

Des outils pour évaluer les effets de biostimulants sur le végétal

Dans le cadre du LabCom Estim, des méthodes et des outils ont été développés pour évaluer les biostimulants dans des conditions de stress abiotiques maîtrisés.

MAUD TRAGIN*, **SOULAIMAN SAKR**** ET **PHILIPPE GRAPPIN****

*Station Arexhor Pays de la Loire - Astredhor Loire Bretagne site d'Angers. **IRHS-UMR1345 - Institut Agro, Inrae, université d'Angers - Beaucazoué.

Le règlement harmonisé européen 2019/1009 intègre, depuis juin 2019, les biostimulants dans la grande famille réglementaire des MFSC (Matières fertilisantes et supports de culture). Ils sont définis comme des produits qui stimulent les processus de nutrition des végétaux. Des premières certifications européennes devraient voir le jour d'ici quelques années. Afin de pouvoir mieux identifier et caractériser ces produits, le laboratoire mixte de recherche LabCom Estim développe depuis 2016 des technologies d'évaluation multicritères de l'activité de biostimulants sur la tomate.

De l'usage des biostimulants à leur évaluation

Un levier pour la santé des cultures

Les contraintes environnementales d'une culture ont un impact sur la productivité agricole. Notamment les situations de déficit hydrique, les températures, trop froides ou trop chaudes, influent sur le développement de maladies et perturbent le développement et la croissance de la plante qui doit sans cesse adapter son métabolisme et l'allocation des flux de carbone en fonction de sa capacité photosynthétique du moment. Malgré ces aléas, l'usage de produits phytosanitaires et engrais chimiques a, jusqu'à présent, permis de préserver et d'optimiser les rendements. Aujourd'hui les nouvelles contraintes liées au réchauffement climatique et la volonté d'aller vers des pratiques agronomiques durables et soucieuses de la santé du consommateur, font de l'usage des biostimulants une



Photo : M. Tragin

alternative attractive pour la profession (agrofonctionnaires et semenciers) et mobilise de plus en plus la communauté scientifique.

Une évaluation nécessaire mais complexe

Il s'avère que l'activité des biostimulants, dont les effets recherchés sont de renforcer les aptitudes de la plante à se développer (germination, croissance, fructification, rendement) sous des contraintes de température, de lumière ou hydriques fluctuantes en

Mesure de l'indice chlorophyllien à l'aide du SPAD 502. (Konika Minolta). Cet appareil mesure des pics d'absorbance de la chlorophylle à différentes longueurs d'ondes.

RÉSUMÉ

➔ **CONTEXTE** - De multiples principes actifs provoquent des réactions au sein du végétal, contribuant à stimuler le développement de la plante et/ou sa résistance en situation de stress. Par leurs propriétés, certains de ces actifs sont appelés biostimulants et sont soumis à la réglementation européenne s'appliquant à la famille des matières fertilisantes et supports de culture

(MFSC). Le développement des biostimulants connaît un essor important car cette réglementation est moins contraignante que celle en vigueur pour l'homologation des stimulateurs de défense des plantes (SDP), considérés comme des produits phytopharmaceutiques.

➔ **ÉTUDE** - Le laboratoire Labcom Estim, mis en place en 2016, s'attache

à développer des outils d'évaluation des produits de stimulation dans le but de certifier leur activité et de mieux les intégrer dans les systèmes de culture. Il regroupe deux partenaires : Arexhor Pays de la Loire (station de l'institut technique horticole Astredhor) et l'Institut de recherche en horticulture et semences (IRHS). La démarche repose à la fois sur une caractérisation

des effets agronomiques sur jeunes plants de tomate et la mise en évidence, au niveau cellulaire, de l'activation de mécanismes moléculaires spécifiques grâce à la mise au point et l'utilisation de lignées biosenseurs. Cet article n'aborde que la partie « biostimulants ».

➔ **MOTS-CLÉS** - Biostimulants, marqueurs, biosenseurs, Lidar.

MFSC). Des produits à base d'algues, d'acides aminés ou encore de micro-organismes ont ainsi été testés. Ces tests ont permis de constater qu'il était primordial d'évaluer des produits en conditions non stressantes et stressantes. En effet, un produit peut ne pas avoir d'effet en conditions dites « optimales », voire même avoir un effet dépressif sur des paramètres agronomiques, et pourtant se révéler être un très bon biostimulant en conditions stressantes.

La plus-value des outils d'imagerie : l'acquisition automatique de données

Dans le cadre de nos essais, les mesures agronomiques sont généralement réalisées manuellement. Ces mesures peuvent être dans certains cas très chronophages, comme pour les mesures de croissance, et nécessitent la manipulation des plantes, ce qui peut être perçu pour elles comme un stress. À l'aide des chercheurs du Laboratoire angevin de recherche en ingénierie des systèmes (Laris), nous avons pu mettre au point un système de mesure en continu de la croissance des plantes (hauteur). Ce dispositif repose sur l'utilisation de Lidar (Light Detection And Ranging), outil utilisé dans l'aéronautique et l'automobile qui mesure avec une très grande précision les distances à l'aide de lasers.

Ce matériel d'imagerie automatise l'acquisition de données de croissance (hauteur) et permet de les visualiser *in fine* sous la forme de graphiques et de vidéos (films illustrant la croissance, le développement et les mouvements des plantes) (Figure 1). Par ce système, nous accédons également à d'autres informations telles que le rythme circadien des plantes, ou encore les mouvements ondulatoires des feuilles. Il constitue une réelle plus-value d'un point de vue technique mais aussi commercial, les agrofournisseurs appréciant tout élément illustrant concrètement les résultats.

Le précriblage des produits stimulants en laboratoire

Caractériser les effets physiologiques des biostimulants au niveau moléculaire

L'utilisation de plantes biosenseurs pour évaluer l'activité des produits et optimiser les méthodes d'application en amont des essais au champ constitue une étape stratégique de précriblage en laboratoire. Les modalités d'essai aux champs pour évaluer l'activité de biostimulants sont longues et coûteuses. Disposer d'outils de précriblage de laboratoire vise à réduire le nombre de produits testés et à optimiser les modes d'application pour la culture.

Des lignées biosenseurs de la réponse de la plante à ces produits ont été mises au point sur des modèles de laboratoire dans le but d'optimiser les modalités d'application sur plants de tomate en conditions de production. Ils permettent également de cibler des nouveaux produits actifs candidats, et d'illustrer leur mécanisme d'action sur la plante à des niveaux tissulaire, cellulaire et moléculaire.

Les mesures manuelles peuvent être perçues par les plantes comme un stress.

2 – Principe d'analyse de lignées biosenseurs

Le biosenseur exprime une fusion transcriptionnelle d'un gène rapporteur avec la séquence promotrice, marqueur de la réponse cellulaire à la stimulation.

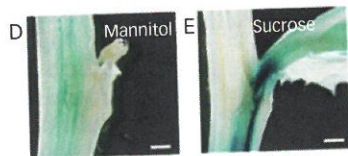
Le suivi dans la plante de l'expression du gène rapporteur, par coloration (activité de l'enzyme beta-glucuronidase du gène rapporteur GUS) ou par

des technologies d'imagerie de fluorescence (émission autocatalytique par la protéine GFP), sera le reflet de l'activation (ou de la répression) de la séquence promotrice du gène marqueur par le produit stimulant. L'effet stimulateur peut être caractérisé à un niveau spatiotemporel *in planta* ou bien être quantifié par dosage.

Séquence régulatrice (promoteur)

Séquence codant gène rapporteur

Identification/quantification au niveau cellulaire, tissulaire de la plante



Barbier et al., J Exp Bot 2015

Pour caractériser ces effets stimulants, les biosenseurs ont été développés sur des plantes modèles permettant en condition de laboratoire, une analyse *in planta*, essentiellement chez *Arabidopsis*, ou en système cellulaire sur cals de rosier ou d'*Arabidopsis*. L'intérêt d'utilisation de biosenseurs chez le modèle *Arabidopsis* a été précédemment illustré par Saint-Macary et al. (2017) pour les voies de défense de l'acide salicylique. Dans notre cas, les séquences régulatrices⁽²⁾ ou promoteurs de gènes marqueurs utilisés pour la construction de biosenseurs (voir Encadré 2) ont été choisis à partir de méta-analyses de bases de données de transcriptomique⁽³⁾ et de la littérature. Les marqueurs sélectionnés permettent de suivre différents mécanismes impliqués dans la réponse de la plante aux stress, et dans son métabolisme de croissance et de morphogenèse (voir tableau p. 47). Lors de cette analyse, nous nous sommes assurés que l'activation au niveau ARN de ces marqueurs présentait une bonne corrélation avec la réponse de la plante.

Sélection de lignées biosenseurs

Des lignées rapportrices⁽⁴⁾ de l'activité de gènes marqueurs ont été sélectionnées après transformation génétique avec les constructions moléculaires permettant de faire exprimer un gène rapporteur (GUS et GFP) sous le contrôle des promoteurs (p) respectifs de ces gènes marqueurs (Encadré 2). Les différentes lignées dites biosenseurs permettent de suivre et de quantifier l'activité

du gène rapporteur (et donc du promoteur auquel il a été associé) induite par le biostimulant. Celle-ci rapporte donc l'activité du gène marqueur spécifique d'un type de réponse de la plante. Des lignées biosenseurs ont été développées pour caractériser

3 – BRC1 marqueur de croissance

Le gène **BRC1**, Branched 1, est identifié comme un gène clé dans le processus de ramification de la partie aérienne. Ce gène joue un rôle d'intégrateur du développement et de la croissance. Il est notamment connu pour son rôle inhibiteur sur le débournement du bourgeon latéral. La répression de l'activité de ce gène marque un état physiologique dans lequel la croissance est activée. L'analyse fonctionnelle de son promoteur (dans des callus de rosier) par une approche pharmacologique montre clairement que l'activité du promoteur de ce gène est fortement régulée par le métabolisme glucidique et énergétique de la cellule. Cette propriété permet d'évaluer les orientations métaboliques de croissance de la plante induites par des activités biostimulantes.

Développement d'un marqueur spécifique du métabolisme de croissance de la plante

La construction du promoteur du gène Branched1 (BRC1) fusionné au gène rapporteur GFP⁽⁵⁾ (pBRC1::GFP) a été introduite chez *Rosa wichuraiana* pour étudier le rôle répressif de BRC1 dans le démarrage de la croissance du bourgeon latéral (Encadré 3). L'inhibition de l'activité du promoteur BRC1 est attendue en 48 heures lorsque les callus sont traités par des produits stimulant la croissance. La fluorescence émise par l'expression de la GFP est mesurée, normalisée et les résultats soumis à des analyses statistiques (test de Kruskal-Wallis et test de Tuckey). Des tests en conditions de production (voir première partie) mettent en évidence que le Bion, connu pour ses propriétés d'éliciteur (produit phytopharmaceutique de biocontrôle, stimulateur de défense des plantes), s'avère avoir aussi un effet biostimulant sur la croissance. Les méthodes utilisées en systèmes cellulaires ont permis de confirmer l'effet activateur du Bion sur la croissance. Cet effet biostimulant a été observé en quantifiant l'émission de fluorescence de la GFP sous le contrôle du promoteur BRC1 dans les callus de rosier.

L'ensemble de ces analyses confirment l'efficacité d'utilisation des biosenseurs au laboratoire pour caractériser rapidement des propriétés biostimulantes et anticiper les choix d'expérimentations agronomiques dans les conditions de la culture. En particulier, l'utilisation du promoteur BRC1 pour le criblage de biostimulants va assurément faciliter et réduire les coûts des pratiques expérimentales destinées à la mise au point de nouveaux intrants pour les cultures.

Des outils d'évaluation pour qui ?

Pour les producteurs de biostimulants, le système cellulaire « callus » constitue un outil particulièrement rapide pour évaluer l'intérêt de leurs produits et identifier les mécanismes potentiels impliqués dans la réponse de la plante. L'objectif est d'avoir sur le marché des produits davantage caractérisés pour une meilleure utilisation dans la culture. Il sera possible

Liste des réponses métaboliques illustrées par les marqueurs sélectionnés chez les lignées biosenseurs d'*Arabidopsis*

Type des réponses cellulaires caractérisées	
Réponse aux stress	<ul style="list-style-type: none"> • Induction de défenses (voie de l'acide jasmonique) • Résistance (métabolisme secondaire indolique dérivé de la voie du tryptophane) • Induction de défenses (voie de l'acide salicylique) <ul style="list-style-type: none"> • Dépôt de callose • Réponse à une blessure • Réponse aux stress/floraison/maturation (voie de l'éthylène) <ul style="list-style-type: none"> • Réponse aux stress : froid, hydrique, salin (voie de l'acide abscissique ABA)
Développement et croissance	<ul style="list-style-type: none"> • Contrôle de la germination et de l'établissement de la plantule (voie de l'ABA) • Allongement cellulaire/tropisme (voie de l'auxine) • Division cellulaire

à terme de caractériser des effets de biostimulants sur la résistance au stress hydrique, pour maîtriser l'allongement des entre-nœuds, ou pour réduire la sénescence foliaire, etc. Ces différentes réponses de la plante sont gouvernées par des voies hormonales universelles au règne végétal, respectivement l'acide abscissique, les gibbérellines et les cytokinines dans les exemples précités. Ces mécanismes assez bien conservés devraient permettre de transférer cette technologie directement chez la tomate. Ces outils sont prioritairement développés pour les agrofournisseurs et les conseillers, qui veulent faire du criblage de substances, caractériser des doses applicables, définir des protocoles d'utilisation, valider des efficacités.

POUR EN SAVOIR PLUS

CONTACT : m.tragin@arexhor-pl.fr

BIBLIOGRAPHIE : - Barakat I., Chtaina N., Grappin P., El Guilli M., Ezzahiri B., Aligon S., Neveu M., Marchi M. (2019), Induced Systemic Resistance (ISR) in *Arabidopsis thaliana* by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma harzianum* Used as Seed Treatments. *Agriculture (Basel)*, 9 (8), 166 10.3390/agriculture9080166.

- Barakat I., Chtaina N., Grappin P., Ezzahiri B. (2020), Efficacy of secondary metabolites produced by *Bacillus amyloliquefaciens* on the inhibition of *Zymoseptoria tritici*. *Global Journal of Science Frontier Research: D Agriculture and Veterinary*. In press.

(1) Un biosenseur est un système biologique qui permet de suivre des changements métaboliques à l'intérieur d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme. Ces changements sont caractérisés par une méthode de révélation et d'analyse d'un signal associé (coloration histochimique, émission de fluorescence).

(2) Une séquence régulatrice de la transcription peut moduler le niveau d'expression du gène via l'efficacité de son promoteur. Le promoteur est l'élément indispensable à l'initiation de la transcription d'un gène. On le trouve en amont de tous les gènes exprimés. Ainsi, l'activation d'un promoteur effleure un certain niveau d'activation d'un gène. La construction biosenseur (voir Encadré 2) permet de visualiser facilement cette activité dans les tissus de la plante en suivant l'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle de ce promoteur.

(3) La transcriptomique est une approche de génétique moléculaire qui permet de caractériser l'expression au niveau ARN de l'ensemble des gènes

d'un génome. Ainsi, il est possible de comparer un niveau d'activité des gènes dans des conditions physiologiques données (différents tissus, stades de développement, effets du milieu).

(4) Une lignée rapportrice est une lignée transgénique qui exprime un transgène codant pour une protéine détectable in situ et dans le cas présent permet d'évaluer l'activité du promoteur auquel elle est associée.

(5) La GFP ou « Green Fluorescent Protein » est une protéine dont la séquence codante a été isolée chez la méduse *Aequorea victoria* et dont la propriété d'émission de fluorescence par une longueur d'onde d'excitation à 475 nm. Cette propriété autocatalytique de fluorescence est très utilisée pour ses propriétés rapportrices permettant de suivre l'activité des produits d'expression des gènes dans les cellules vivantes. Sa découverte et son utilisation en génétique moléculaire ont valu le prix Nobel de chimie à O. Shimomura en 2008.