coruzzi GM, Lam HM** (2004) Correlation of ASN2 gene expression with ammonium metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **134**(1): 332-8
- Woodward AW, Bartel B** (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot* **95**(5): 707-735
- Wu Y, Jenkins T, Blunden G, von Mende N, Hankins SD** (1998) Suppression of fecundity of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, in monoxenic cultures of *Arabidopsis thaliana* treated with an alkaline extract of *Ascophyllum nodosum*. *J Appl Phycol* **10**: 91-94
- Wu Y, Jenkins T, Blunden G, Whapman C, Hankins SD** (1997) The role of betaines in alkaline extracts of *Ascophyllum nodosum* in the reduction of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* infestations of tomato plants. *Fundam Appl Nematol* **20**: 99-102
- Yang J, Han KH** (2004) Functional characterization of allantoinase genes from *Arabidopsis* and nonureide-type legume black locust. *Plant Physiol* **134**: 1039-1049
- Yvin JC, Chabot R, Savary P** (1989) Les algues en agriculture. Influence sur les plantes cultivées et approche moléculaire des mécanismes d'action. *Perspect Agric* **134**: 74-80
- Zhuo D, Okamoto M, Vidmar JJ, Glass AD** (1999) Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (AtNrt2;1) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **17**: 563-568
- Zonia LE, Stebbins NE, Polacco JC** (1995) Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Physiol* **107**: 1097-1103





Association  
Bernard Gregory



# VALORISATION DES COMPETENCES UN NOUVEAU CHAPITRE DE LA THÈSE

**PATRICIA MÉRIGOUT**

Accompagnée du mentor **Eric BIRLOUEZ**

Ecole Doctorale ABIES

Agriculture - Alimentation - Biologie - Environnements - Santé

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

Étude du métabolisme de la plante en réponse à l'apport de différents  
fertilisants et adjuvants culturaux.

Influence des phytohormones sur le métabolisme azoté.

Thèse soutenue le 23 novembre 2006  
Directrice de thèse: Françoise VEDELE



## AVANT-PROPOS

Les jeunes docteurs sont confrontés à un marché du travail complexe, auquel ils ne sont pas ou peu préparés. Initié il y a maintenant six ans, le programme *Valorisation des compétences - un nouveau chapitre de la thèse* vise à accompagner les doctorants afin de faciliter leur insertion professionnelle, en les aidant à valoriser leurs acquis développés au cours de leur trois années de recherche. L'association Bernard Gregory (ABG, <http://www.abg.asso.fr>) est maître d'oeuvre pour le compte du Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, avec le soutien de la Région Ile-de-France et du CNRS. Les doctorants qui se prêtent à cet exercice bénéficient de l'accompagnement de mentors, consultants en ressources humaines, qui aident notamment les doctorants à identifier et à valoriser les acquis autres que scientifiques de leur thèse.

Ma candidature au *nouveau chapitre de la thèse* est une démarche volontaire, encore peu répandue chez les doctorants. J'envisage de rejoindre le monde de l'entreprise au terme de ma thèse, et cette prise de recul me semble nécessaire. J'espère que cet exercice me donnera les atouts pour valoriser ma thèse comme une expérience professionnelle à part entière auprès de futurs recruteurs. Eric Birlouez m'a accompagné dans mes réflexions tout au long de cet exercice. Je lui adresse mes plus sincères remerciements.



## I. Cadre général & enjeux de ma thèse

### *Objet, contexte et enjeux de mon projet de thèse*

Ma thèse a porté sur 'l'étude du métabolisme de la plante en réponse à l'apport de différents fertilisants et adjuvants culturaux', en particulier l'urée et les substances marines. Ce travail de recherche s'inscrivait au cœur des enjeux agronomiques, économiques, sociaux et environnementaux auxquels notre agriculture doit faire face aujourd'hui. En effet, celle-ci est confrontée à un terrible dilemme économique et environnemental : comment l'agriculteur peut-il concilier de forts rendements avec le respect de l'environnement ?

Financée par une convention CIFRE (Convention Industrielle de Formation par la Recherche), ma thèse a débuté en juin 2003. Elle s'inscrivait dans le prolongement de six années de collaboration entre le laboratoire de Nutrition Azotée des Plantes de l'INRA de Versailles (NAP) et la société BiotechMarine, dont deux années consacrées à des recherches sur les engrais azotés et l'urée que j'avais moi-même menées au NAP dans le cadre de contrats à durée déterminée. Le programme scientifique de ma thèse avait été défini en accord et selon les intérêts de chacun des trois acteurs : Monsieur Xavier BRIAND, mon tuteur industriel, Madame Françoise VEDELE, ma directrice de thèse, et moi-même, la doctorante.

La société BiotechMarine, filiale du Groupe Roullier, est une PME implantée à Pontrieux (Côtes d'Armor) et dirigée par Xavier BRIAND. Créée en 1988, la société emploie aujourd'hui une quarantaine de personnes et réalise plus de 60 % de son chiffre d'affaires à l'international. Son activité s'est structurée autour de deux pôles: les sciences de la beauté et les sciences du végétal. BiotechMarine fournit des engrais et amendements qui visent à répondre aux besoins d'une agriculture à la fois productive et respectueuse de l'environnement. Parallèlement, la société commercialise des substances biologiquement actives intégrées dans des fertilisants foliaires mais également utilisés sur le marché de la cosmétique et de la pharmacie.

Au cours de ma thèse je me suis attachée à l'étude des effets de l'urée et des substances marines sur le métabolisme azoté de la plante. En effet, l'urée représente quantitativement la principale forme sous laquelle l'azote est épandu sur les cultures dans le monde, mais elle est toutefois peu utilisée en France. Quant aux substances extraites des algues, elles ont des vertus particulières : meilleure gestion de la fertilisation dans le respect de l'environnement, induction de la croissance à divers stades de culture, défense contre les pathogènes et renforcement de la qualité des cultures (protéines et sucres). Cette évaluation des effets a été réalisée à la fois au niveau physiologique et moléculaire grâce à une analyse de la réponse de la plante au niveau de l'expression génique. L'objectif était d'identifier, à l'aide de puces à ADN, les gènes dont l'expression est modulée en réponse à ces différents apports de fertilisants. L'un des buts de ces recherches était de situer plus clairement l'intérêt de l'urée comparée aux autres formes possibles d'apport d'azote (nitrate et ammonium). D'autre part, après avoir validé les effets positifs des extraits d'algues sur l'assimilation de l'azote par la plante, nous souhaitons isoler les molécules responsables de ces effets et expliciter les modalités d'action des bio-stimulants sur la physiologie des plantes.

### *Environnement scientifique de ma thèse*

Mes activités de recherche se sont déroulées sur le site de l'INRA de Versailles, au sein du laboratoire de Nutrition Azotée des Plantes (NAP, UR511), sous la direction de Françoise





VEDELE. Laboratoire renommé au niveau national et international, le NAP est spécialisé dans l'étude de l'assimilation de l'azote et de son impact sur le développement de la plante. Si le métabolisme associé aux formes nitrate et ammonium est bien décrit, en revanche, l'urée représentait une source d'azote dont l'assimilation par la plante n'avait encore jamais été étudiée au NAP. Aussi mon projet de thèse tout en s'intégrant pleinement dans la thématique du laboratoire, ouvrait une nouvelle voie de recherche.

Le NAP et trois autres unités de recherche de l'INRA de Versailles (la Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, le Laboratoire de Biologie Cellulaire, et le Laboratoire de Biologie des Semences) se sont regroupés en 2002 pour former l'Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB). L'IJPB permet ainsi la mise en commun de démarches et outils de recherche pour développer des approches originales dans divers domaines de la biologie végétale. Le NAP développe également de nombreuses collaborations avec d'autres unités comme l'unité de Recherche en Génomique Végétale (URGV, Evry) avec laquelle nous avons réalisé notre analyse fonctionnelle du génome sur puces à ADN, ou l'unité Environnement et Grandes Cultures (EGC, Grignon) qui a réalisé certaines de nos analyses physiologiques. Le laboratoire entretient aussi des relations avec les organismes de recherche implantés dans le grand sud parisien. Au niveau national, le NAP travaille avec d'autres laboratoires INRA (par exemple, un certain nombre de nos analyses ont été effectuées à Montpellier).

Compte tenu des enjeux agronomiques, économiques et environnementaux qui lui sont liés, l'azote est étudié dans de nombreux laboratoires. Cependant l'urée reste une source d'azote actuellement peu explorée. L'Institut de la Nutrition des Plantes de l'université de Hohenheim à Stuttgart en Allemagne, a débuté en 2003 un programme de recherche sur l'utilisation des fertilisants à base d'urée par les plantes et la caractérisation des transporteurs d'urée chez les végétaux. Au cours d'une rencontre en Allemagne avec le responsable du projet (organisée à ma demande), chacun d'entre nous a présenté ses propres travaux, établissant ainsi un échange d'informations entre nos deux laboratoires. Concernant nos travaux sur les substances marines, la société BiotechMarine est notamment en concurrence directe avec Goëmar (Saint-Malo).

### *Pourquoi cette thèse?*

Suite aux deux années consacrées à des recherches sur les engrais azotés et l'urée que j'avais moi-même menées au NAP dans le cadre de contrats à durée déterminée avec la société BiotechMarine, la directrice du NAP m'a proposé de poursuivre le travail au cours d'une thèse CIFRE. J'ai très vite accepté, d'une part parce que quelques résultats intéressants émergeaient, et, d'autre part, parce que j'ai été motivée par le caractère appliqué et la finalité agronomique du projet. En effet, très proche de la nature depuis l'enfance, je n'envisageais pas d'entreprendre des études de biologie végétale sans rapports directs et concrets avec le monde végétal qui nous entoure. En outre, envisageant plutôt une carrière professionnelle de recherche et développement dans une PME, une thèse CIFRE représentait pour moi une excellente opportunité pour découvrir le monde de l'entreprise.

Les grandes lignes du projet de thèse étaient donc déjà tracées, et nous avons établi ensemble, le laboratoire, la société et moi-même, les différentes stratégies à mettre en oeuvre afin de répondre à la problématique de recherche.



## II. Déroulement, gestion & coût de mon projet

### *Evaluation et cadrage de mon projet de thèse*

Mon projet de thèse devait répondre aux objectifs et intérêts spécifiques non seulement de l'entreprise mais aussi du laboratoire. Le volet relatif aux voies de signalisation des substances algales intéressait particulièrement BiotechMarine. Cependant compte tenu du caractère aléatoire des effets des extraits d'algues sur les cultures, la responsable du laboratoire ainsi que moi-même ne voulions nous engager sur ce seul axe de recherche. Le deuxième volet relatif à l'étude des effets de l'urée sur le métabolisme et le transport de l'azote permettait à la fois de prendre en compte les intérêts du NAP et de limiter le risque de ne pas obtenir de résultats significatifs à l'issue de mon projet de recherche à son terme.

### *Conduite de mon projet*

Dans un premier temps, j'ai analysé l'impact d'une nutrition mixte (ammonium et nitrate) contenant ou non de l'urée sur des plantes de grandes cultures comme le blé ou le maïs (les résultats de ces expériences initiales ont été regroupés dans un article accepté pour publication sous réserve de modifications). J'ai ensuite utilisé la plante modèle *Arabidopsis thaliana* pour analyser plus finement ces réponses. J'ai ainsi mesuré l'effet de l'addition d'urée à d'autres sources azotées sur l'influx de nitrate, d'ammonium ou d'urée. Ces analyses physiologiques ont été complétées par des mesures réalisées sur des paramètres liés au métabolisme azoté comme, par exemple, le contenu en nitrate ou en acides aminés libres au niveau foliaire ou racinaire. Des résultats très prometteurs ont été obtenus : ces expériences ont en effet permis de mettre en évidence des adaptations du métabolisme à ces différentes sources d'azote qui sont rassemblées dans un second article. En parallèle, les mêmes types d'expériences ont été effectués sur des plantes cultivées sur une seule source d'azote et ayant reçu ou non une pulvérisation d'extraits d'algues fournis par notre partenaire industriel BiotechMarine. Le travail s'est ensuite poursuivi au niveau moléculaire par une analyse de la réponse de la plante au niveau de l'expression génique (réponse à l'urée ainsi qu'aux extraits d'algues). À la fin de l'année 2005, nous avons fait une demande de prolongation de ma bourse auprès de l'ANRT. En effet nous étions toujours en attente des résultats de ces dernières analyses dont le temps d'exploitation assez long. Mon financement devant se terminer fin mai 2006, cette échéance ne me laissait pas le temps d'exploiter au mieux les résultats et d'en réaliser le transfert vers notre partenaire privé. Afin que je puisse terminer ce projet et présenter une thèse rassemblant un ensemble pertinent de données, nous avons donc demandé une prolongation de mon financement de six mois, que nous avons obtenue.

Ces 42 mois de thèse se sont déroulés au sein d'une ambiance agréable, sans obstacles majeurs.

Bénéficiant d'une bourse CIFRE, il m'a fallu répondre aux objectifs et attentes de ma directrice de thèse et de mon responsable industriel tout au long de ma thèse. En plus de mes deux tuteurs, quatre personnes ont été directement associées à mon projet. Isabelle QUILLERÉ (IR INRA), Christian MEYER (DR2 INRA), Sylvain CHAILLOU (Pr INA-PG) et Sylvie SALAMAGNE (BiotechMarine) ont participé à mon encadrement scientifique. Nous avons également constitué un comité de thèse réunissant deux représentants de BiotechMarine (Xavier Briand et Sylvie Salamagne), et cinq représentants de l'INRA (Françoise Vedele, Isabelle Quilleré, Christian Meyer, Sylvain Chaillou et Jean-Marie MACHET (INRA Laon)). Nous étions tous liés par une obligation de discrétion absolue



concernant les informations dont la divulgation serait de nature à nuire aux intérêts de la société BiotechMarine.

Tous les six mois, je réunissais l'ensemble des représentants du comité de thèse à Paris, devant lequel j'exposais mes derniers travaux. S'engageait alors une discussion critique de mes résultats au cours de laquelle nous décidions des nouvelles étapes du projet. À l'issue de chaque réunion, je rédigeais un compte-rendu qui devait ensuite être validé par la totalité des représentants du comité technique. Par ailleurs, j'ai rédigé des rapports d'activité annuels décrivant l'état d'avancement de mes travaux, que je communiquais à mes deux tuteurs industriel et scientifique, ainsi qu'à l'Agence Nationale de la Recherche Technique (ANRT) pour le renouvellement de ma bourse CIFRE. Je présentais aussi l'avancement de mon projet ainsi que les problèmes rencontrés, au cours de réunions d'équipe hebdomadaires. J'organisais également des réunions informelles avec ma directrice de thèse et mes responsables scientifiques, chaque fois que le besoin s'en faisait sentir (pour résoudre un problème précis ou prendre une décision relative à l'orientation de mon projet). Tous les ans, j'exposais l'avancement de mes travaux devant les quatre équipes du NAP, ce qui suscitait toujours des discussions enrichissantes. J'ai également présenté mon travail de thèse au cours d'un exposé de mi-thèse, ouvert à tous les agents du centre INRA de Versailles. Enfin j'ai eu l'opportunité d'entrer en relation avec d'autres équipes travaillant sur des projets similaires ou approchants. J'ai ainsi été invitée à présenter oralement mes travaux en anglais, à l'université de Hohenheim à Stuttgart, dans le laboratoire du Prof. Dr. Nicolaus von Wirén.



## *Gestion financière de mon projet*

Pour réaliser ce projet de recherche, j'ai bénéficié d'une bourse CIFRE de 1685 € brut par mois, soit un total de 70752 € pour l'ensemble des trois années et demi de thèse. En contrepartie des engagements pris par le laboratoire NAP pour la réalisation de mon projet, la société BiotechMarine lui a versé la somme annuelle de 18232 € TTC. À la signature du contrat de collaboration, le coût annuel estimé (salaires, charges salariales et patronales) s'élevait à 58000 €, dont 14635 € seraient pris en charge par l'ANRT. L'ensemble des dépenses associées au projet est répertorié dans le tableau suivant.

<b>Personnel affecté au projet</b>	<b>Temps consacré au projet</b>	<b>Salaire brut mensuel (en €)</b>	<b>Coût salarial total (en €)</b>
DOCTORANT	42 mois	1685	113232
3 Responsables scientifiques	3*2 mois	3000	28800
Directeur de thèse	4 mois	4500	28800
4 techniciens	4*1 mois	1500	9600
2 secrétaires	2*1 mois	1500	4800
<b>Sous-total</b>			<b>185232</b>
<b>Analyses</b>	<b>Nombre</b>	<b>Coût unitaire (€uros)</b>	<b>Coût total (€uros)</b>
<i><b>Physiologiques et biochimiques</b></i>			
Nitrate	460	3,00	1380
Azote total	200	2,30	460
Acides Aminés	60	27,00	1620
Spectrométrie de masse	30	10	300
Influx	260	9	2340
<i><b>Transcriptomiques</b></i>	28	115	3220
<b>Sous-total</b>			<b>9320</b>
			<b>Coût total (€uros)</b>
<b>Autres dépenses</b>			5000
<b>TOTAL</b>			<b>199552</b>

*Note: coût salarial = salaire brut + cotisations sociales patronales, soit salaire brut x 1,6 (le montant des charges patronales a en effet été estimé, en moyenne, à 60 % du salaire brut).*

## **III. Compétences & savoir-faire**

### *Compétences techniques et scientifiques*

Tout au long de mon parcours d'étudiante, j'ai découvert avec intérêt les secrets de la physiologie cellulaire et moléculaire de la plante. J'ai développé une expertise scientifique assez large allant des techniques classiques d'analyses physiologiques, moléculaires et cellulaire, aux techniques de pointe comme l'analyse transcriptomique. L'ensemble de ces





compétences étant décrit dans mon manuscrit, je vais m'attacher ici à identifier les autres atouts que j'ai pu développer ou même acquérir au cours de ces 42 mois de thèse.

### *Compétences méthodologiques*

Comme tout projet professionnel scientifique, industriel, etc..., la réalisation d'une thèse nécessite de déterminer des objectifs précis. Pour les atteindre, je me suis pleinement investie dans mon travail de recherche et j'ai développé et acquis des compétences multiples en **gestion de projet**. J'ai disposé de 42 mois et d'un financement déterminé pour répondre à l'ensemble des questions qui se posaient au fur et à mesure de l'avancement de la thèse. J'ai donc dû mettre en place un planning, respecter des échéances, organiser et hiérarchiser mes activités, adopter et adapter certaines méthodes de travail, faire des choix et établir des priorités. Comme je l'ai déjà évoqué, périodiquement je réalisais des bilans d'étape, de même que je rédigeais régulièrement des comptes-rendus, des états d'avancement de mon projet, des rapports d'activités...

La répartition du travail avec mes collègues du laboratoire, mais aussi dans le cadre de collaborations extérieures, a forgé un peu plus mon expérience du **travail de groupe**. J'ai travaillé en coordination avec les partenaires du projet, demandant des efforts de communication et de transmission d'informations, par exemple à travers la rédaction de rapports d'activité tous les six mois. J'ai ainsi développé des compétences en **gestion de partenariats**. J'ai aussi dû gérer les aspects financiers et matériels de ma thèse, notamment pour les études du transcriptome qui demandent un financement assez conséquent.

Il m'a aussi fallu mettre au point un plan expérimental de culture scientifiquement intéressant et techniquement réalisable, qui a été à la base de toutes mes expérimentations au cours de ma thèse. L'urée et les substances marines n'étant pas des objets d'étude très familiers pour le laboratoire, j'ai dû réaliser une importante recherche bibliographique et veille scientifique, et notamment rechercher des informations sur différents sites web consacrés à l'agriculture et à l'aquaculture. Cette activité m'a conduite à appliquer une méthodologie rigoureuse pour rechercher, classer, mettre à jour... afin de ne pas se perdre dans la masse des ressources disponibles. J'ai aussi mobilisé des capacités de **synthèse** et **esprit critique** pour extraire les informations utiles et pertinentes au regard du projet.

Mes capacités de **communication** ont également été largement mises à profit. En permanence au contact d'interlocuteurs et de publics variés et multiculturels, j'ai dû apprendre à expliquer, à adapter mon langage en fonction de mes auditeurs ou lecteurs (scientifiques, commerciaux, ...), et ainsi développer mes capacités de 'vulgarisation' d'un sujet complexe. Laboratoire public et partenaire industriel n'avaient pas les mêmes attentes et des sensibilités bien distinctes. Il a donc été nécessaire que je m'adapte et que j'apprenne à communiquer avec des personnes dotées d'une formation différente de la mienne et un langage commercial auquel je n'étais pas habituée. La rédaction de trois publications scientifiques, de compte-rendu et de rapports d'activité, mais aussi la réalisation de posters lors de congrès de scientifiques, ont été autant d'occasions pour renforcer mes capacités rédactionnelles ainsi que ma maîtrise de l'anglais. Cela m'a conduit à synthétiser et à choisir des termes justes et précis.

### *Mes qualités personnelles*

Les expériences vécues au cours de ma thèse m'ont conduite non seulement à mobiliser mes atouts personnels, mais aussi à en développer de nouveaux et à améliorer certains points faibles. Au-delà des compétences scientifiques et des savoir-faire pratiques développés au cours de ma thèse, ces trois années m'ont apporté un grand enrichissement personnel.



Je ne compte plus les fois où j'ai dû vaincre ma timidité naturelle: décrocher le téléphone, interpeller autrui, intervenir en public... parfois dans une autre langue que ma langue maternelle... Si ces démarches sont aisées pour certains, elles constituaient pour moi de véritables épreuves. Tous ces efforts de communication ont consolidé ma confiance en moi, et aujourd'hui, j'hésite beaucoup moins à aller au contact d'autrui.

Autonomie, flexibilité et persévérance; ces trois qualités ont été très fréquemment sollicitées au cours de ma thèse. Mon partenaire industriel étant géographiquement éloigné, et ma directrice de thèse ayant des responsabilités multiples, j'ai souvent porté seule mon projet, et mon sens de l'autonomie en a été renforcé. Si le partenariat public/privé apporte de nombreux avantages - notamment celui de découvrir la culture de l'entreprise, très différente de celle d'un laboratoire public - il s'accompagne aussi de multiples obligations et contraintes. Il importe de faire preuve d'écoute, de patience et de flexibilité afin de satisfaire au mieux les attentes spécifiques de chaque partenaire. Enfin, mon projet n'aurait jamais abouti si j'avais manqué de persévérance. Pourtant, j'ai bien souvent eu envie de baisser les bras, notamment suite aux refus de publication de mon premier article.

Enfin, en dehors du cadre de ma thèse, j'ai participé à la vie du laboratoire en partageant avec une collègue la responsabilité du Comité d'Organisation des Fêtes du laboratoire. Nous devons organiser un 'pot de départ' à chaque fin de contrats de stage, thèse, post-doctorat... Pour fêter Noël, nous décorions le hall d'entrée du traditionnel sapin de Noël, et nous organisons chaque année le repas de Noël. Fête des Rois, pique-nique avant les départs d'été... chaque occasion faisait l'objet d'une petite fête. Tout ceci m'a demandé du temps, de la patience et de la diplomatie pour récolter des fonds auprès de mes collègues, de la créativité pour rechercher de nouvelles idées... Cette expérience a été d'une grande richesse humaine et encore une fois, elle m'a rendue plus forte face aux difficultés quotidiennes.

#### IV. Résultats & impacts de ma thèse

Sur le plan scientifique, mon travail a accru la compréhension des mécanismes d'absorption et d'assimilation de l'urée par les plantes. Dans le cadre de mon projet, un protocole de dosage de l'urée dans la plante a été mis au point au laboratoire. L'urée était jusqu'à présent une source d'azote non explorée par les équipes du laboratoire et mon travail a ouvert une nouvelle voie de recherche. Enfin, ne négligeons pas l'apport financier de mon projet pour le laboratoire, ainsi que son ouverture au monde industriel.

Pour le partenaire industriel, la meilleure connaissance des processus mis en oeuvre par la plante pour utiliser l'urée va permettre d'apporter des réponses aux agriculteurs encore réticents à utiliser l'urée comme engrais azotés. À plus long terme, la commercialisation des fertilisants uréiques sera peut-être accrue. En outre, nos résultats sur les substances marines pourraient contribuer à une future homologation et mise sur le marché de l'extrait d'algue testé au cours de ma thèse.

Enfin, suite à ce travail, trois articles scientifiques ont été rédigés (ou sont en cours de rédaction). À ce jour, le premier est accepté pour publication; le deuxième nécessite des corrections avant d'être soumis; et le dernier est en cours de rédaction.

D'un point de vue personnel, je suis fière d'être arrivée au bout de ce long chemin... Néanmoins, je suis aussi toute aussi impatiente de tourner la page et de m'engager vers un autre chemin. Aujourd'hui je souhaite mettre mes compétences à la disposition d'une petite ou moyenne entreprise du secteur agro-alimentaire. A la différence d'un groupe industriel ou



d'une grande entreprise, une PME peut me permettre d'accéder rapidement à des niveaux de responsabilité importants, en lien avec plusieurs fonctions: concevoir et piloter un projet de recherche et développement, définir et gérer la politique qualité, assurer la gestion des aspects réglementaires... Les compétences acquises me permettront aussi d'élargir mon marché de l'emploi à des domaines tels que la sécurité alimentaire, l'évaluation du risque ou encore les études toxicologiques propres à l'agroalimentaire. Je n'écarte pas non plus la possibilité de prospecter les entreprises spécialisées dans l'environnement.