



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Agrosystèmes, Écosystèmes et Environnement

Présentée et soutenue par :

Mme EVE-ANNE LAURENT

le jeudi 20 décembre 2018

Titre :

Efficiencce de l'utilisation de l'azote par le blé dur soumis à une application foliaire de biostimulants

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

AGroécologie, Innovations, TeRritoires (AGIR)

Directeurs de Thèse :

M. PHILIPPE GRIEU

M. THIERRY LAMAZE

Rapporteurs :

M. CHRISTOPHE ROBIN, INRA NANCY

M. PATRICK DU JARDIN, UNIVERSITE DE LIEGE

Membres du jury :

M. JEAN-CHRISTOPHE AVICE, UNIVERSITE DE CAEN, Président

MME CELINE DURIEU, AGRONUTRITION, Membre

M. PHILIPPE GRIEU, TOULOUSE INP, Membre

M. PIERRE ROUMET, INRA MONTPELLIER, Membre

M. THIERRY LAMAZE, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre

M. VINCENT ALLARD, INRA CLERMONT FERRAND, Membre

REMERCIEMENTS

Merci aux membres du jury et aux rapporteurs d'avoir accepté de juger ce travail. Je suis reconnaissante également à la société Agronutrition, à l'ANRT, à Bpifrance et à la région Occitanie d'avoir rendu ce travail de thèse possible en le finançant. Merci à toutes les personnes ayant participé au projet INNOPERF-BLE dont dépend cette thèse pour leurs échanges lors de nos réunions, cela m'a permis de progresser.

J'adresse un remerciement à Faouzi Attia ainsi qu'à mes encadrants Thierry Lamaze et Philippe Grieu pour m'avoir fait confiance et choisie pour mener ce projet à bien. Merci à mes responsables Thierry, Philippe et Céline Durieu de m'avoir suivie tout en me laissant une bonne marge d'autonomie. Cela m'a permis d'expérimenter et de m'épanouir dans mon travail. Vos conseils techniques et votre expérience ont ponctué le tout et m'ont aidée à avancer, en particulier Thierry et Philippe pour leur rigueur scientifique et Céline pour son expertise sur les biostimulants.

L'ensemble des essais réalisés n'aurait bien-sûr pas été envisageable sans l'aide technique de nombreuses personnes :

- A mes stagiaires, vous m'avez apporté beaucoup en formant une équipe pleine de bonne humeur et en vous investissant à mes côtés. Je tiens à vous adresser un clin d'œil à chacun : Sébastien et Alexandre pour avoir cultivé amoureusement plusieurs centaines de pots de blés envers et contre l'oïdium et les pucerons, Diana pour avoir appris les chiffres en français en pesant les pots de blé, Bastien pour ta vaillante bataille avec la convention de stage, Maxime pour ton regard malicieux sur le métier de chercheur, Julie pour avoir trouvé de si belles cellules à observer dans les racines de blé, Sarah pour avoir dompté le Licor et pour avoir ponctué ma thèse de blagues, Samuel pour m'avoir fait travailler en anglais et pour ta peur des serpents, Mickaël pour aller au champ en tenue camouflage en espérant voir des sangliers.
- A l'équipe Agronutrition, merci à Julien, Nicolas et Jérôme pour votre soutien et le travail au champ dans la joie et la bonne humeur, malgré les pénuries de chocolaines et les accès parfois épiques aux parcelles d'essais. Merci aussi à Maurane pour tes conseils sur la culture en phytotron, à Ali pour ton aide lors des récoltes, à Léa pour les discussions stats, à Denis pour avoir abreuvé mes blés de solution nutritive, à Alexia pour tes petits mots sympathiques à chaque envoi de courrier.
- A l'équipe technique de Vasco, merci à Didier d'avoir été toujours réactif et arrangeant, à Eric pour tes conseils avisés et pour les analyses d'azote, à Michel pour ton aide et ta gentillesse, à Pierre pour l'installation des capteurs, à Céline, à Damien... et à tous ceux qui de près ou de loin ont apporté leur contribution à ces grands essais en serre et au champ.
- A Audrey et Carole, alias Choupis, merci pour la réalisation des analyses protéomiques et pour les rigolades. Merci Carole pour t'être livrée avec moi dans la rédaction d'un article, pour avoir partagé les bons et les mauvais moments et pour ton soutien sans faille.
- A Céline Kerninon, merci d'avoir fait tant de trajets pour me venir en aide et pour ta précieuse compagnie.
- A Denis Loubet, merci pour l'installation des essais dans tes champs, pour ton efficacité et ta bonne humeur communicative.
- A la fédération de la chasse, merci pour le prêt d'une clôture électrique contre les sangliers.
- A Bruno Bourrié, merci pour ton partage d'expérience et tes éclairages.
- A Pascal Tillard, merci pour les analyses ¹⁵N et pour votre prévenance.

Je remercie les membres de l'UMR AGIR m'ayant accompagnée pendant ces trois années. Mes pensées vont particulièrement à Noémie pour ses relectures et pour son soutien tant sur le plan professionnel que personnel. Merci aussi à Noémie, Catherine et Pierre pour les pique-niques du midi, à Etienne pour les coups de pouce et les conversations parapente. Merci à tous pour les bons mots échangés, lors de mes passages dans votre bâtiment, pour les conseils et le soutien administratif : JEB, Philippe, Jean-Pierre, Maryse, Marina, Matthieu, Thierry, Laurent, Jay Ram, Loïc, Céline, Antoine, Nicolas...

A mes voisins de bureau qui ont bien dû rire à me voir manipuler des poubelles de terre pendant qu'ils faisaient des extractions d'ADN et autres travaux minutieux. Merci à l'Equipe Ecolab d'avoir alimenté mes petits décrochages aux repas du midi. Merci Yanis d'avoir toujours une madeleine sous la main en cas de coup dur, Mélanie pour les dépannages en serre, David pour la relecture d'article, Elie pour la validation d'analyses statistiques, Youssra pour avoir épicé mon quotidien, Nawel pour ta douce compagnie au bureau, Pierre pour ton aide et ta participation au comité de thèse, Dominique pour les cris de coqs ou brame du cerf sur le pas de ma porte en fonction de la saison, Patricia pour ta bienveillance maternelle...

Je n'oublie pas ceux grâce à qui j'en suis arrivée là professionnellement. Jérôme Silvestre, Jean Kallerhoff et Michel Kaemmerer, je vous suis infiniment reconnaissante pour m'avoir formée à la recherche, pour m'avoir ensuite accompagnée et recommandée, et pour continuer d'être là à échanger autour d'un bon repas. Merci aussi à mes anciens collègues d'Arvalis pour m'avoir donné le goût pour le travail de terrain dans une atmosphère plus que conviviale. En particulier, merci Bernard d'être mon gourou des blés depuis cinq ans, de toujours partager ton savoir et d'être si bon public. Merci Matthieu de m'avoir fait bénéficier de ton expertise et de ta vision de la filière blé dur, Christelle pour tes conseils vernalisation et ton grand cœur de aze, Floriane pour tes rires et tes encouragements, Sophie pour ton soutien et ta bonne compagnie en congrès comme dans le voisinage, Luc et Françoise pour vos points de vue d'agronomes et pour être mes piliers sur Toulouse.

Et à tous ceux qui ont aussi partagé mon quotidien pendant cette grande aventure qu'est la thèse. Merci à mes collègues de théâtre d'improvisation pour m'avoir permis d'expérimenter, de lâcher-prise, et de vivre tant d'émotions. David, tes enseignements sur scène m'ont suivie dans mon travail et je garde en tête que la réussite c'est essayer une fois de plus que l'échec. Merci d'avoir été là autour de moi de près ou de loin : Justine, Marie, Caroline, Soizic, Lulu, Jérôme, Marion, Reinaldo, Anne-Lise, Yoann, Margot, Noé, Bastien, Hélène, Thomas, Elodie, Djoul, Mathilde, les Mélânes, Antoine, Emeline, Charlotte, Sophie, Coralie, Camille... Merci aussi aux amis du Caf Comminges pour les moments d'évasion et pour la révision de ma thèse en 180 secondes avec la montagne enneigée pour décor.

Mes tendres pensées vont à mes parents, à mes sœurs, à mon petit Tom, à Malo et Yael arrivés pendant la thèse, à ma chère mamy Thérèse et à mon cher papy Gaby. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir donné des ailes !

RESUME

La consommation du blé dur en azote est importante afin de satisfaire la demande de l'industrie pastière et semoulière en terme de teneur en protéines des grains, ce qui se traduit par une fertilisation azotée élevée et par un impact environnemental fort (pertes d'azote dans l'air ou dans l'eau). Les biostimulants constituent une alternative pour optimiser l'utilisation d'azote par la plante et limiter les pertes azotées. Les biostimulant DPI4913 à base d'extraits d'algues et d'acides aminés et AF086 à base d'extraits de champignons ont été testés en application foliaire au champ et en serre. En conditions d'utilisation optimales (application au stade deux nœuds en irrigation et fertilisation non limitantes), ils augmentent le rendement en grains, la biomasse, la quantité d'azote prélevée et son allocation vers le grain au détriment des autres compartiments. La quantité d'azote des grains est augmentée et la composition en protéines modifiée, sans affecter la teneur en protéines.

Le blé dur est caractérisé par une forte demande en azote pour atteindre le niveau de protéines requis pour la transformation en pâtes et semoules de qualité, ce qui contribue à un niveau de fertilisation azotée élevé et à des pertes d'azote par lixiviation ou volatilisation. L'optimisation de l'efficacité d'utilisation de l'azote par la plante par apport de biostimulants pourrait constituer une alternative d'amélioration de la production de blé dur et du bilan agro-environnemental de la culture. Les actions bénéfiques des biostimulants à base d'extraits d'algues, d'acides aminés ou de protéines extraites de champignons ont été décrites sur l'augmentation de production de biomasse des plantes, le rendement, l'absorption d'azote et la résistance aux stress abiotiques. Bien que ces effets aient été décrits pour diverses cultures, peu d'études ont été réalisées sur le blé dur, et encore moins sur les flux d'azote dans la plante et le contenu protéique du grain. Dans ce travail, le biostimulant d'origine algale DPI4913 contenant un mélange d'acides aminés et le biostimulant d'origine fongique AF086 ont été testés en application foliaire sur blé dur au champ et en serre. L'étude de leurs effets sur le rendement en grains et la biomasse produite, à trois stades d'application en conditions de contraintes hydrique ou azotée, a permis de déterminer les conditions d'application optimales de ces produits : au stade deux nœuds en conditions d'irrigation et de fertilisation non limitantes. L'analyse du contenu en azote de la plante à maturité a montré une augmentation de la quantité d'azote prélevé par les plantes traitées et de l'allocation de l'azote vers l'épi, au détriment des autres compartiments. Le suivi des flux d'azote dans la plante par marquage foliaire ($^{15}\text{NH}_4^+$) ou racinaire ($^{15}\text{NO}_3^-$ et $^{15}\text{NH}_4^+$) a montré des tendances pour les deux biostimulants à améliorer le prélèvement d'azote minéral racinaire ou foliaire, et sa migration vers le grain. L'apport combiné de biostimulants et d'un fertilisant azoté foliaire contenant de l'urée marquée a permis de mettre en évidence un effet positif des biostimulants sur la migration d'azote issu du fertilisant vers le grain, mais pas sur l'absorption foliaire du fertilisant. Les effets de DPI4913 et AF086 sur le rendement en grains et l'allocation de l'azote vers le grain se traduisent par une augmentation de la quantité en protéines du grain, sans effet sur la teneur en protéines. A cette augmentation de la quantité de protéines dans le grain s'ajoute une modification de la composition en protéines. Les plus fortes variations constatées concernent l'expression de protéines impliquées dans la dureté du grain, dans le stockage avec une forte surexpression de la gamma-gliadine, dans les processus de régulation avec la surexpression de protéines impliquées dans la régulation de la transcription, et dans la réponse aux stress avec la surexpression de protéines impliquées dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques.

ABSTRACT

Durum wheat nitrogen demand is high in order to reach the grain protein concentration required by the pasta and semolina industry, which is responsible for high nitrogen fertilizer inputs and a strong environmental impact (nitrogen losses through the atmosphere and water). Biostimulants are an alternative to optimize plant nitrogen use and reduce nitrogen losses. Foliar applications of the marine and amino acid extract DPI4913 and of the fungal extract AF086 on durum wheat were tested in field and greenhouse experiments. Under optimal conditions (application at the second node stage under non-limiting water and fertilizer supplies), these two biostimulants increase grain yield, plant biomass, total nitrogen absorbed and its allocation to grains, at the expense of other compartments. The amount of nitrogen in grains is increased and the protein composition is modified without impacting the protein concentration.

Durum wheat culture requires high nitrogen fertilization in order to achieve the required protein concentration for pasta and semolina quality, contributing to high nitrogen fertilizer inputs and nitrogen losses to the atmosphere and water. Optimizing plant nitrogen use efficiency through the use of biostimulants could improve durum wheat production and the agro-environmental balance of the crop. The positive impact of algae extracts, amino acids and proteins extracted from fungi were reported to enhance plant biomass production, yield, nitrogen absorption and resistance to abiotic stress. Even though these effects were reported for various crops, only a few studies have actually focused on durum wheat, and even fewer on the nitrogen fluxes within the plant and on the grain protein composition. In this study, an algae and amino acid extract DPI4913 and a fungal extract AF086 were tested in field and greenhouse experiments. Studying their effects on grain yield and biomass, we determined the optimum use applications at the second node stage under non-limiting water and nitrogen conditions. Analyzing plant nitrogen content at maturity showed an increase in the total nitrogen quantity for treated plants and an increase in the allocation of nitrogen to the wheat ear at the expense of other plant compartments. Studying nitrogen fluxes within the plant through foliar ($^{15}\text{NH}_4^+$) or soil ($^{15}\text{NO}_3^-$ and $^{15}\text{NH}_4^+$) labeling revealed a positive trend of biostimulants, improving foliar and soil mineral nitrogen absorption and allocation to grains. The application of both biostimulants and a nitrogen fertilizer showed a positive effect of biostimulants on fertilizer-contained nitrogen to grains, but not on fertilizer foliar absorption. DPI4913 and AF086 effects on grain yield and nitrogen allocation to grains are reflected in an increase in the quantity of grain protein, without any effect on grain protein concentration. This increase in the grain protein quantity is correlated with changes in the protein composition. The highest variations in protein abundances were found for proteins involved in grain technological properties such as grain hardness, in storage functions with the substantial over-representation of the gluten protein gamma-gliadin, in regulation processes with the over-representation of proteins that play a transcription regulator role, and in stress responses with the over-representation of proteins implied in biotic and abiotic stress defense.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I : Introduction et analyse bibliographique	10
1 Problématique générale.....	10
2 Etat de l'art	13
2.1 Cycle de développement et nutrition azotée du blé dur.....	14
2.1.1 Effet de la fertilisation azotée au cours du développement phénologique du blé.....	14
2.1.2 Absorption et assimilation de l'azote par la plante.....	20
2.1.3 Stockage de l'azote, remobilisation et dynamique de sénescence.....	23
2.1.4 Accumulation de protéines au cours du remplissage du grain.....	25
2.2 Biostimulants.....	27
2.2.1 Généralités sur les biostimulants	27
2.2.2 Effets des biostimulants d'origine algale.....	32
2.2.3 Effets des biostimulants d'origine fongique	33
2.2.4 Effets des biostimulants à base d'acides aminés	34
2.3 Hypothèses de recherche	41
CHAPITRE II : Matériels et Méthodes	45
1 Traitements biostimulants et apport d'azote foliaire	46
2 Matériel végétal et conditions de culture.....	48
2.1 Culture au champ.....	50
2.1.1 Site de Saint-Sulpice.....	51
2.1.2 Site de Mervilla	53
2.1.3 Site de Rebigue.....	53
2.2 Culture en serre.....	55
2.2.1 Campagne 2016.....	56
2.2.2 Campagne 2017	62
3 Exploitation statistique des données	65
CHAPITRE III : Effets des biostimulants sur le rendement en grains et sur la croissance	67
1 Essais au champ.....	67
2 Essai en serre	74
3 Détermination des conditions optimales d'application	79

CHAPITRE IV : Effets des biostimulants sur la dynamique de l'azote dans la plante	81
1 Marine and fungal biostimulants improve grain yield, nitrogen absorption and allocation in durum wheat plants.....	82
Abstract.....	83
Introduction.....	84
Material and Methods.....	86
Results.....	89
Discussion.....	95
Conclusion.....	99
Conflict of Interest.....	99
Author Contributions.....	99
Funding.....	100
Acknowledgments.....	100
References.....	100
2 Efficacité d'utilisation des apports d'azote foliaire en fonction du niveau de fertilisation.....	104

CHAPITRE V : Effets des biostimulants sur la composition et le rendement protéique du grain ...	109
Durum Wheat Proteome Changes under Marine and Fungal Biostimulant Treatments.....	110
Abstract.....	111
Highlights.....	112
1 Introduction.....	112
2 Materials and methods.....	114
2.1 <i>Experimental design and plant material</i>	114
2.2 <i>Nitrogen-to-protein quantification</i>	116
2.3 <i>Sample preparation for proteomics analysis</i>	116
2.4 <i>NanoLC-MS/MS analysis</i>	117
2.5 <i>Bioinformatics analysis of nanoLC-MS/MS data</i>	117
2.6 <i>Statistical and functional data analysis</i>	118
3 Results and discussion.....	118
3.1 <i>Grain dry biomass and protein accumulation</i>	118
3.2 <i>Protein composition of durum wheat flours</i>	119
3.3 <i>Proteins involved in grain technological properties</i>	124
3.4 <i>Proteins involved in storage functions</i>	125
3.5 <i>Proteins involved in regulation processes</i>	126
3.6 <i>Proteins involved in stress and defense response</i>	128
4 Conclusions.....	135

Author Contributions.....	135
Funding.....	136
Acknowledgments	136
5 REFERENCES	136
CHAPITRE VI : Conclusion et Discussion générale	146
CHAPITRE VII : Perspectives	156
Références bibliographiques	159
Annexe.....	182

AVANT-PROPOS

Les travaux décrits dans ce manuscrit ont été réalisés dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE) et financés par l'Association nationale de la recherche et de la technologie (ANRT) ainsi que l'entreprise Agronutrition. Cette convention associe les partenaires suivants : (1) l'entreprise Agronutrition, implantée dans le sud-ouest (Carbonne, Haute-Garonne), qui produit et commercialise des compléments nutritionnels pour végétaux, (2) l'unité mixte de recherche AGIR (Agroécologies – Innovations – Territoires) à l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) de Toulouse, (3) l'unité mixte de recherche CESBIO (Centre d'études spatiales de la biosphère) à Toulouse, (4) et moi-même, la doctorante.

Cette thèse est rattachée au projet INNOPERF-BLE retenu au 16^{ème} appel à projets du Fonds Unique Interministériel (FUI) dédié au financement de projets des pôles de compétitivité. Il regroupe trois partenaires privés et quatre partenaires publics. Par conséquent, les résultats présentés dans ce manuscrit sont soumis à confidentialité.

Chapitre I

Introduction et Analyse bibliographique

CHAPITRE I : Introduction et analyse bibliographique

1 Problématique générale

Le blé dur, cultivé depuis la préhistoire, est une culture d'importance utilisée principalement pour la consommation humaine sous forme de pâtes ou de semoules. Il se différencie du blé tendre utilisé classiquement en panification, biscuiterie et amidonnerie. Le blé dur est surtout consommé dans la zone méditerranéenne qui représente le principal importateur. Avec une production annuelle oscillant entre 35 et 41 millions de tonnes sur les dix dernières années, il se classe comme la sixième céréale produite dans le monde, bien derrière le blé tendre dont la moyenne de production annuelle est de 690 millions de tonnes sur dix ans (Carel, 2017). En France, la production de blé dur était de 2 millions de tonnes en 2017, dont 0.8 millions de tonnes provenant du sud-ouest (FranceAgriMer, 2018a). La surface cultivée est soumise à une forte variabilité due à la volatilité des cours de cette culture. Selon Bousquet, (2018), la filière blé dur s'est principalement construite autour des réformes successives de la Politique Agricole Commune et des écarts de prix entre blé dur et blé tendre, incitant les agriculteurs à cultiver préférentiellement l'une ou l'autre de ces cultures (Figure 1).

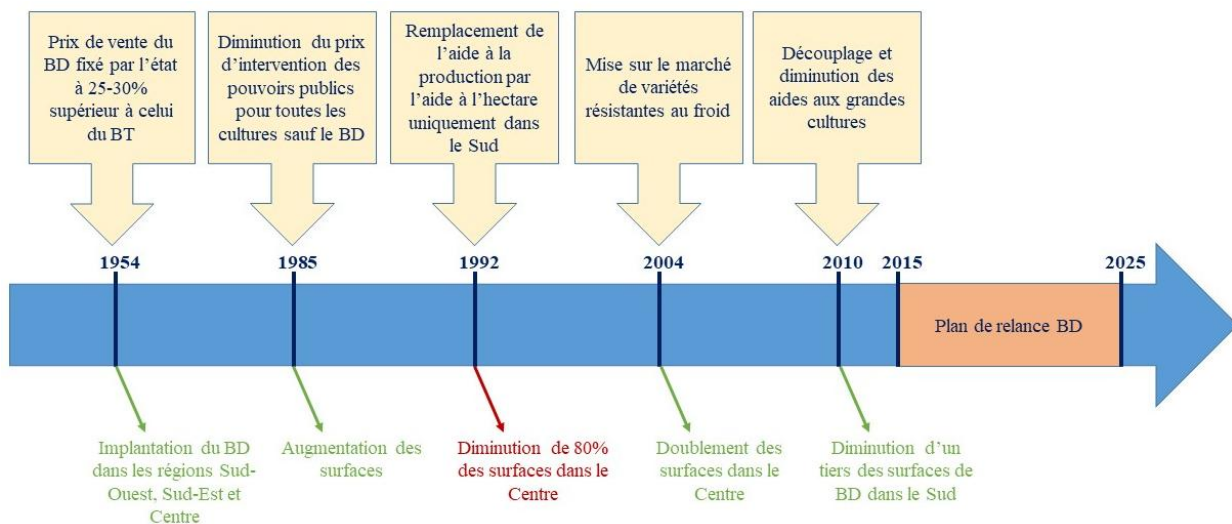


Figure 1 : Impact des réformes et innovations sur la production de blé dur (BD) en France

La culture du blé dur est soumise à des contraintes qui constituent un frein non négligeable à sa production. Il s'agit pour les agriculteurs d'assurer une production rentable, tout en répondant aux attentes des industriels de la transformation du blé dur en termes de qualité (teneur en protéines), et en réduisant l'impact environnemental lié à l'utilisation d'engrais azoté. Les critères de qualité requis pour le blé dur varient selon les pays en fonction des attentes des transformateurs industriels. En France, la classification repose sur les critères suivants : teneur en protéines comprise entre 13.5 et 14 %, poids spécifique (poids d'un hectolitre de grains) supérieur à 78, mitadinage (grains opaques non vitreux) inférieur à 20 %, indice de jaune supérieur à 40 et qualité sanitaire avec une concentration en contaminants inférieures à 750 ppb (Killmayer, 2017). La teneur en protéines du grain à maturité est un critère de qualité majeur puisque les procédés de transformation du blé dur requièrent une teneur en protéines élevée. La teneur en protéines et la productivité dépendent de nombreux facteurs, dont principalement la disponibilité en ressources du sol comme l'eau et/ou l'azote minéral. Le blé dur est une culture particulièrement exigeante en intrants azotés (en moyenne 3.7 kg d'azote par quintal produit pour le blé dur, contre 3.0 pour le blé tendre, 2.4 pour l'orge ou 2.2 pour l'avoine, Arvalis Institut du végétal, 2013a). La fertilisation azotée représente ainsi un enjeu majeur pour atteindre ces niveaux de teneurs en protéines et les agriculteurs appliquent généralement sur cette culture des quantités d'engrais supérieures à celles nécessaires pour un rendement en grains optimum. Cependant, un certain nombre de problèmes est lié à la fertilisation azotée : la synthèse d'engrais azotés est fortement consommatrice d'énergie, leur coût est élevé pour les agriculteurs, et ils ont un impact négatif

environnemental fort et de moins en moins accepté par l'opinion publique (Shewry, 2016). De ce fait, les normes environnementales spécifiées dans le cadre de la Directive Nitrate ont été adoptée en 1991 au niveau européen et elles visent à limiter la pollution des eaux par le nitrate et donc l'utilisation d'engrais azotés. Plus récemment, l'azote que l'on retrouve dans l'atmosphère sous forme de NO_x et NH_3 fait l'objet de critiques quand à son impact négatif sur l'environnement.

Pour ces raisons, les surfaces cultivées en blé dur ont diminué progressivement (moins un tiers en deux ans en France, (FranceAgriMer, 2018a) et, en 2014, il s'est produit une baisse de l'offre aboutissant à une envolée des cours du blé dur. Ceci a conduit à une réflexion commune des acteurs de la filière blé dur : agriculteurs, organismes de recherche, sélectionneurs, représentants des producteurs, collecteurs, transformateurs et industriels (semouliers, pastiers), organismes de mise en marché, exportateurs. Un plan de relance a été établi sur la période 2015-2025 par FranceAgriMer, organisme intermédiaire entre les filières et l'état, afin de soutenir la production française de blé dur. Les objectifs de ce plan visent à favoriser la culture de blé dur en développant la recherche et la communication, en promouvant les aides financières (reconnaissance du blé dur comme une culture à part entière dans le cadre de la PAC au niveau national, et au niveau européen du dispositif d'aides couplées à la production de blé dur), en créant de nouvelles variétés, en optimisant les pratiques agronomiques et les itinéraires techniques, en adaptant la collecte et le stockage chez les organismes stockeurs, en consolidant la transformation de blé dur en France, et enfin en développant l'exportation de manière soutenue et régulière.

En ce qui concerne l'amélioration des pratiques agronomiques et des itinéraires techniques, l'optimisation de l'utilisation de l'azote est un objectif majeur. Il s'agit de réduire les apports d'engrais azotés afin de limiter les pertes d'azote dans l'environnement par volatilisation sous forme d'ammoniac (NH_3), d'oxyde d'azote (NO_x) ou par lixiviation sous forme de nitrate (NO_3^-) ou d'ammonium (NH_4^+), tout en maximisant l'utilisation de l'azote par la plante et en garantissant un rendement et une teneur en protéines suffisants. Différentes stratégies sont envisagées pour améliorer l'efficacité d'utilisation de l'azote par la plante, incluant la sélection variétale, l'augmentation de la capture d'azote, l'optimisation de l'assimilation du nitrate et de l'ammonium, la maximisation de l'activité photosynthétique et l'optimisation de la remobilisation de l'azote vers le grain (Forget et al., 2017).

Le projet INNOPERF-BLE dans lequel s'inscrit ce travail de thèse répond à cet objectif d'optimisation d'utilisation de l'azote par la plante, puisqu'il vise à développer et à mettre sur le marché de nouvelles solutions de fertilisation azotée en utilisant des produits biostimulants, c'est-à-dire des “ produits formulés d'origine biologique qui améliorent la productivité de la plante en raison de propriétés novatrices ou émergentes d'un mélange de composés, et non pas uniquement en raison de la présence de nutriments essentiels connus, de régulateurs de croissance, ou de composés protecteurs pour la plante (Yakhin et al., 2017a) ”. Ce projet associe donc l'utilisation de biostimulants à la mise au point de microcapteurs permettant de connaître la disponibilité de l'azote minéral dans le sol et à la réalisation d'analyses protéomiques visant à déterminer l'effet des biostimulants sur la composition protéique du grain. Il s'agit de réunir l'ensemble de ces travaux dans une même offre packagée “Biostimulants, Capteurs et Outil d'aide à la décision (OAD)” destinée à optimiser les pratiques de fertilisation azotée des agriculteurs en remplissant les objectifs suivants :

- diminuer les pertes d'azote par lixiviation
- optimiser l'utilisation de l'azote du sol
- améliorer le rendement, mais surtout la teneur et la composition en protéines du grain
- valider une stratégie de fertilisation azotée du blé

Deux produits biostimulants, formulés et préalablement testés par Agronutrition, ont été retenus pour leurs capacités à améliorer le rendement et la teneur en protéines du blé dur, sans constituer un apport azoté : le biostimulant DPI4913 à base d'extrait d'algue *Ascophyllum nodosum* et d'acides aminés, le biostimulant AF086 à base de protéines purifiées de champignon *Trichoderma*.

L'objectif des travaux de thèse est d'étudier l'impact de ces produits biostimulants sur :

- le remplissage du grain : rendement, taux protéique et qualité des protéines
- l'efficacité d'utilisation de l'azote par la plante : absorption par les racines de l'azote minéral du sol (NO_3^- et NH_4^+), absorption d'engrais azoté foliaire (apports combinés de biostimulants et d'azote foliaire), devenir de l'azote absorbé dans la plante (traçage ^{15}N)

2 Etat de l'art

Afin d'étudier l'impact des biostimulants sur l'efficacité d'utilisation de l'azote par la plante, il est nécessaire de prendre en compte le cycle de développement du blé, les conduites

de fertilisation classiquement utilisées, et les effets connus des biostimulants (Altenbach et al., 2003). Ce chapitre s'organise donc en trois parties :

(i) La première partie présente les stades de développement du blé et les composantes de rendement. Elle permet également de décrire les mécanismes d'absorption de l'azote par la plante, de stockage, de remobilisation vers le grain et de remplissage du grain. Nous avons choisi de présenter les flux d'azote dans la plante et leur importance respective aux différents stades de développement de la plante, le but étant d'identifier les mécanismes d'actions des biostimulants. Les pratiques de fertilisation classiquement pratiquées par les agriculteurs sont décrites afin d'y intégrer l'application de biostimulants.

(ii) La deuxième partie permet de faire un état des lieux des connaissances actuelles sur les biostimulants et plus particulièrement sur les biostimulants d'origine algale, fongique et à base d'acides aminés. En effet, un des biostimulants fournis par la société Agronutrition est formulé à base d'extraits d'algues *Ascophyllum nodosum* et d'acides aminés, et l'autre à base de protéines purifiées de champignon *Trichoderma*. Un point particulier est fait sur le marché des biostimulants et la mise en place d'une réglementation européenne pour ces produits, jusqu'alors classés dans la catégorie Matières Fertilisantes et Supports de Culture (MFSC).

(iii) La troisième partie dresse la liste des hypothèses de recherche sur les effets des biostimulants et leurs mécanismes d'actions, établie à partir de cette analyse bibliographique. Au regard de ces hypothèses et des objectifs de recherche préalablement énoncés, les expérimentations mises en place pour y répondre sont présentées.

2.1 Cycle de développement et nutrition azotée du blé dur

2.1.1 Effet de la fertilisation azotée au cours du développement phénologique du blé

Le blé est une graminée annuelle. Une plante de blé est constituée de plusieurs talles, comprenant une tige principale (maître-brin) et des tiges secondaires (talles secondaires), et d'un système racinaire fasciculé avec de nombreuses racines adventives. Le rendement en grains dépend de la densité de plantes levées, du nombre de talles par plante, du nombre de grains par épi et de la masse des grains. Ces variables représentent les composantes de rendement, décomposées dans l'Equation 1.

Équation 1 : Composantes de rendement du blé

$$MS_{grains} \cdot m^{-2} = nb_{plantes} \cdot m^{-2} \times nb_{talles} \cdot plante^{-1} \times nb_{grains} \cdot épi^{-1} \times MS_{un\ grain} \text{ avec}$$

$MS_{grains} \cdot m^{-2}$	la masse sèche de grains par mètre carré à maturité
$nb_{plantes} \cdot m^{-2}$	la densité de peuplement, soit le nombre de plantes par mètre carré
$nb_{talles} \cdot plante^{-1}$	le nombre de talles par plantes
$nb_{grains} \cdot épi^{-1}$	le nombre de grains par épi
$MS_{un\ grain}$	la masse sèche d'un grain

Les composantes de rendement s'élaborent au cours du développement du blé qui comprend trois grandes périodes au cours desquelles se succèdent les stades phénologiques du blé (Figure 2) :

- **la période végétative**, de la germination au début du tallage
- **la période reproductrice**, de la formation de talles (tiges secondaires) à la fécondation. Le nombre d'épis au mètre carré s'élabore au cours de la phase de tallage et de montaison, après régression de certaines talles. Le nombre de grains par épi est fixé au stade floraison.
- **la période de maturation**, de la fécondation à la maturité du grain. La masse sèche finale des grains s'établit au cours de la phase de remplissage et de maturation des grains qui a lieu à partir du stade floraison.

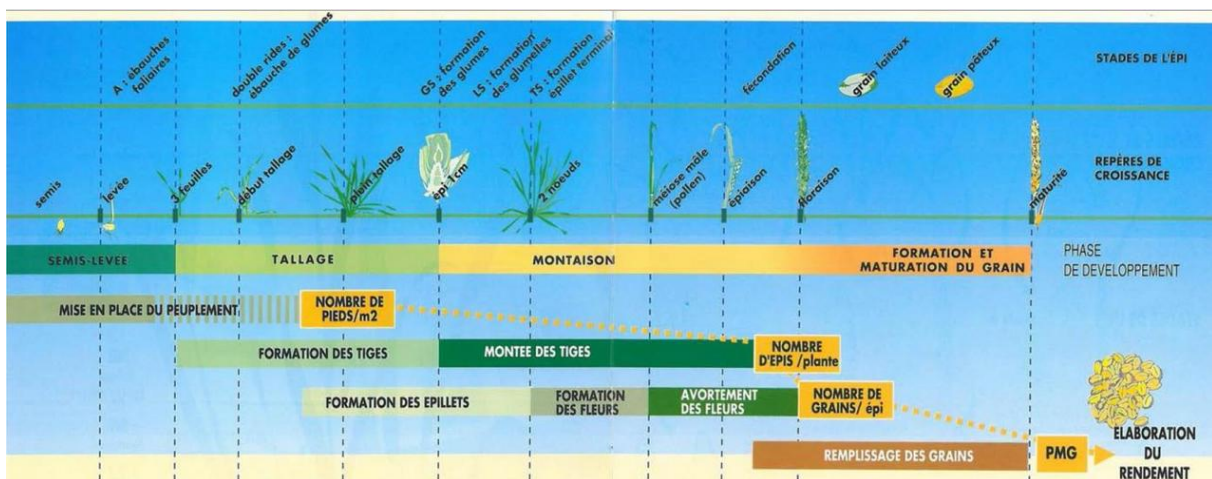


Figure 2 : Elaboration du rendement du blé en fonction des stades phénologiques (Deswarte, 2017)

L'établissement des différentes composantes de rendement et la teneur en protéines du grain à maturité dépendent étroitement du métabolisme carboné, de la nutrition azotée de la plante, de l'azote apporté et du fractionnement des apports. Constituant des protéines, l'azote est un composant essentiel de la matière vivante végétale. A l'exception de rares plantes (comme les Fabacées), les plantes ne peuvent pas absorber l'azote atmosphérique. Présent dans le sol sous forme organique (humus) ou sous forme minérale (ammonium NH_4^+ , nitrate NO_3^-), l'azote n'est disponible pour les plantes que très majoritairement sous sa forme minérale, i.e. : après minéralisation de la matière organique ou par apport de fertilisants azotés. Dans les sols agricoles pauvres en matière organique, l'azote disponible pour les cultures provient majoritairement des engrais azotés minéraux. L'azote non utilisé par les plantes peut être stocké dans les sols ou volatilisé ou entraîné par les eaux de pluie vers les rivières, les lacs, les eaux littorales ou les nappes d'eau souterraines (Merigout, 2006). La fertilisation azotée optimale est celle permettant de maximiser le rendement, et concernant le blé dur la teneur en protéines des grains, tout en limitant les différentes pertes d'azote dans l'environnement. Connaître le déterminisme des flux d'azote au sein du couvert blé dur est donc primordial pour effectuer une fertilisation azotée au plus proche des besoins de la plante.

En premier lieu, la dose totale prévisionnelle d'azote à apporter à la culture est déterminée en fonction des objectifs de rendement. Pour cela, un bilan azoté le plus complet doit être réalisé afin d'ajuster la fourniture en azote aux besoins de la plante pour atteindre les objectifs fixés (Figure 3). Les besoins en azote du blé dur varient entre 3.5 et 3.9 kg d'azote par quintal produit à 14 % de protéines et dépendent de la variété et du type de sol (Arvalis Institut du végétal, 2018b). En ce qui concerne les sources d'azote, elles comprennent les reliquats d'azote minéral en sortie d'hiver, l'azote qui va être issu de la minéralisation de la matière organique du sol et la dose d'azote qui sera apportée sous forme d'engrais.

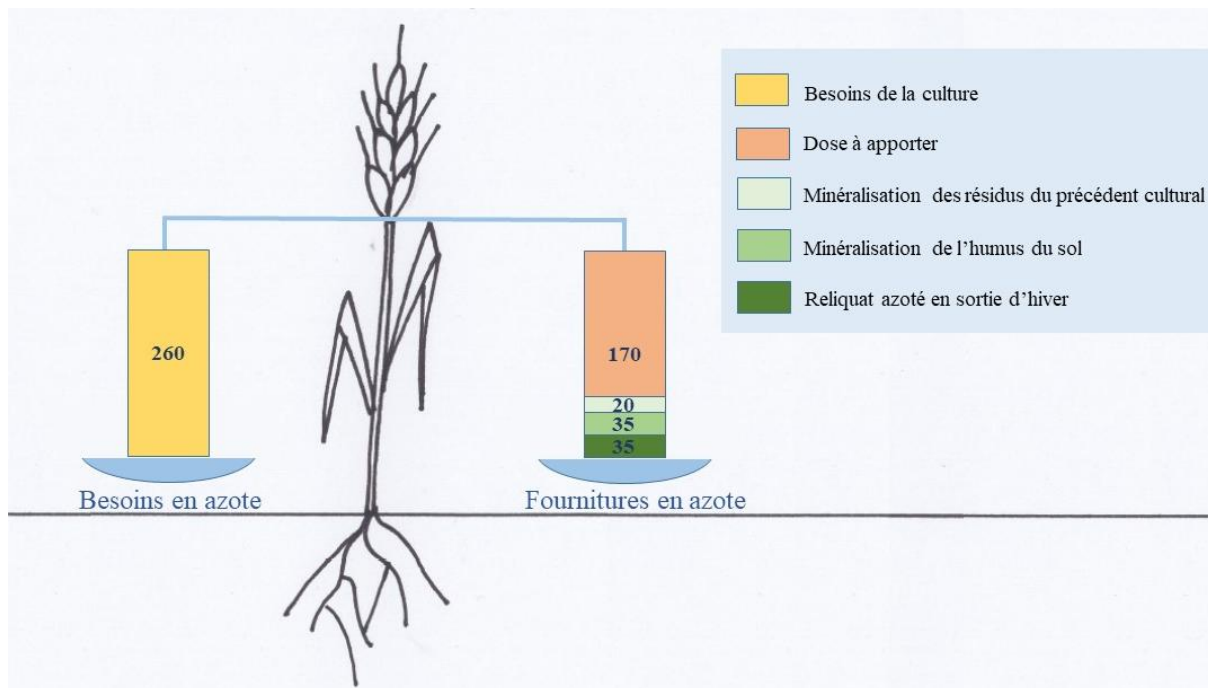


Figure 3 : Calcul d'un bilan azoté prévisionnel simplifié sur une parcelle de blé dur

Exemple sur une parcelle de blé dur en précédent colza en sol argilo-calcaire moyennement profond, avec un objectif de rendement de 70 q/ha

Après détermination de la dose totale prévisionnelle d'azote à apporter à la culture, il s'agit de positionner les apports en fonction des besoins de la plante. Ces derniers varient au cours du développement de la plante. Les processus majoritaires en jeu sont l'absorption, l'assimilation, et pour une partie la remobilisation de cet azote vers les grains (Figure 4). C'est au cours de la montaison (du stade épi 1 cm à épiaison) que les besoins de la plante sont les plus élevés et que la quantité d'azote absorbée par la plante est la plus importante. Avant montaison, au tallage, les besoins de la plante sont nettement plus modérés. Après la floraison, la remobilisation est majoritaire, l'absorption et l'assimilation d'azote issue du sol est d'environ 20 %. Aussi, 80 % de l'azote contenu dans le grain à maturité provient de l'azote absorbé avant floraison (Arvalis Institut du végétal, 2014). La quantité d'azote présente dans le grain à la récolte dépend donc majoritairement de la quantité d'azote absorbée avant la floraison. Toutefois, un apport d'azote post-floraison peut suffire à faire varier la teneur en protéines dans les grains de 0.5 % (Gate, 1995).

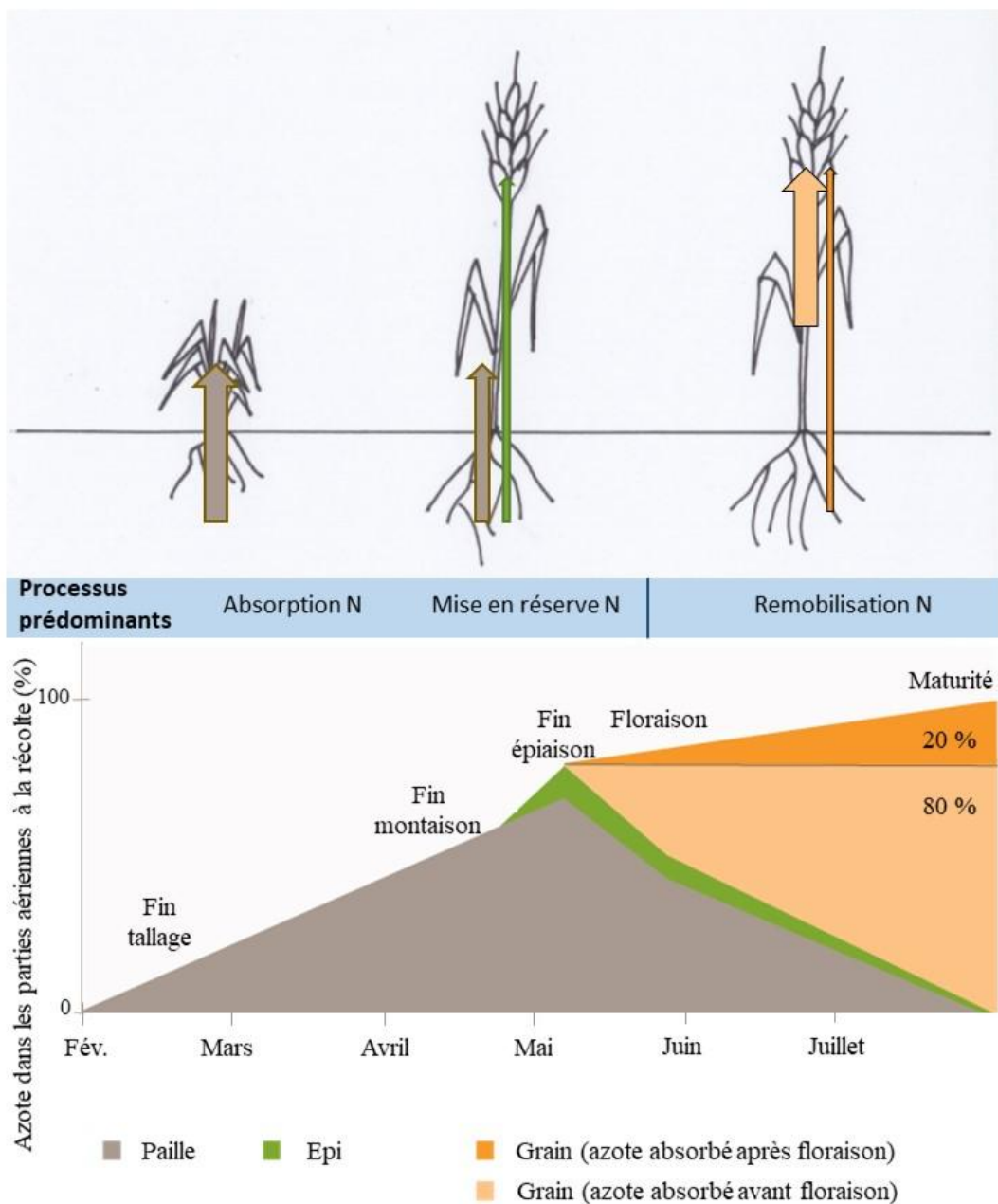


Figure 4 : Evolution des écarts entre la quantité d'azote absorbée et la quantité d'azote remobilisée par le blé

La dose totale apportée à la culture est fractionnée en plusieurs apports, sur la base de la courbe d'absorption de l'azote par le blé (Figure 5). Un premier apport au stade tallage permet d'éviter les carences avant le stade épi 1 cm. Un apport plus conséquent au stade épi 1 cm, au début de la montaison, constitue la fraction majeure de la dose d'azote totale à apporter. Enfin, un dernier apport au stade dernière feuille étalée est reconnu pour avoir un effet particulièrement important sur la teneur en protéines (Arvalis Institut du végétal, 2013b).

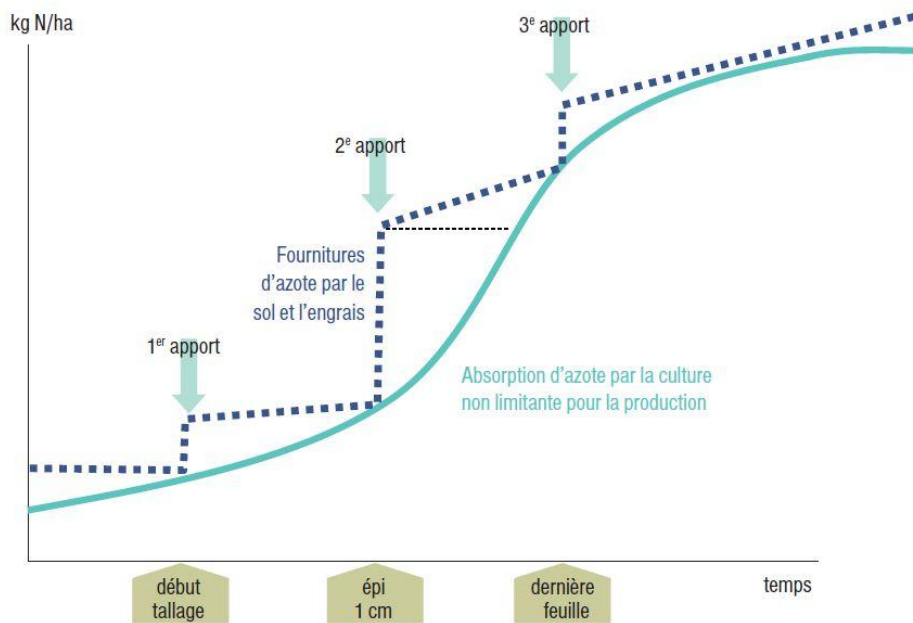


Figure 5 : Quantités d'azote absorbées par le blé au cours de son cycle en fonction des fournitures d'azote par le sol et l'engrais (Arvalis Institut du végétal, 2014)

La valorisation de l'azote apporté dépend de l'efficacité d'utilisation de l'azote par la plante définie dans l'Equation 2.

Équation 2 : Calcul de l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA)

$$EUA = \frac{\text{Rendement en grains}}{N \text{ apporté}}$$

Elle dépend en partie de l'efficacité d'absorption de l'azote par la plante et de l'efficacité de conversion de cet azote dans la plante. L'efficacité d'absorption de l'azote par la plante peut être maximisée en particulier par une meilleure exploration du sol par le système racinaire, une augmentation de la longueur spécifique des racines et la favorisation d'interactions avec les micro-organismes du sol. L'assimilation de l'azote dans la plante peut être optimisée en augmentant l'activité des enzymes des métabolismes de l'azote et des acides organiques (Forget et al., 2017).

L'EUA est fonction de plusieurs mécanismes que nous allons détailler :

- (i) Mécanismes d'absorption et d'assimilation de l'azote par la plante
- (ii) Remobilisation de l'azote et dynamique de sénescence
- (iii) Remplissage du grain

2.1.2 Absorption et assimilation de l'azote par la plante

L'absorption de l'azote du sol se fait presque exclusivement sous forme d'azote minéral : le nitrate (NO_3^-) et l'ammonium (NH_4^+) qui sont ensuite transformés en acides aminés (assimilation de l'azote). En agriculture, il est possible d'apporter de l'azote aux feuilles (nutrition foliaire) sous forme d'urée. Néanmoins, l'essentiel de l'alimentation en azote des plantes comme le blé provient de l'azote minéral du sol (Fageria et al., 2009; Owen and Jones, 2001). En sol bien aéré, humide et réchauffé, le nitrate est la principale source d'azote pour la plante, tandis que dans des sols acides, froids et asphyxiés (noyés), la nitrification est inhibée et l'ammonium est la principale source d'azote (Wirén et al., 2001) avec des concentrations 10 à 1000 fois plus élevées (Morot-Gaudry et al., 2006). Au printemps sous nos latitudes, l'azote est absorbé principalement par la plante sous forme de nitrate (Chaillou, 2015).

Le prélèvement de l'azote minéral (NO_3^- et NH_4^+) par la racine commence par l'absorption de ces ions par les cellules racinaires. En effet, dans les parties matures de la racine, l'endoderme qui constitue une barrière apoplastique oblige les ions en transit vers le xylème à une étape symplastique (Grignon et al., 2001). L'entrée de NO_3^- dans une cellule est un processus actif qui nécessite de l'énergie car les forces électriques s'opposent très fortement à cette entrée en raison du potentiel cytosolique négatif d'environ -120 mV. L'entrée de l'ammonium (cation) est le plus souvent passive, ne nécessitant pas d'énergie (Chaillou and Lamaze, 2001). Outre les aspects énergétiques, pour rentrer dans une cellule, les ions doivent traverser une bicouche lipidique imperméable, celle du plasmalemme. Les transporteurs de NO_3^- et NH_4^+ , protéines membranaires, vont permettre cette traversée. Pour le nitrate, un co-transport de type symport va faire entrer un NO_3^- avec 2H^+ qui énergisent le processus. Dans le cas de NH_4^+ , celui-ci empruntera le plus souvent (transport passif) des canaux (uniport). Ils existent de nombreux transporteurs différents. Sans rentrer dans les détails qui ne sont pas l'objet de cette thèse, on distingue les transports aux faibles et fortes concentrations (Figure 6). A faible concentration, les transporteurs sont qualifiés de « haute affinité » pour leur substrat mais ils saturent pour de faibles vitesses (« faible capacité »). Inversement, les transporteurs qui travaillent aux fortes concentrations (« faible affinité ») peuvent générer des influx très intenses (« forte capacité »). La transition entre les deux mécanismes (« double mécanisme d'Epstein » qui est d'ailleurs universelle pour tous les ions majeurs, Grignon et al., 2001) se produit pour une concentration d'environ 0.5 mM. Après avoir pénétré le symplasma, les ions vont migrer radialement vers les vaisseaux du xylème

pour gagner les parties aériennes. Au cours de cette migration, certains ions peuvent être stockés dans les vacuoles de la racine ou être métabolisés en acides aminés puis transformés en divers composés azotés dans cet organe. Les ions NH_4^+ sont principalement assimilés dans les racines. Les ions NO_3^- , chez les ligneux sont aussi assimilés en majorité dans les racines alors que chez les herbacées, ce sont les feuilles qui constituent le site principal de l'assimilation.

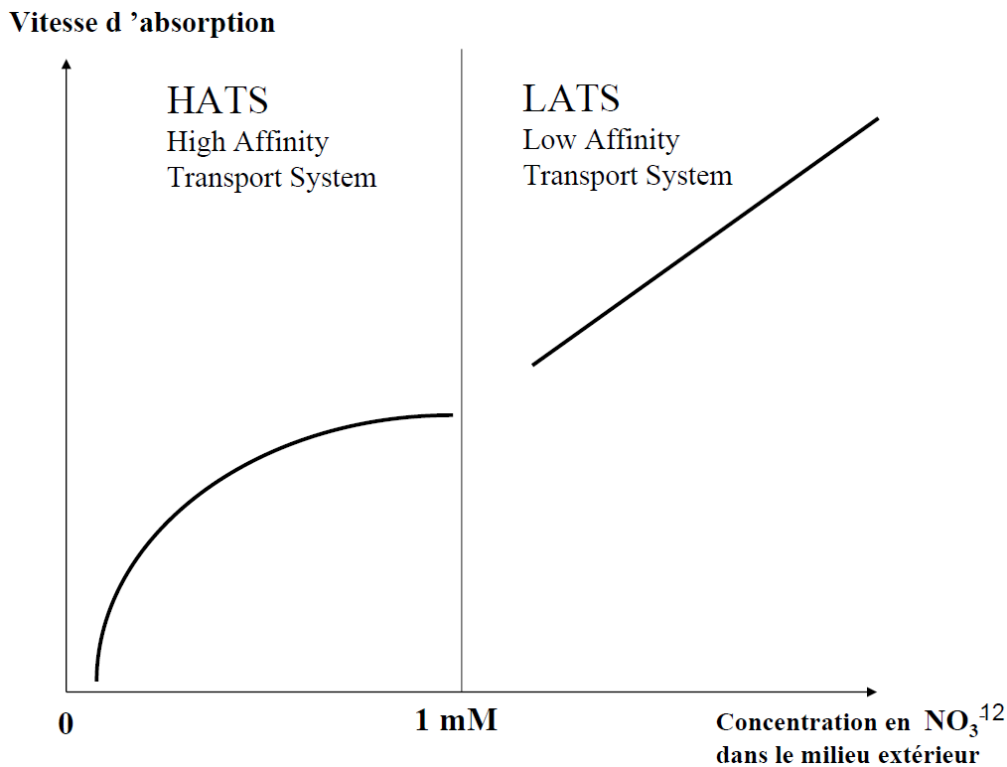


Figure 6 : Cinétique d'absorption de NO_3^- par les transporteurs HATS et LATS (Chaillou, 2015)

Outre les aspects moléculaires touchant aux protéines de transport, les propriétés d'absorption et de transport ainsi que la capacité d'approvisionnement de la plante en azote sont aussi influencés par la surface d'échange entre le système racinaire et le sol. La structure et l'architecture du système racinaire jouent donc un rôle important. En effet, la ramification de la racine principale par la formation de racines secondaires augmente la surface d'échange. Le fonctionnement des systèmes d'absorption du nitrate et de l'ammonium sont modulés par la disponibilité du substrat azoté mais aussi par le statut nutritionnel de la plante. (Morot-Gaudry et al., 2006). L'absorption est régulée négativement par les produits d'assimilation comme les acides aminés, notamment la glutamine (Bertheloot, 2009).

L'assimilation de NO_3^- par la plante s'effectue en plusieurs étapes (Lea and Morot-Gaudry, 2001), catalysées par des enzymes clés (Figure 7) :

- 1) Réduction du NO_3^- en NO_2^- , catalysée par la Nitrate Reductase (NR).
- 2) Réduction du NO_2^- en NH_3 , catalysée par la Nitrite Reductase (NiR)
- 3) Incorporation de NH_3 à un squelette carboné, catalysée par les enzymes glutamine-synthétases (GS) et glutamate-synthase (GOGAT) pour former les acides aminés glutamine (Gln) et glutamate (Glu). D'autres acides aminés sont ensuite formés à partir de Gln et Glu par les transaminases. Les acides aminés formés servent à la biosynthèse des protéines, sont stockés dans la vacuole, sont transportés vers d'autres tissus ou sont transformés en autres molécules azotées. L'ammonium, forme déjà réduite de l'azote est directement pris en charge par la voie GS-GOGAT. Dans les feuilles, la NR est cytosolique mais la NiR, la GS et la GS-GOGAT ainsi que les transaminases sont chloroplastiques, ce qui montre la relation étroite entre les métabolismes de l'azote et du carbone.

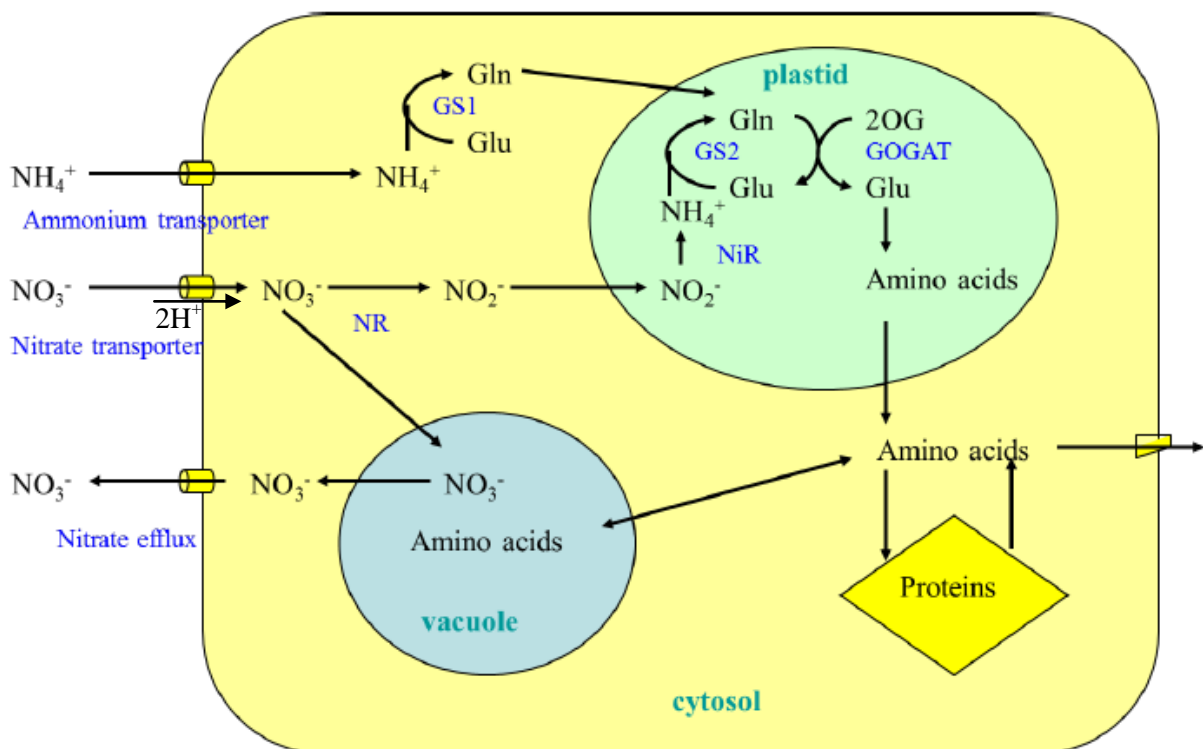


Figure 7 : Schéma d'absorption et d'assimilation de l'azote sous forme nitrique ou ammoniacale par la plante (Ohyama et al., 2013)

2.1.3 Stockage de l'azote, remobilisation et dynamique de sénescence

Les éléments C, O et H, les trois éléments les plus abondants de la matière organique des êtres vivants constituent plus de 90 % de cette dernière. Ils sont apportés par la photosynthèse. Le quatrième élément est N. La nutrition azotée par son importance arrive donc en seconde position. L'azote est un constituant fondamental des acides aminés (libres ou non) et donc des protéines (enzymatiques, structures ou réserves), des nucléotides (ATP, NAD(P), ADN, ARN, etc.) et de nombreux lipides membranaires. L'importance de l'azote est considérable et la disponibilité de ce dernier dans la biosphère en fait le deuxième facteur limitant de la productivité après l'eau qui détermine la transpiration, donc l'ouverture des stomates et donc la diffusion du CO₂ et la photosynthèse. L'appareil photosynthétique représente un investissement majeur en azote pour la plante. Outre les chlorophylles et les protéines des photosystèmes qui les portent (protéines CAB), outre les protéines de la chaîne photosynthétique des thylakoides, outre les nucléotides véhiculant énergie chimique et pouvoir réducteur (ATP, NADPH), outre les protéines enzymatiques de la phase biochimique d'assimilation du CO₂ en triose-P, la Rubisco (qui est responsable de la fixation primaire du CO₂) représente souvent environ un tiers de l'azote total de la feuille. On peut donc comprendre l'interdépendance des métabolismes du C et du N, et l'intérêt des agro-physiologistes pour les relations carbone – azote, objet de ma thèse.

Après la fin de la croissance des organes, le contenu en azote des tissus reste constant. L'azote contenu dans les protéines et de nombreux composés azotés sont soumis à un turnover permanent (Gallais et al., 2006; Millard, 1988), entre synthèse et dégradation. Les protéines des organes des plantes entrant en sénescence sont majoritairement dégradées et leur azote est remobilisé vers les organes en croissance (feuilles les plus jeunes au cours de la croissance végétative ou grains à partir du stade floraison; Pornon et al., 2011). Ainsi, dans le blé dur la quantité d'azote remobilisée vers le grain est très dépendante de la quantité d'azote stockée avant floraison (Bly and Woodard, 2003; Gooding and Davies, 1992; Palta and Fillery, 1995). Gaju et al. (2014) ont montré que les variations de rendement et de teneur en azote du grain étaient d'avantage influencées par l'accumulation d'azote avant floraison que par la remobilisation, qui reste un processus très constant. En revanche, 80 à 90 % du carbone contenu dans le grain à maturité est issu de l'activité photosynthétique post-floraison (Gate, 1995). En cas de stress azoté, la remobilisation constitue un facteur déterminant de variation

de la teneur en azote dans le grain mais pas du rendement (Gaju et al., 2014). En effet, l'épi devient le puit d'azote prioritaire au détriment des feuilles et des tiges (Pask et al., 2012).

La remobilisation de l'azote vers le grain a été étudiée pour chaque compartiment de la plante pour déterminer l'efficacité de remobilisation de l'azote (NRE : N-remobilization efficiency), explicitée dans l'Equation 3 et dont les valeurs sont présentées dans le Tableau 1.

Équation 3 : Calcul de l'efficacité de remobilisation de l'azote (NRE)

$$NRE_{compartiment} = \frac{\text{Quantité d'azote remobilisé vers le grain}}{\text{Quantité totale d'azote dans le compartiment à floraison}}$$

Tableau 1 : Efficacité de remobilisation de l'azote par compartiment chez le blé

NRE feuilles	0,75		(Sun et al., 1996)
NRE tige	0,43		
NRE racines	0,47		
NRE feuilles	0,76		(Kichey et al., 2007)
NRE tige	0,73		
NRE pailles	0,73		
NRE feuilles	0,76 <small>ferti standard</small>	0,73 <small>contrainte N</small>	(Pask et al., 2012)
NRE gaines foliaires	0,61 <small>ferti standard</small>	0,56 <small>contrainte N</small>	
NRE pailles	0,56 <small>ferti standard</small>	0,63 <small>contrainte N</small>	
NRE tige	0,48 <small>ferti standard</small>	0,47 <small>contrainte N</small>	

Gate (1995) reporte la contribution de chacun de ces compartiments à la remobilisation totale. Les feuilles contribuent pour 40 % à la remobilisation (Figure 8). Ce sont les feuilles les plus jeunes qui remobilisent le plus, avec une contribution de la feuille drapeau de 24 %. La contribution des glumes peut égaler celle de la feuille drapeau. Ce dernier compartiment joue donc un rôle privilégié, d'autant qu'il s'agirait d'un site d'interconversion et de synthèse d'acides aminés pour la formation de protéines du grain (Donovan and Lee, 1978).

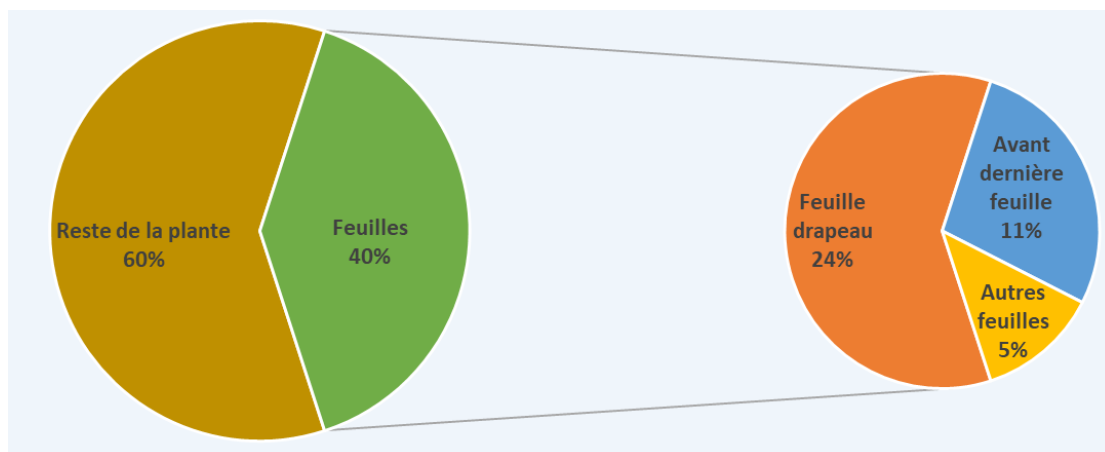


Figure 8 : Contribution des différents compartiments de la plante à la remobilisation totale de l'azote vers les grains

Le contrôle génétique de la remobilisation serait lié à la régulation de la sénescence foliaire (Masclaux et al., 2001; Uauy et al., 2006). En effet, dans leurs travaux sur la compartimentation et la remobilisation de l'azote en lien avec la sénescence de la feuille drapeau, Gaju et al. (2014) ont mis en évidence l'existence d'une relation négative entre la quantité d'azote de la feuille drapeau remobilisée et la durée de la sénescence. Par ailleurs, la régulation de la sénescence foliaire aurait également un impact sur le remplissage du grain. Ainsi, Spano et al. (2003) ont montré que des mutants de blé dur présentant un retard de sénescence (caractère "stay-green") avaient une durée d'activité photosynthétique plus longue et un rendement en grain plus élevé que la lignée parentale.

2.1.4 Accumulation de protéines au cours du remplissage du grain

Un grain de blé à maturité est constitué de 65 à 75 % de glucides (amidon et fibres), de 8 à 17 % de protéines, de 2 à 6 % de lipides, de 12 à 14 % d'eau, et de micronutriments (Kent, 1994; Pomeranz, 1988). Le développement du grain a lieu en plusieurs étapes (Olsen, 2001; Simoes Larraz Ferreira, 2011) détaillées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Phases de développement du grain de blé

1) Phase syncytiale de 0 à 4 jours après floraison	Division cellulaire sans formation de paroi cellulaire
2) Division cellulaire / Embryogénèse de 4 à 18 jours après floraison	Multiplication cellulaire et formation des parois cellulaires
3) Accumulation / Remplissage de 18 à 36 jours après floraison	Déposition linéaire de matière sèche
4) Dessiccation / Maturation de 36 à 58 jours après floraison	Arrêt d'accumulation de matière sèche et diminution de la teneur en eau du grain

A la fin de l'étape de division cellulaire, le grain est au stade de développement grain laiteux avec une teneur en eau de 60 %. A la fin de l'étape de remplissage du grain qui consiste en l'accumulation des grains d'amidon et des protéines dans les cellules de l'albumen, le grain est au stade grain pâteux avec une teneur en eau de 40 à 45 %. A ce stade, lorsque la teneur en eau du grain atteint 45 %, l'accumulation de matière sèche s'arrête, et ceci indépendamment des conditions de culture et de fertilisation azotée (Ferrise et al., 2015).

Les protéines du grain sont divisées en quatre groupes principaux, d'après la classification de Osborne (1907) :

- les albumines, solubles dans l'eau
- les globulines, solubles dans une solution saline
- les gliadines, solubles dans une solution d'ethyl alcool à 70 %
- les gluténines, solubles dans une solution acide ou basique

Les gliadines et les gluténines, regroupées sous le terme de prolamines, sont les protéines de stockage majeur et constituent 70 à 80 % du total des protéines. Les albumines et les globulines représentent 15 à 20 % des protéines totales et jouent un rôle important dans le métabolisme du grain (Simoes Larraz Ferreira, 2011). L'ordre d'accumulation de ces protéines est asynchrone et la composition protéique du grain varie donc au cours de son développement (Triboï et al., 2003). A maturité, les variations de composition protéique du grain sont principalement dues à des différences de quantité d'azote total accumulé pendant le remplissage du grain.

La composition protéique impacte la qualité du grain. En effet, les gliadines et les gluténines, regroupées par le terme de prolamines, sont impliquées dans la qualité technologique des farines (Costa et al., 2013). Elles constituent les protéines de stockage majoritaires et confèrent à la pâte viscosité et extensibilité pour les gliadines (Song and Zheng, 2008; Wieser, 2007), cohésion et élasticité pour les gluténines (Wieser, 2007). Les propriétés rhéologiques des grains dépendent de l'équilibre entre gliadines et gluténines (Song and Zheng, 2008).

2.2 Biostimulants

2.2.1 Généralités sur les biostimulants

Définition

D'après du Jardin (2015), le terme de biostimulant aurait été inventé par des spécialistes de l'horticulture pour décrire des substances améliorant la croissance des plantes sans constituer un apport de nutriments, d'amendements ou de produits phytosanitaires. Depuis, l'industrie joue un rôle clé dans la définition et la promotion des biostimulants. Des sociétés se sont regroupées pour créer des associations comme le Conseil Européen de l'Industrie des Biostimulants (European Biostimulants Industry Council : EBIC) en Europe ou la Coalition des Biostimulants (Biostimulant Coalition) aux Etats-Unis. Plusieurs définitions ont été proposées, avec pour suggestion de l'EBIC de se baser sur les revendications et effets associés aux biostimulants plutôt que sur l'origine des produits (Faessel et al., 2014). Ainsi, la définition des biostimulants a évolué et a été remaniée à plusieurs reprises (Figure 9).

Les biostimulants regroupent des produits de nombreuses origines. Ils contiennent souvent de multiples composés qui peuvent être des hormones végétales, des composés semblables aux hormones, des acides aminés, des bétaines, des peptides, des protéines, des sucres (carbohydrates, oligo- et polysaccharides), des aminopolysaccharides, des lipides, des vitamines, des nucléotides ou des nucléosides, des substances humiques, des composés phénoliques, des stérols, etc (Yakhin et al., 2017a). Bien que de compositions diverses, sept catégories de biostimulants ont été identifiées : les acides humiques et fulviques, les hydrolysats de protéines et autres composés contenant de l'azote, les extraits d'algues et de plantes, les chitosanes et autres biopolymères, les composés inorganiques, les champignons bénéfiques, et les bactéries bénéfiques (du Jardin, 2015).

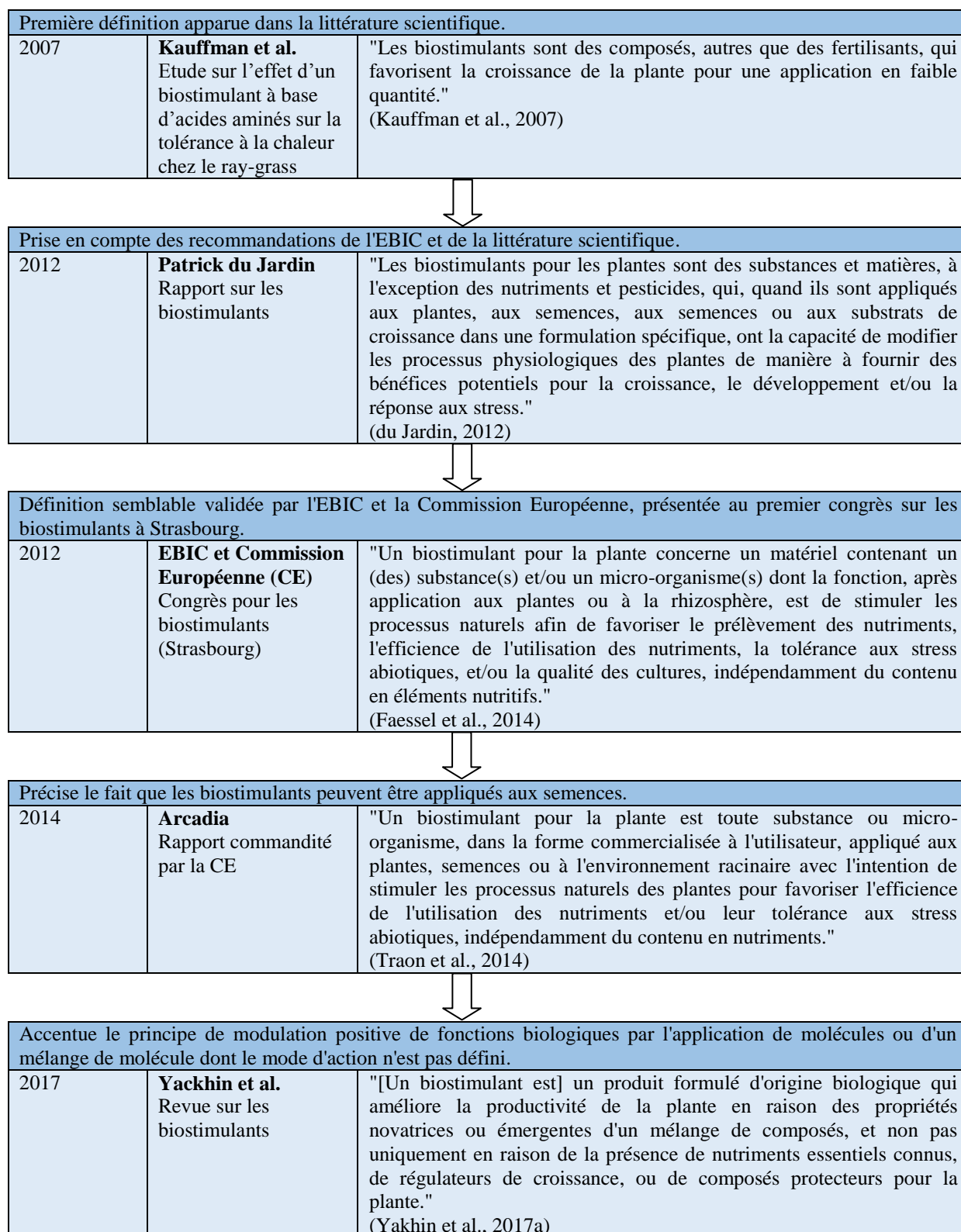


Figure 9 : Evolution de la définition des biostimulants

Réglementation

Malgré les travaux menés récemment pour définir le statut réglementaire des biostimulants, il n'existe actuellement pas de définition légale ou réglementaire au niveau mondial. En Europe, ils sont soumis à des réglementations au niveau national et peuvent avoir des noms différents en fonction du pays, ce qui ne favorise pas le développement et les échanges des biostimulants. Dans certains états membres, ils sont soumis au règlement EC No 1107/2009 concernant les produits de protection des plantes, tandis qu'ils dépendent dans d'autres états membres de la réglementation nationale (Torre et al., 2015). En France, ils entrent dans la catégorie des Matières Fertilisantes et Supports de Culture (MFSC) et sont définis dans l'ordonnance n°2015-615 du Code rural et de la pêche maritime comme des « matières dont la fonction, une fois appliquées au sol ou sur la plante, est de stimuler des processus naturels des plantes ou du sol, afin de faciliter ou de réguler l'absorption par celles-ci des éléments nutritifs ou d'améliorer leur résistance aux stress abiotiques ». L'homologation des produits est attribuée par le Ministère de l'agriculture, de l'alimentation et de la forêt après validation par l'Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). Le dossier d'homologation doit contenir des informations concernant l'efficacité du produit et sa sûreté dans les conditions normales d'utilisation, l'identité de la substance, le mode d'utilisation du produit, des données de toxicité et d'étiquetage.

Les difficultés d'homogénéisation de la réglementation sont dues en grande partie à l'hétérogénéité de ces substances. Cette situation génère de l'incertitude pour les opérateurs, autorités de contrôle et entités en charge de la certification de ces produits, limitant ainsi leur développement (Torre et al., 2015). En effet, il existe un réel besoin de définir un cadre réglementaire unique pour les biostimulants afin d'assurer que ces produits ne présentent pas de danger pour la santé et l'environnement, qu'ils ont un effet positif sur la productivité des cultures et qu'ils se distinguent des autres catégories de produits. La diversité des origines des biostimulants complexifie cette tâche car elle ne permet pas de déterminer des modes de fonctionnement, de production, d'inscription ou d'utilisation communs. Dans leur revue sur les biostimulants, Yakhin et al. (2017) suggèrent qu'en acceptant le fait qu'un biostimulant est un produit à effet bénéfique mais dont le mode d'action n'est pas connu, alors il pourrait être réglementé en se basant uniquement sur la preuve de son efficacité et de son innocuité. Une homogénéisation des législations pratiquées actuellement au niveau national est donc

nécessaire pour clarifier le positionnement des biostimulants et les échanges sur le marché européen ou mondial.

Marché

Malgré le contexte réglementaire, le marché des biostimulants est en expansion (Figure 10). Evalué à 2000 millions de dollars américains en 2017, il est estimé à 3290 millions en 2022, avec un taux de croissance annuel de 10% (Biostimulant Market, 2017; Traon et al., 2014). En Europe, il est projeté à 800 millions d'euros en 2018, avec un taux de croissance annuel similaire (Traon et al., 2014). La France, l'Italie et l'Espagne sont les premiers producteurs de biostimulants de l'Union Européenne (Traon et al., 2014).

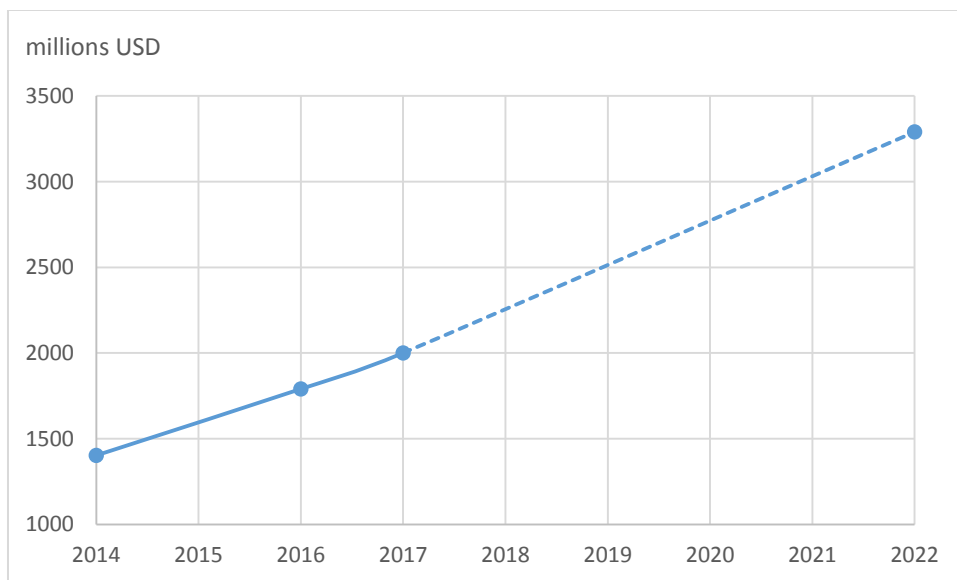


Figure 10 : Evolution du marché mondial des biostimulants (Biostimulant Market, 2017; Traon et al., 2014)

Efficacité

Les biostimulants ont des effets bénéfiques à différentes échelles du fonctionnement de la plante : ils augmentent le développement du système racinaire et la croissance des parties aériennes, l'absorption d'eau et de nutriments, la résistance aux stress abiotiques, ainsi que l'efficacité d'utilisation des fertilisants (Vernieri et al., 2006). Bien que de nombreux essais au champ montrent les bénéfices de divers biostimulants sur la croissance (Calvo et al., 2014; Saa Silva et al., 2013), les réponses sont variables en fonction des espèces sur lesquels les produits sont testés, des conditions environnementales et du niveau de compréhension du fonctionnement des produits (Brown and Saa, 2015). Les études montrent que des

applications foliaire ou racinaire peuvent avoir des effets différents sur la culture. Le mode d'application peut donc être une source supplémentaire de variabilité (Crouch and Staden, 1992; Hernández-Herrera et al., 2014). Les doses appliquées impactent aussi la variabilité d'efficacité des biostimulants (Ertani et al., 2014; Morales-Payan and Santos, 1997; Sivasankari et al., 2006). Plusieurs travaux montrent qu'une dose excessive peut conduire à une non-réponse ou à une réponse négative des plantes (Asli and M. Neumann, 2010; Calvo et al., 2014; Kirn et al., 2010).

Des approches moléculaires ont permis des avancées dans la compréhension des mécanismes de fonctionnement de plusieurs biostimulants commercialisés (Billard et al., 2014; Cassan et al., 1992; Jannin et al., 2013; Polo and Mata, 2018; Sharma et al., 2012, 2014; Stamatiadis et al., 2015; Wally et al., 2013). Les résultats de ces études suggèrent que les biostimulants contiennent des métabolites impliqués dans la perception du stress et qu'ils permettent une meilleure résistance aux stress biotiques et abiotiques (Brown and Saa, 2015). Cela permettrait de diminuer les effets de stress sur la croissance. Toutefois, même si de nombreuses recherches se concentrent sur l'efficacité des biostimulants en condition de stress, d'autres études montrent une stimulation de la croissance par les biostimulants dans des conditions non stressantes (Calvo et al., 2014; Saa Silva et al., 2013). A l'heure actuelle, les études menées ne permettent pas d'établir si le mode d'action des biostimulants en conditions stressantes ou non stressantes est différent.

Mécanismes d'action

Déterminer les mécanismes d'action des biostimulants est rendu difficile par le fait que la plupart de ces produits contiennent, naturellement ou par ajout, des micronutriments, sucres, acides aminés et autres composés qui peuvent avoir un effet synergique, complémentaire ou pas d'effet. Différencier l'effet de ou du composé(s) actif(s) parmi les composants de base du produit ou les additifs est souvent très compliqué (Brown and Saa, 2015). Ainsi, le mode d'action de la majorité des biostimulants est peu ou pas compris. Il est variablement attribué à la présence d'hormones dans leur composition, de molécules de signalisation ou de molécules facilitant le transport et/ou l'efficacité d'utilisation des nutriments minéraux (Calvo et al., 2014; Saa Silva et al., 2013).

Dans leur étude globale sur les biostimulants, Yakhin et al. (2017) précisent qu'au vu de la difficulté à déterminer le mode d'action d'un biostimulant, et de la nécessité de légitimer le marché des biostimulants, la recherche sur les biostimulants devrait porter essentiellement sur la preuve de leur efficacité et de leur sûreté, et sur les grandes lignes de leurs modes d'action, plutôt que la détermination des mécanismes spécifiques mis en jeu.

2.2.2 Effets des biostimulants d'origine algale

L'application d'algues comme source de matière organique est ancienne en agriculture, mais leurs effets biostimulants n'ont été reportés que récemment. Des produits à base d'extraits d'algues ou de composés purifiés d'extraits d'algues (polysaccharides, laminarines, alginates, carraghénane et sous-produits) sont depuis destinés à un usage commercial en tant que biostimulants. Parmi les composants issus d'extraits d'algues, des micro et macronutriments, des steroles, des hormones et des bêtaïnes peuvent contribuer à stimuler la croissance (Craigie, 2011a). La plupart des espèces d'algues utilisées appartiennent à la catégorie des algues brunes. C'est le cas des algues *Ascophyllum nodosum*, *Fucus* et *Laminaria* qui sont parmi les plus couramment utilisées (Khan et al., 2009). Les biostimulants à base d'algues peuvent être appliqués au sol, en solution hydroponique ou en pulvérisation foliaire.

De nombreuses études s'intéressent au rôle des biostimulants à base d'algues, notamment *Ascophyllum nodosum* (Calvo et al., 2014; Craigie, 2011a; Khan et al., 2009; Sharma et al., 2014). Les principaux effets reportés dans la littérature pour les extraits d'algues sont présentés dans le Tableau 3.

Les études menées sur des extraits d'algues ont montré que leur application pouvait améliorer la croissance de la vigne, du fraisier, de l'épinard, d'*Arabidopsis thaliana* ou du colza (Cassan et al., 1992; Jannin, 2012; Mancuso et al., 2006; Rayorath et al., 2008; Roussos et al., 2009). Pour la vigne, il a été montré que l'application d'extraits d'algues conjointement à un apport de fertilisants foliaire améliore la capacité à absorber des macronutriments (N, P, K) au niveau foliaire. De plus, l'application d'extraits d'algues améliore la résistance au stress hydrique en maintenant un potentiel hydrique foliaire et une conductance stomatique plus élevés que chez les plantes non traitées (Mancuso et al., 2006). Ces effets pourraient être dus à la présence de composés protecteurs dans les extraits d'algues, comme des antioxydants et des régulateurs de l'expression de gènes de réponses au stress (Calvo et al., 2014). Chez

Arabidopsis thaliana, il a été reporté une augmentation de la longueur racinaire et de l'activité de la nitrate reductase avec l'application d'extraits d'algues (Durand et al., 2003; Rayorath et al., 2008). Les travaux de (Jannin et al., 2013) ont également montré un effet positif sur l'absorption d'azote.

Plusieurs études ont décrit leurs effets sur le fonctionnement des sols et des plantes (Craigie et al., 2008; Craigie, 2011a; Khan et al., 2009). Dans les sols, le contenu en polysaccharides des algues améliore l'aération et la capacité de rétention d'eau. La présence de composés polyanioniques favorise la fixation et les échanges de cations. Aussi, des effets positifs sur l'activation de la microflore du sol ont été reportés. Dans les plantes, une amélioration de l'approvisionnement en micro et en macronutriments indique un effet sur l'efficacité d'utilisation des produits fertilisants. Dans son rapport sur l'utilisation d'extraits d'algues en agriculture, J. S. Craigie (2011) attribue aux composés hormonoïdes présents dans les extraits d'algues (cytokinine, l'auxine, l'acide gibbérelle et absissique) des effets sur la germination, la croissance et le développement de la plante. Dans une étude menée sur *Arabidopsis*, (Wally et al., 2013) montre que l'application d'un biostimulant à base d'extrait d'algue *Ascophyllum nodosum* module les voies de biosynthèse de phytohormones de la plante.

2.2.3 Effets des biostimulants d'origine fongique

Les espèces de champignon du genre *Trichoderma* sont connues pour contribuer à la lutte contre les maladies des plantes depuis plus de 70 ans (Weindling, 1932). Ces dernières décennies marquent les débuts de leur commercialisation et de leur utilisation en agriculture (Harman, 2000). Bien que plus couramment étudiées en tant que biopesticides (Brotman et al., 2008; López-Bucio et al., 2015; Mukherjee et al., 2013; Nicolás et al., 2014), les produits à base d'extraits de champignons reçoivent une attention croissante en tant que biostimulants. Les substances bioactives libérées par le champignon *Trichoderma* peuvent fournir des nutriments aux plantes hôtes (Behie and Bidochka, 2014). L'application de *Trichoderma* à des cultures maraichères améliorerait la résistance au stress abiotique (Shoresh et al., 2010), l'efficacité d'utilisation de l'azote et la croissance (Colla et al., 2015c). Les métabolites issus de *Trichoderma* amélioreraient également l'efficacité d'utilisation de l'eau et des nutriments, le rendement et la croissance (López-Bucio et al., 2015). Les mécanismes de phytostimulation demeurent en grande partie méconnus (Pelagio-Flores et al., 2017). Dans leurs travaux, (Ming

et al., 2013) montrent que des éliciteurs peuvent être utilisés pour stimuler la production de métabolites secondaires chez les plantes traitées.

La grande majorité des produits à base de *Trichoderma* concernent une inoculation du champignon à la culture traitée. La plupart des formulations commercialisées sont sous forme de poudres contenant une concentration donnée de spores fongiques à mélanger à de l'eau (Woo et al., 2014). Dans ce cas, le champignon est viable et se développe à proximité de la culture bénéficiant de ses effets biopesticides ou biostimulants (López-Bucio et al., 2015). Dans le cas de produits à base de protéines extraites de *Trichoderma*, leur utilisation et leurs effets sont peu documentés. D'autant que la nature des protéines dépend de l'espèce de *Trichoderma* étudiée parmi plus de 200 espèces définies (Atanasova et al., 2013; Hermosa et al., 2012). Certaines espèces sont pourtant connues pour leurs capacités à produire des cellulases : *Trichoderma reesei*, *Trichoderma subeffusum*, *Trichoderma luteffusum*, *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma phellinicola*, *Trichoderma sulphurea* et *Trichoderma longibranchiatum* (Jaklitsch, 2011; Xie et al., 2014). Les principaux effets reportés dans la littérature pour les biostimulants à base d'extraits protéiques de *Trichoderma* sont présentés dans le Tableau 4.

2.2.4 Effets des biostimulants à base d'acides aminés

Les biostimulants à base d'acides aminés entrent dans la catégorie des hydrolysats de protéines, définis par (Schaafsma, 2009) comme des mixtures de polypeptides, oligopeptides et acides aminés produits à partir de sources protéiques par des traitements d'hydrolyses partielles. Les acides aminés majoritaires contenus dans deux préparations commerciales sont l'alanine, l'arginine, la glycine, la proline, le glutamate, la glutamine, la valine et la leucine (Ertani et al., 2009; García-Martínez et al., 2010; Parrado et al., 2008)

Les acides aminés extraits de plantes sont reconnus pour : i) avoir un effet positif sur la germination, la productivité et la qualité de nombreuses cultures, ii) stimuler les métabolismes de l'azote et du carbone et augmenter l'efficacité d'utilisation des nutriments par la plante, iii) diminuer les effets négatifs dus aux stress abiotiques (Colla et al., 2017b). Des effets chélatants sont également attribués à certains acides aminés, notamment la proline, ce qui protégerait la plante des métaux lourds et contribuerait à l'acquisition et au transport de micronutriments. En effet, plusieurs études ont montrés leurs effets positifs sur l'efficacité d'absorption d'utilisation des micro et des macro-nutriments, en application foliaire ou

racinaire (Colla et al., 2015a; du Jardin, 2015; Nardi et al., 2016), l'application foliaire étant prédominante (du Jardin, 2012). De plus, les hydrolysats de protéines sont reconnus pour améliorer l'activité microbienne et la respiration du sol (du Jardin, 2015). Ils jouent un rôle biostimulant en agissant sur les procédés moléculaires et physiologiques de la plante en lien avec la croissance, le rendement et la résistance aux stress abiotiques (Calvo et al., 2014; Yakhin et al., 2017a). Les principaux effets reportés dans la littérature pour les biostimulants à base d'acides aminés sont présentés dans le Tableau 5.

Dans la plante, les acides aminés représentent un des modes de transport principal d'azote organique. Ils peuvent être utilisés directement pour la synthèse de protéines et d'autres composés azotés ou métabolisés (Rentsch et al., 2007). Ils peuvent aussi jouer un rôle de signalisation et induire des modifications morpho-physiologiques et biochimiques chez la plante en se fixant à des récepteurs spécifiques des membranes cellulaires (Ryan et al., 2002), en stimulant par exemple la synthèse d'hormones végétales par la plante. Les voies d'assimilation de l'azote (réduction du nitrate, conversion ammonium en amine) peuvent aussi être stimulées (du Jardin, 2012).

Tableau 3 : Principaux effets reportés dans la littérature pour les extraits algaux

Culture	Mode de culture	Application	Traitement	Effets physiologiques constatés	Références
Arabidopsis thaliana	Chambre de culture	Racinaire	Extrait d'algue <i>A. nodosum</i>	+ concentration cytokinines (CKs), acide absissique (ABA) + surexpression gènes impliqués dans synthèse CKs + sous-expression gènes impliqués dans catabolisme CKs	(Wally et al., 2013)
	Chambre de culture Serre		Extrait d'algue <i>A. nodosum</i>	+ biomasse racinaire + longueur racines réponse auxinique suite au traitement par l'extrait d'algues	(Rayorath et al., 2008)
	Serre	Foliaire	Extrait d'algue <i>A. nodosum</i>	+ biomasse racinaire + développement racines latérales + teneur en nitrate racines	(Merigout, 2006)
	Chambre de culture		Extrait d'algue <i>A. nodosum</i>	+ activité cytokinine-like dans feuilles et racines	(Khan et al., 2009, 2011)
	Chambre de culture		Cytokinines	+ division chloroplastes => + nombre chloroplastes/cellules	(Okazaki et al., 2009)
	Chambre de culture	Racinaire	Extrait d'algues N-PRO	+ activité nitrate reductase	(Durand et al., 2003)
	Blé dur	Serre	Foliaire	Extrait d'algues <i>A. nodosum</i> AZAL 5	+ absorption K + rendement en grains
Blé tendre	Champ	Foliaire et racinaire	Extrait d'algues <i>A. nodosum</i> Biovita	+ biomasse sèche + teneur en azote et protéines grains + décomposition matière organique du sol pour traitement racinaire	(Sen et al., 2015)
		Foliaire	Extraits d'algues <i>Kappaphycus alvarezii</i> et <i>Gracilaria edulis</i>	+ rendement en grains + nombre de grains par épi + masse et longueur épi + masse de 100 grains	(Shah et al., 2013)
			Extrait d'algue <i>A. nodosum</i>	Pas d'effet phytotoxique Pas de modification significative du rendement Tendance à l'augmentation du poids de mille grains	(Michalak et al., 2016)
Carotte	Champ	Racinaire	Extrait d'algue <i>A. nodosum</i> Le Jolis	+ croissance et rendement + activité microbienne du sol	(Alam et al., 2013)

Culture	Mode de culture	Application	Traitement	Effets physiologiques constatés	Références
Colza	Serre	racinaire	Extrait d'algue <i>A.nodosum</i> AZAL5	+ biomasse	(Jannin, 2012)
				+ efficacité utilisation azote (quantité de biomasse synthétisée par gramme d'N absorbé) chez plantes soumises à stress salin	
				- teneurs foliaires en chlorophylle chez plantes soumises à stress salin	
Concombre	Chambre de culture	Foliaire	Extrait d'algue <i>A.nodosum</i> Maxicrop	+ teneur en chlorophylle cotylédons	(Whapham et al., 1993)
			Betaines		
Epinard	Chambre de culture	Foliaire	Extrait d'algue <i>A.nodosum</i> Goëmar GA 14	+ biomasse fraîche	(Cassan et al., 1992)
	Chambre de culture	Racinaire, Foliaire et les deux	Extrait d'algue <i>A.nodosum</i>	Sécheresse : arrosage 100% et 50% évapotranspiration	(Xu and Leskovar, 2015)
				+ relation feuille à l'eau en SH (maintien pression turgescence et limitation fermeture stomatique)	
				+ contenu en eau feuille	
				+ surface foliaire	
				+ masse sèche et fraîche	
				+ surface foliaire spécifique (m ² .kg ⁻¹)	
				- fermeture stomate induite par stress	
				pas d'effet phenols, caroténoïdes, flavonoïdes et activité antioxydante	
- capacité de chélation des ions ferriques					
Fraise	Serre	Foliaire	Extrait d'algue <i>A.nodosum</i>	+ biomasse fruits	(Roussos et al., 2009)
			Acide gibbérellique		
			Extrait d'algue <i>A.nodosum</i>		
		Racinaire	Extrait d'algue <i>A.nodosum</i> Actiwave	+ apparence fruits	(Spinelli et al., 2010)
				+ contenu polyphénols	
				+ teneur en chlorophylle des feuilles	
				+ biomasse racinaire sans augmentation de biomasse foliaire	

Culture	Mode de culture	Application	Traitement	Effets physiologiques constatés	Références
Salade	Serre	Racinaire	Extrait d'algue <i>Ecklonia maxima</i> Kelpak	+ rendement	(Crouch et al., 1990)
				+ surface foliaire	
				+ concentration Ca, K, Mg dans les feuilles à apport en nutriment optimal	
				Peu d'effet sur plantes stressées recevant moins de nutriments	
Soja	Champ	Foliaire	Extrait d'algue <i>Kappaphycus alvarezii</i>	+ vigueur plante (hauteur, nombre branches, nombre gousses)	(Rathore et al., 2009)
				+ absorption N et en P, K, S du grain (meilleure remobilisation)	
Tomate	Champ	Foliaire et racinaire	Extrait d'algue Acadian Suelo	+ hauteur plante + diamètre tige + surface foliaire et nombre de feuilles	(Polo and Mata, 2018)
Vigna sinensis	Boîtes de Pétri	Semences	Extrait d'algue <i>Caulerpa chemnitzia</i>	+ % germination jusqu'à 50% de concentration en extrait algal	(Sivasankari et al., 2006)
			Extrait d'algue <i>Sargassum wightii</i>	- % germination à concentration en extrait algal >50%	
			Extraits d'algue <i>Caulerpa chemnitzia</i> et <i>Sargassum wightii</i>	+ vigueur plantule, longueur tiges et racines, biomasse fraîche et sèche	
Vigne	Serre	Racinaire	Extraits d'algues (laminaires, fucales, ulvée)	+ biomasse racinaire sans augmentation de biomasse foliaire	(Mugnai et al., 2007)
				+ absorption racinaire N et K	
		Foliaire	Extrait d'algue IPA (Biotechmarine)	+ teneur en chlorophylle des feuilles	(Mancuso et al., 2006)
				+ absorption N, P, K	
				+ teneur Mg feuilles	
+ teneur Zn tiges					
+ influx stomatique K ⁺ et Ca ²⁺ (contrôle ouverture stomates)					

Tableau 4 : Principaux effets reportés dans la littérature pour les biostimulants à base de protéines extraites de *Trichoderma*

Culture	Mode de culture	Application	Traitement	Effets physiologiques constatés	Références
A.thaliana	Laboratoire	Racinaire	Protéine endopolygalacturonase ThPG1 secretée par <i>T.harzanium</i>	+ résistance stress biotique	(Morán-Diez et al., 2009)
Concombre	Chambre de culture	Racinaire	Protéine swollenin secretée par <i>T.asperellum</i>	+ résistance stress biotique (<i>B.cinerea</i> , <i>P.syringae</i>)	(Brotman et al., 2008)
Coton	Chambre de culture	Racinaire	Protéine Sm1 secretée par <i>T.virens</i>	+ résistance stress biotique	(Djonović et al., 2006)
Mais	Chambre de culture	Racinaire	Protéine Sm1 secretée par <i>T.virens</i>	+ résistance stress biotique	(Djonovic et al., 2007)
Melon	Serre	Foliaire	Cellulase EC 3.2.1.4 par <i>T. longibrachiatum</i>	+ résistance stress biotique (mildiou)	(Martinez et al., 2001)
Tabac	Serre	Foliaire	Protéine Ethylene-Inducing- Xylanase (EIX) secretée par <i>T.viride</i>	+ résistance stress biotique	(Rotblat et al., 2002)
	Chambre de culture	Foliaire	Protéine hydrophobine secretée par <i>T.longibrachiatum</i>	+ croissance et développement système racinaire	(Ruocco et al., 2015)
Tomate	Serre	Racinaire	Protéine Sm1 secretée par <i>T.virens</i> Protéine Epl1 secretée par <i>T.atroviride</i>	+ biomasse + résistance stress biotique + induction expression peroxidase et α -dioxygénase par la plante	(Salas-Marina et al., 2015)
Tomate	Chambre de culture	Foliaire	Protéine hydrophobine secretée par <i>T.longibrachiatum</i>	+ croissance et développement système racinaire	(Ruocco et al., 2015)

Tableau 5 : Principaux effets reportés dans la littérature pour les biostimulants à base d'acides aminés

Culture	Mode de culture	Application	Traitement	Effets physiologiques constatés	Références
Amandier	Chambre de culture et champ	Foliaire	Extraits d'acides aminés et protéines, biostimulant Siapton	+ germination et pollinisation + nouaison	(Viti and Bartolhi, 2018)
Blé	Serre et champ	Foliaire	Biostimulant à base d'acides aminés	+ résistance stress hydrique	(Hammad and Ali, 2014)
Carotte	Serre et champ	Semences	Extrait d'acides aminés, biostimulant Ergostim	+ germination	(Sanders et al., 1990)
Laitue	Serre	Foliaire	Engrais Trainer à base d'acides aminés végétaux	+ biomasse sèche aérienne + teneur en chlorophylle (indice SPAD) et concentration en N dans les feuilles	(Colla et al., 2012)
Maïs	Serre	Foliaire	Engrais Trainer à base d'acides aminés végétaux	+ biomasse sèche aérienne + teneur en chlorophylle (indice SPAD) et concentration en N dans les feuilles	(Colla et al., 2012)
	Chambre de culture	Foliaire	Extraits d'acides aminés et protéines, biostimulant Siapton	+ résistance stress salin	(Mladenova et al., 1998)
Olivier	Chambre de culture	Semences	Extraits d'acides aminés et protéines, biostimulant Siapton	+ germination et pollinisation	(Viti et al., 1990)
Papaye	Champ	Foliaire	Extrait d'acides aminés Ergostim ou Extraits d'acides aminés et protéines, biostimulant Siapton	+ rendement	(Morales-Payan and Stall, 2003)
Salade	Serre	Foliaire	Extrait d'acides aminés Folcysteine	+ rendement	(Morales-Payan and Santos, 1997)
Tomate	Serre	Foliaire	Peptides et acides aminés extraits de germes de caroube	+ hauteur plante + nombre de fleurs et de fruits par plante	(Parrado et al., 2008)
	Serre	Foliaire et/ou racinaire	Extrait de protéines Amino16R	+ rendement et nombre de fruits	(Koukounaras et al., 2013)

2.3 Hypothèses de recherche

L'application foliaire de produits biostimulants sur le blé dur en complément de fertilisants azotés foliaires actuellement utilisés pourrait contribuer à réduire la consommation de fertilisants massique (fumure au sol) en permettant aux plantes d'augmenter le prélèvement d'azote et d'optimiser son utilisation. Cette augmentation du prélèvement contribuerait à réduire la pollution des eaux due à la lixiviation du nitrate. Cependant, les études menées jusqu'à présent sur les biostimulants n'ont pas permis de clarifier leurs modes d'action, notamment sur le déterminisme des flux d'azote au sein de la plante. De plus, ces produits gagnent en intérêt depuis plusieurs années et le nombre de publications sur le sujet est en croissance mais peu d'études se focalisent sur le blé dur (Figure 11).

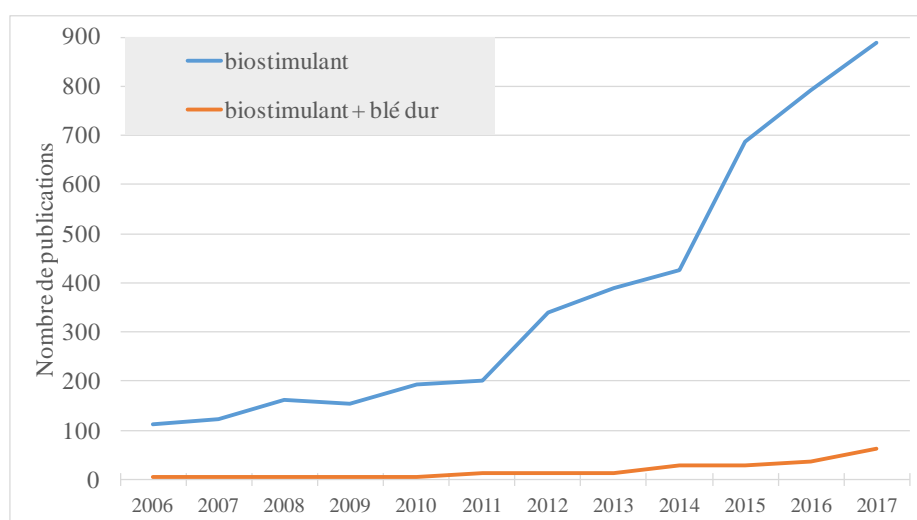


Figure 11 : Evolution du nombre de publications relative aux biostimulants et aux biostimulants + blé dur de 2006 à 2017

Dans le cadre de mon travail de recherche, nous avons émis quatre hypothèses principales concernant l'impact des biostimulants DPI4913 (à base d'extrait d'algue *Ascophyllum nodosum* et d'acides aminés) et AF086 (à base de protéines purifiées de champignon *Trichoderma*) sur la productivité, le métabolisme azoté et le contenu protéique du grain chez le blé dur :

- Hypothèse 1 : DPI4913 et AF086 ont un impact sur le rendement en grains à maturité
- Hypothèse 2 : DPI4913 et AF086 ont un impact sur l'efficacité d'utilisation de l'azote en agissant sur le prélèvement, le stockage et/ou la remobilisation de l'azote par la plante
- Hypothèse 3 : DPI4913 et AF086 améliorent le contenu protéique du grain quantitativement et qualitativement
- Hypothèse 4 : DPI4913 et AF086 améliorent la résistance de la plante aux stress abiotiques

Au vu de ces hypothèses de recherche, plusieurs essais ont été mis en place (Figure 12) :

- trois campagnes d'essais au champ (six essais entre 2015 et 2017)
- deux essais en serre (2016 et 2017)

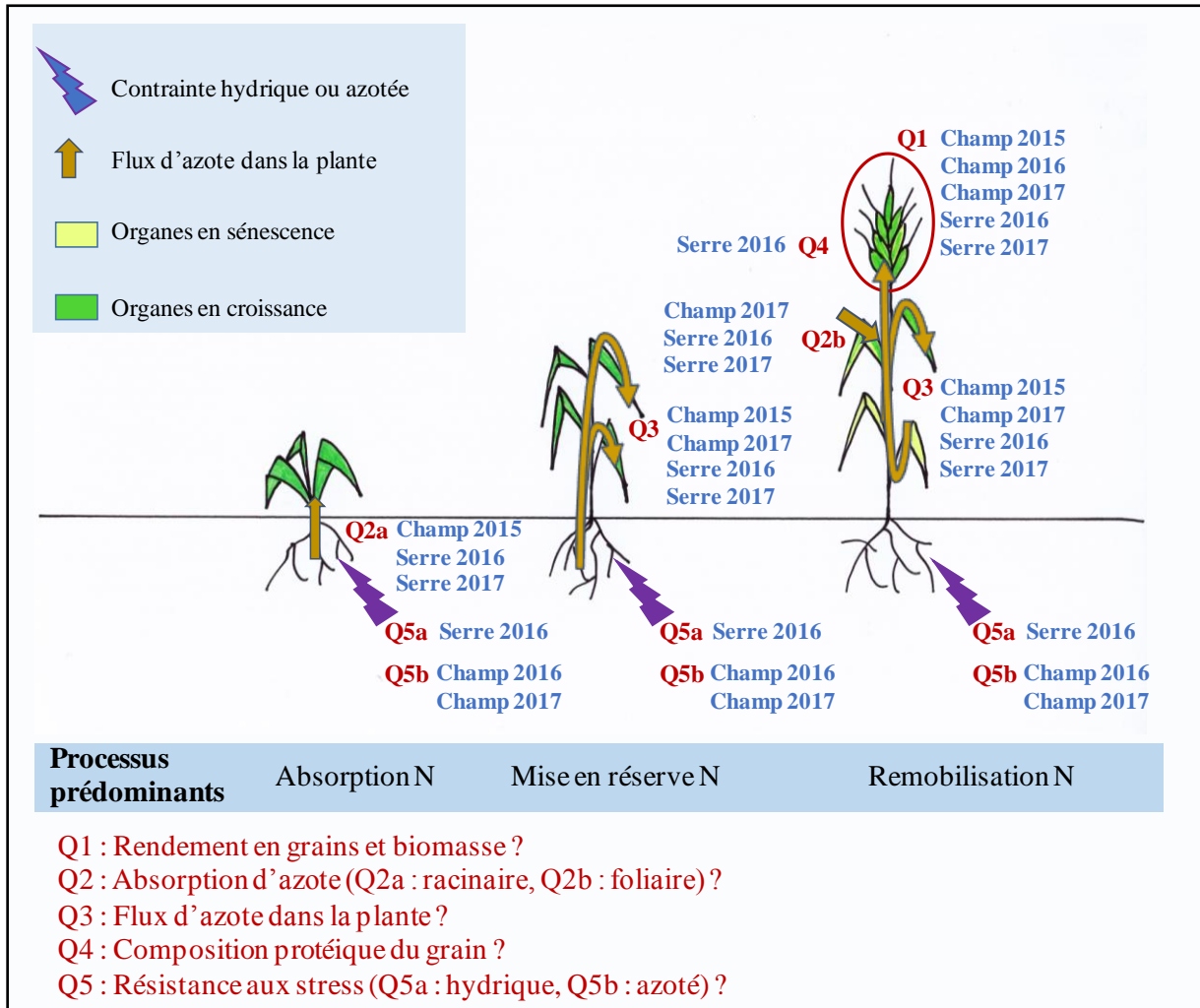


Figure 12 : Schéma conceptuel des travaux de thèse

Globalement, l'ensemble de mon travail a fait l'objet des manuscrits de publications suivants :

- Eve-Anne Laurent[†], Nawel Ahmed[†], Céline Durieu, Philippe Grieu, Thierry Lamaze

[†] co-auteurs

Marine and Fungal Biostimulants (DPI4913 and AF086 Extracts) Improve Grain Yield, Nitrogen Absorption and Allocation in Durum Wheat Plants

EN REVISION POUR FRONTIERS IN PLANT SCIENCE

- Carole Pichereaux[†], Eve-Anne Laurent[†], Audrey Gargaros, Sébastien Viudes, Céline Durieu, Thierry Lamaze, Philippe Grieu, Odile Schiltz

[†] co-auteurs

Durum Wheat Proteome Changes under Marine and Fungal Biostimulant Treatments (DPI4913 and AF086 Extracts)

SOU MIS A JOURNAL OF PROTEOMICS

Les travaux effectués ont également fait l'objet d'une présentation orale en congrès :

- Eve-Anne Laurent, Thierry Lamaze, Philippe Grieu, Céline Durieu, Nawel Ahmed

Marine and Fungal Biostimulants (DPI4913 and AF086 Extracts) Improve Grain Yield, Nitrogen Absorption and Allocation in Durum Wheat Plants

EUROPEAN SOCIETY FOR AGRONOMY CONGRESS (ESA), 28/08/2018, GENÈVE, SUISSE

Chapitre II

Matériels et

Méthodes

CHAPITRE II : *Matériels et Méthodes*

L'ensemble des dispositifs et des protocoles des essais effectués dans le cadre du projet de thèse, que ce soit en serre ou au champ, a été discuté avec les partenaires du projet INNOPERF-BLE de manière à aboutir à des démarches communes pour les travaux portant sur le blé dur. Des résultats d'essais au champ menés par l'INRA, le CESBIO et Agronutrition en amont de la thèse ou par Agronutrition en parallèle du travail expérimental de thèse ont été exploités, dans la mesure où les protocoles utilisés étaient comparables à ceux menés dans le cadre de ma thèse. Afin d'éviter les redondances, les protocoles déjà décrits dans les publications incluses dans ce manuscrit de thèse et dont les résultats ne sont traités que dans ces publications ne seront pas détaillés dans cette partie.

1 Traitements biostimulants et apport d'azote foliaire

Composition des produits et doses d'application

Deux produits biostimulants, formulés et fournis par la société Agronutrition, ont été testés : DPI4913 contenant des extraits de l'algue *Ascophyllum nodosum* et un mélange d'acides aminés ; AF086 contenant des enzymes extraites du champignon *Trichoderma*. Les produits ont été appliqués en solution liquide en se basant sur les doses prescrites par Agronutrition. Trois traitements ont été comparés : le Contrôle, sans traitement ; l'application foliaire de DPI4913 à une dose de 1 L/ha ; et l'application foliaire de AF086 à une dose de 5 L/ha.

La solution d'azote foliaire AF001, fournie également par la société Agronutrition, a été utilisée dans les expérimentations à partir de la deuxième année de thèse (2016), en apport combiné avec les biostimulants. Elle contient de l'urée et du sulfate de magnésie. Dans le cas d'un apport d'AF001, deux traitements ont été comparés : AF001 (-), sans traitement ; AF001 (+), avec une application foliaire à une dose de 40 L/ha représentant un apport de 8 kg N/ha.

Stades d'application

Une première partie du travail a consisté à valider les conditions d'efficacité optimales des produits biostimulants aux doses prescrites. Le stade d'application dernière feuille étalée (DFE) ciblé par Agronutrition, qui correspond à la période où l'indice de surface foliaire de la plante est maximal, a été testé ainsi que d'autres stades qui semblaient pertinents, soit le stade 2 nœuds au cours duquel le prélèvement d'azote par la plante est le plus important (Baethgen and Alley, 1989), et le stade floraison à partir duquel le processus de remobilisation de l'azote vers les grains se met en place (Kichey et al., 2007) . Dans la littérature, l'application répétée de biostimulants est la plus couramment utilisée (Osman and Salim, 2016; Polo and Mata, 2018; Roussos et al., 2009; Xu and Leskovar, 2015). Une application répétée de biostimulants au stade 2 nœuds et au stade DFE a donc été testée.

Modes d'apport des produits

Au champ, l'application des biostimulants a été effectuée individuellement sur chaque micro-parcelle à l'aide d'un pulvérisateur expérimental (Photo 1). Huit buses placées le long

de la rampe de traitement pouvaient être ouvertes ou fermées de manière à ajuster la largeur à celle de la micro-parcelle à traiter. La pression en sortie de chaque buse était homogène et le temps de passage le long de la micro-parcelle a été calibré en fonction du volume total à délivrer. Les produits sont dilués à l'eau : 1 L de DPI4913 dans 200 L de solution pulvérisée sur un hectare, 5 L pour AF086 et 40 L pour AF001.



Photo 1 : Pulvérisateur expérimental utilisé pour l'apport de biostimulants et d'azote foliaire au champ

En serre, la pulvérisation a été effectuée à l'aide d'un pulvérisateur de jardin de 1.5 L (Photo 2). La quantité de produit apportée en serre a été calculée en fonction du nombre plantes à traiter (une talle par plante) qui a été estimé à partir du nombre moyen d'épis au mètre carré sur l'essai au champ réalisé par l'INRA et Agronutrition en amont de la thèse, soit 320 épis/m². Le volume de produit apporté par unité de surface a été converti en volume de produit apporté par épi. Un temps de passage précis a ainsi été défini pour une pulvérisation le long d'une rangée de trois pots de largeur, ce qui a permis de déterminer le volume délivré et les calculs de dilution à l'eau des produits qui en découlent.

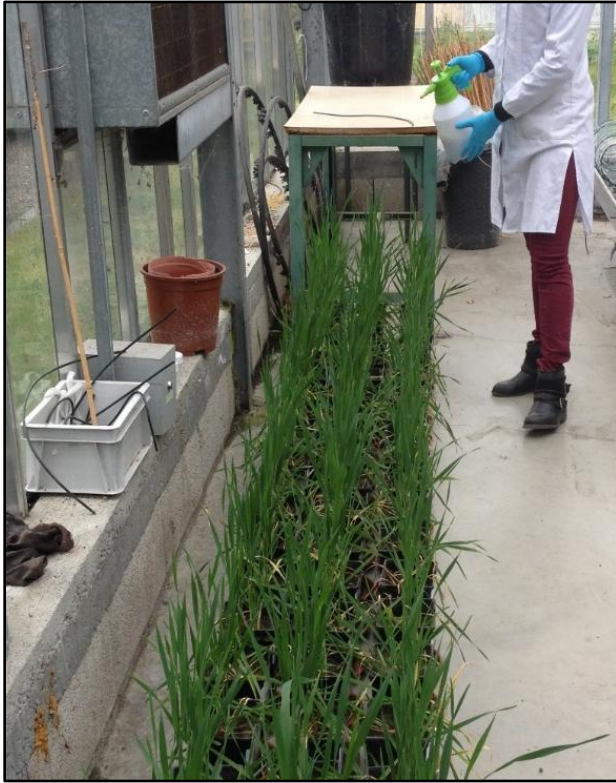


Photo 2 : Pulvérisateur utilisé pour l'apport de biostimulants et d'azote foliaire en serre

2 Matériel végétal et conditions de culture

Description des variétés de blé dur utilisées

Les variétés de blé dur utilisées dans le cadre du projet de thèse ont été sélectionnées parmi les variétés classiquement utilisées par les producteurs de blé dur français et sur la base d'une efficacité d'utilisation de l'azote contrastée (Figure 13).

La variété de blé dur Anvergur a été retenue pour l'ensemble des travaux menés dans le cadre du projet de thèse (serre et champ). Des essais au champ menés en amont et en parallèle de la thèse utilisaient la variété Miradoux, elle aussi classée parmi les variétés les plus utilisées par les agriculteurs. Elle présente également un rendement et une teneur en protéines élevés et stables. Les besoins unitaires en azote définis par l'Institut technique Arvalis pour ces deux variétés sont similaires, soit 3,7 kg d'azote par quintal pour atteindre l'optimum de rendement et une teneur en protéines comprise entre 13,7 % et 14,5 %.

La variété Babylone, présentant un besoin unitaire en azote plus élevé (3,9 kg N/q), a été utilisée dans les travaux menés en conditions contrôlées (serre et phytotron). Ses caractéristiques physiologiques et technologiques sont similaires à celle d'Anvergur et Miradoux.

	ANVERGUR	BABYLONE	MIRADOUX
Identité			
Représentant	RAGT	Syngenta	Florimond Desprez
Année d'inscription	2013	2009	2007
Caractéristiques physiologiques			
Précocité épiaison	6 (1/2 tardif à 1/2 précoce)	5.5 (1/2 tardif)	5.5 (1/2 tardif)
Tolérance au froid	4 (assez sensible)	3.5 (sensible)	2 (très sensible)
Verse	5.5 (sensible)	7.5 (résistant)	6 (assez sensible)
Hauteur de paille	3.5 (courte)	3.5 (courte)	3.5 (courte)
PMG	6.5 (gros)	8.5 (très gros)	8 (très gros)
Valeur technologique			
Classe qualité technologique	BDC (blé dur couleur)	BD (blé dur passable)	BDHQ (blé dur de haute qualité)
Avis semoulerie	VRSP (variété recommandée par les semouliers et pastiers)	-	VRSP (variété recommandée par les semouliers et pastiers)
Teneur en protéines	5.5 (moyenne)	5 (moyenne)	5.5 (moyenne)
Indice de jaune	8.5 (très bon)	8 (bon)	8.5 (très bon)
Indice de brun	6 (assez bonne)	6.5 (assez bon)	6.5 (assez bon)
Poids spécifique	5.5 (moyen)	6.5 (assez élevé)	6.5 (assez élevé)
Moucheture	7 (bon)	6.5 (bon)	7.5 (bon)
Mitadinage	6 (bon)	4 (moyen)	5.5 (assez bonne)
Besoin unitaire d'azote			
Bq = besoin en azote par quintal produit entre 13.7 % et 14.5 % de protéines (kg N/q)	3.7	3.9	3.7

Figure 13 : Caractéristiques des variétés de blé utilisées au cours des expérimentations au champ et en serre (d'après Arvalis Institut du végétal, 2018)

2.1 Culture au champ

Six essais au champ ont été menés sur trois sites, à savoir : Saint-Sulpice en 2015 et en 2017 ($43^{\circ}33'39''$ N, $1^{\circ}27'11''$ E), Mervilla 1 et Mervilla 2 en 2016 ($43^{\circ}50'34''$ N, $1^{\circ}47'23''$ E), Rebigue 1 et Rebigue 2 en 2017 ($43^{\circ}29'20$ N, $1^{\circ}28'37$ E). Les trois sites se situent en Haute-Garonne et leur localisation est représentée sur la Figure 14.

Ils présentent des caractéristiques pédologiques proches détaillées dans la Figure 15 avec une texture équilibrée et un pH compris entre 7.4 et 8.2. Pour tous, les semis ont été effectués au mois d'octobre à une densité de 300 grains/m². La variété semée était la variété Anvergur, excepté pour les essais menés à Saint-Sulpice où il s'agissait de Miradoux. Les plans d'expérimentation de ces essais sont présentés dans le Tableau 6.



Figure 14 : Localisation des sites d'expérimentation au champ à l'échelle nationale
1 : Saint-Sulpice ; 2 : Mervilla ; 3 : Rebigue

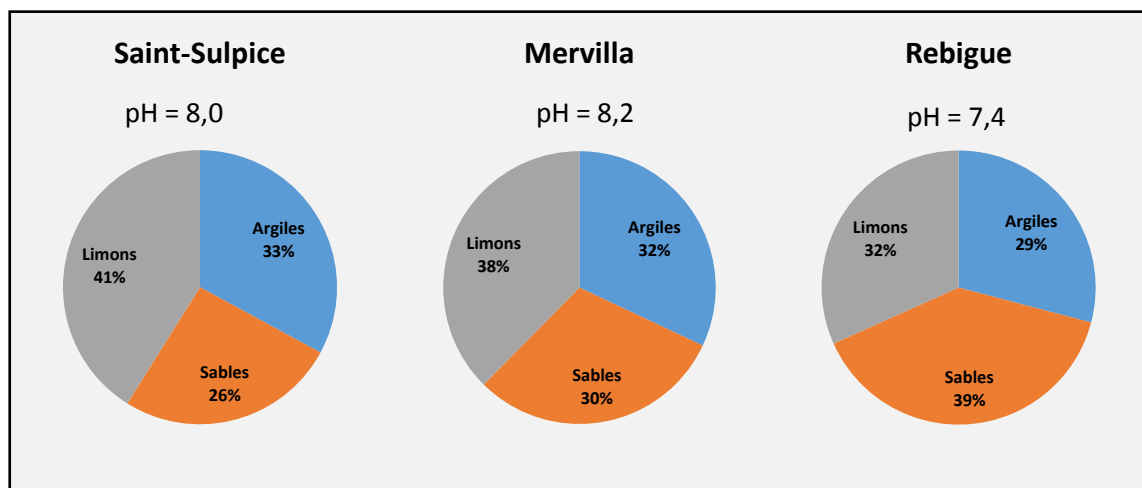


Figure 15 : Caractéristiques pédologiques des sites d'expérimentations au champ

Tableau 6 : Plans d'expérimentation des essais au champ*DFE : dernière feuille étalée*

Essai	Variété	Facteurs de variation	Modalités de facteur	Nombre de répétitions
Saint-Sulpice 2015	Miradoux	Traitement biostimulants	Contrôle DPI4913 AF086	10
Mervilla 1 et Mervilla 2 2016	Anvergur	Fertilisation azotée	Standard Contrainte	4
		Traitement biostimulants	Contrôle DPI4913 AF086	
		Stade d'application des biostimulants	2 nœuds DFE Floraison	
Rebigue 1 et Rebigue 2 2017	Anvergur	Fertilisation azotée	Standard Contrainte	4
		Traitement biostimulants	Contrôle DPI4913 AF086	
		Azote foliaire	Azofol (-) Azofol (+)	
Saint-Sulpice 2017	Miradoux	Traitement biostimulants	Contrôle DPI4913	4
		Stade d'application des biostimulants	2 noeuds DFE 2 nœuds + DFE	

2.1.1 Site de Saint-Sulpice

Campagne 2015

Un premier essai au champ a été conduit à Saint-Sulpice d'octobre 2014 à juillet 2015 par l'INRA et Agronutrition, en préambule des travaux de thèse. La conduite de la fertilisation azotée était celle pratiquée par l'agriculteur chez qui l'essai était positionné, soit 180 kg N/ha fractionné en quatre apports : 50 kg N/ha sous forme d'ammonitrate au stade tallage, 40 kg N/ha sous forme d'azote soufré à montaison, 60 kg N/ha sous forme d'ammonitrate à deux nœuds, 30 kg N/ha sous forme d'ammonitrate à dernière feuille étalée (DFE).

Le dispositif mis en place était un dispositif en randomisation totale avec un facteur de variation (traitement biostimulant au stade DFE : Contrôle, DPI4913, AF086) et 10 répétitions par modalité. L'ensemble représentait un total de 30 microparcelles de 1.4 x 10 m chacune (Photo 3).



Photo 3 : Parcelle d'essai au champ de Saint-Sulpice en 2015

Campagne 2017

Un essai au champ a été mené par Agronutrition d'octobre 2016 à juillet 2017 conjointement aux travaux de thèse. La conduite de la fertilisation azotée était celle pratiquée par l'agriculteur chez qui l'essai était positionné, soit 230 kg N/ha fractionné en quatre apports : 60 kg N/ha sous forme d'ammonitrate au stade tallage, 70 kg N/ha sous forme d'azote soufré à montaison, 70 kg N/ha sous forme d'ammonitrate à un nœud, 30 kg N/ha sous forme d'ammonitrate à dernière feuille étalée (DFE).

Le dispositif expérimental était un dispositif en blocs randomisés à quatre répétitions, avec deux facteurs de variation : traitement biostimulants (Contrôle, DPI4913) et stade d'application des biostimulants (2 nœuds, DFE, 2 nœuds + DFE). L'essai était donc constitué de 24 microparcelles de 1.4 x 10 m (Photo 4).



Photo 4 : Parcelle d'essai au champ de Saint-Sulpice en 2017

2.1.2 Site de Mervilla

Lors de la première année d'expérimentation au champ dans le cadre du travail de la thèse, deux essais identiques ont été menés à Mervilla d'octobre 2015 à juillet 2016 : Mervilla 1 et Mervilla 2. Deux niveaux de fertilisation ont été appliqués : fertilisation standard avec un apport total de 200 kg N/ha, contrainte azotée avec un apport total de 115 kg N/ha. Les apports ont été fractionnés de la manière suivante : 65 kg N/ha sous forme d'azote soufré au stade tallage pour les deux niveaux de fertilisation, 85 kg N/ha sous forme de perlurée répartis en deux apports avant et après le stade un nœud pour la fertilisation standard et 0 kg/ha pour la contrainte azotée, 50 kg N/ha sous forme d'ammonitrate au stade dernière feuille pointante pour les deux niveaux de fertilisation.

Les facteurs de variations étaient le niveau de fertilisation (standard ou contrainte), le traitement biostimulant (Contrôle, DPI4913, AF086), et le stade d'application des biostimulants (2 nœuds, DFE, floraison). Le dispositif expérimental était un split-plot à quatre répétitions où les niveaux de fertilisation correspondaient aux blocs principaux, et les traitements biostimulants ainsi que les stades d'application aux sous-blocs. Les deux blocs principaux étaient séparés de 40 m par une zone tampon afin de respecter deux niveaux de fertilisation bien distincts. Au total, chaque essai (Mervilla 1 et Mervilla 2) comprenait 72 micro-parcelles de 2 x 4 m chacune, séparées par une bordure de 0.5 m (Photo 5).



Photo 5 : Parcelle d'essai au champ de Mervilla en 2016

2.1.3 Site de Rebigue

Lors de la deuxième année d'expérimentation au champ dans le cadre du travail de thèse, deux essais identiques ont été menés à Rebigue d'octobre 2016 à juillet 2017 : Rebigue 1 et Rebigue 2. De même qu'à Mervilla, deux niveaux de fertilisation ont été

appliqués avec un apport total de 190 kg N/ha en fertilisation standard et un apport total de 130 kg N/ha en contrainte azotée. Les apports ont été fractionnés de la manière suivante : 40 kg N/ha sous forme d'ammonitrate au stade tallage pour les deux niveaux de fertilisation, 100 kg N/ha sous forme de perlurée répartis en deux apports avant et après le stade un nœud pour la fertilisation standard et 40 kg/ha pour la contrainte azotée, 50 kg N/ha sous forme d'ammonitrate au stade dernière feuille pointante pour les deux niveaux de fertilisation.

Les facteurs de variations étaient le niveau de fertilisation (standard ou contrainte), le traitement biostimulant à 2 nœuds et à DFE (Contrôle, DPI4913, AF086) et l'apport d'azote foliaire (Azofol (-), Azofol (+)) à floraison. Pour chaque essai (Rebigue 1 et Rebigue 2), le même dispositif expérimental en split-plot qu'à Mervilla a été repris avec toujours quatre répétitions par modalité et une zone tampon de 40 m entre les deux blocs principaux. Chaque essai (Rebigue 1 et Rebigue 2) comprenait au total 48 micro-parcelles de 2 x 4 m, séparées par une bordure de 0.5 m (Photo 6).

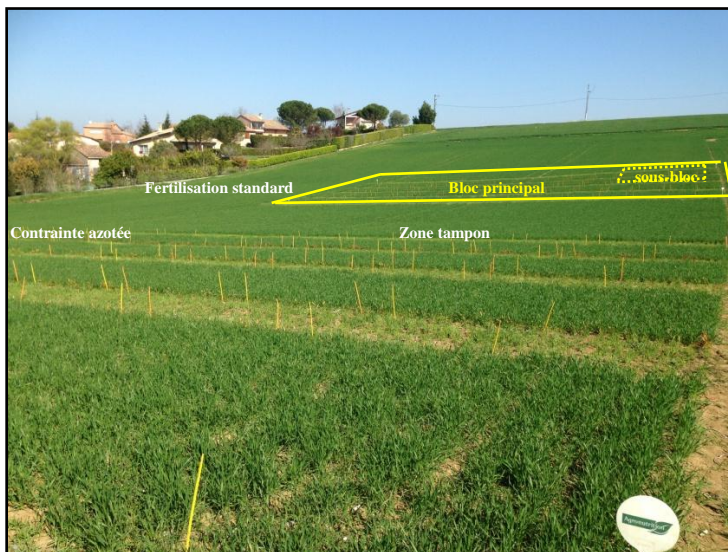


Photo 6 : Parcelle d'essai au champ de Rebigue en 2017

Marquage ^{15}N de l'engrais foliaire AF001

A floraison, sur chaque microparcelle recevant le traitement AF001, un bouquet de plantes a été repéré et entouré d'une ficelle de longueur 100 cm. Ce bouquet de plantes a été protégé afin de ne pas recevoir le traitement AF001. Les plantes protégées n'ayant pas reçu AF001 ont été pulvérisées par une solution où l'urée d'AF001 été marquée au ^{15}N (enrichissement à 25 %).

Dosage du ¹⁵N

A maturité les plantes marquées ont été récoltées par microparcelle et séparées en trois lots par compartiment : grains, glumes et barbes, tiges et feuilles. Pour des raisons techniques, le prélèvement des racines au champ n'était pas possible. Chaque lot a été séché (60°C, 48 heures) et pesé pour détermination de la masse sèche, puis broyé en une fine poudre pour les analyses d'azote total et de ¹⁵N par un spectromètre de masse (Isoprime™) couplé à un analyseur élémentaire (EA 2000, EuroVector™, Manchester, UK). L'abondance naturelle a été déterminée sur quatre échantillons de chaque compartiment de plantes non exposées au marquage ¹⁵N. La quantité de ¹⁵N (g) exogène par compartiment a ensuite été calculée selon la teneur en ¹⁵N dans l'échantillon analysé, la masse du compartiment et l'abondance naturelle (Equation 4).

$$^{15}\text{N}_{\text{exces}} = \text{Masse}_{\text{compartiment}} \times [\text{N}]_{\text{échantillon}} \times (A_{\text{échantillon}} - A_{\text{naturelle}})$$

Équation 4 : Quantité de ¹⁵N exogène par échantillon

Avec

Masse_{compartiment} : biomasse sèche du compartiment (g)

[N]_{échantillon} : teneur en azote de l'échantillon analysé (%)

A_{échantillon} : abondance en ¹⁵N de l'échantillon analysé (%)

A_{naturelle} : abondance naturelle en ¹⁵N de l'échantillon (%)

2.2 Culture en serre

Deux essais en serre ont été conduits à Toulouse (43°52'72'' N, 1°50'14'' E) au cours de deux campagnes expérimentales : l'essai en serre n°1 de janvier à juin 2016 et l'essai en serre n°2 de janvier à juin 2017. L'objectif de ces essais était d'étudier l'impact de DPI4913 et AF086 sur le rendement en grains et la production de biomasse ainsi que sur les flux d'azote dans la plante (quantité d'azote prélevée, compartimentation de l'azote, remobilisation de l'azote vers les grains) et sur l'efficacité d'utilisation du fertilisant azoté foliaire AF001. Les stades d'application et l'application d'une contrainte hydrique ont été testés.

Le sol utilisé a été prélevé dans les horizons superficiels sur le site d'une sablière située dans les Landes et n'a donc été exposé à aucune activité agricole. Il a été homogénéisé et tamisé dans une bétonnière garnie d'un grillage de maille 1 cm (Photo 7).



Photo 7 : Tamisage du sol utilisé dans les essais en serre de 2016 et 2017

2.2.1 Campagne 2016

Mise en place de la culture

La variété de blé dur d'hiver cultivée au cours de cette campagne est la variété Anvergur. Le semis a été effectué mi-janvier pour des raisons de contraintes opérationnelles, contrairement à la pratique classique appliquée au champ qui consiste à semer les blés d'hiver à l'automne (Killmayer and Verdier, 2017). Afin d'avancer la date d'implantation de la culture en serre, les processus de germination et de levée ont été accélérés. Les graines ont été préalablement semées dans des gobelets en plastique remplis de sable et placés en phytotron pendant une semaine (25°C/20°C jour/nuit, intensité lumineuse de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR, photopériode de 12 heures). Les plantules ont ensuite été déplacées dans la serre pendant deux semaines, à une température variant entre 0 et 10°C assurant une bonne vernalisation (lumière ambiante, ferti-irrigation avec une solution Coïc-Lesaint modifiée). La composition de la

solution nutritive était : NO_3^- 9.03 mM, NH_4^+ 1.25 mM, PO_4^{3-} 0.88 mM, K^+ 3.49 mM, Ca^{2+} 2.70 mM, Mg^{2+} 0.96 mM, SO_4^{2-} 0.96 mM.

Enfin, les jeunes plants ont été transférés dans des pots en plastique de 2 L contenant 2.2 kg de sol sableux (pH 5.0, 86 % de sable, 11 % de limon, 3 % d'argile) préalablement tamisé (Photo 8). Chaque pot contenant quatre plantes monotalles a été alimenté par 50 mL de solution nutritive apportés deux à trois fois par semaine.



Photo 8 : Mise en culture de plants de blé dur en serre

Capacité au champ

Pour déterminer la capacité au champ, cinq pots ont été remplis de sol saturé en eau. Après percolation complète de l'eau libre, la teneur en eau du sol à la capacité au champ est considérée comme atteinte. Des échantillons de sol ont alors été prélevés dans chaque pot, pesés, placés à l'étuve à 105°C pendant 48 heures et pesés à nouveau. La teneur en eau du sol à capacité au champ a été calculée comme la différence relative entre ces deux masses, soit 20.6 %.

Irrigation

Deux niveaux d'irrigation ont été appliqués : une irrigation “standard” avec une teneur en eau du sol ajustée à 75 % de la capacité au champ, et une irrigation “contrainte” pour une teneur en eau du sol ajustée à 60 % de la capacité au champ. Du stade deux nœuds (début avril) jusqu'à la récolte (début juillet), les pots disposés sur des balances (Photo 9) ont été pesés trois fois par semaine et la teneur en eau ajustée aux valeurs définies ci-dessus.



Photo 9 : Dispositif d'essai en serre

Marquage ^{15}N de l'azote de la feuille drapeau

Pour chaque traitement biostimulant, un apport d'azote marqué sous forme de $\text{Cl}^{15}\text{NH}_4$ a été effectué sur la feuille drapeau à trois stades de développement. Deux plantes monotalles sur les quatre d'un pot ont été marquées. Un dépôt de 25 μL de solution de $\text{Cl}^{15}\text{NH}_4$ (1.28 M, richesse isotopique de 99 %) a été apporté sur la face inférieure de la feuille à l'aide d'une micropipette. La zone de dépôt était préalablement délicatement brossée à l'aide d'un pinceau, afin de faciliter l'absorption (Photo 10).



Photo 10 : Apport de $\text{Cl}^{15}\text{NH}_4$ sur la feuille drapeau d'un plant de blé dur cultivé en serre

Design expérimental

Le dispositif expérimental est un dispositif où les niveaux d'irrigation (standard, contrainte) correspondent aux modalités principales (Figure 17). Dans chacune des modalités d'irrigation, les modalités suivantes ont été testées : les deux traitements biostimulants et le témoin sans biostimulant associé (DPI4913, AF086, Contrôle), trois stades d'application des biostimulants (2 nœuds, DFE : dernière feuilles étalée, floraison) et trois stades de marquage au $^{15}\text{NH}_4^+$ (2 nœuds, DFE, floraison). Les pots étaient disposés sur des balances, à raison de six pots par balance (Figure 16). Ce dispositif a été répété sur 9 blocs, si bien qu'au total, l'essai comprenait 378 pots.

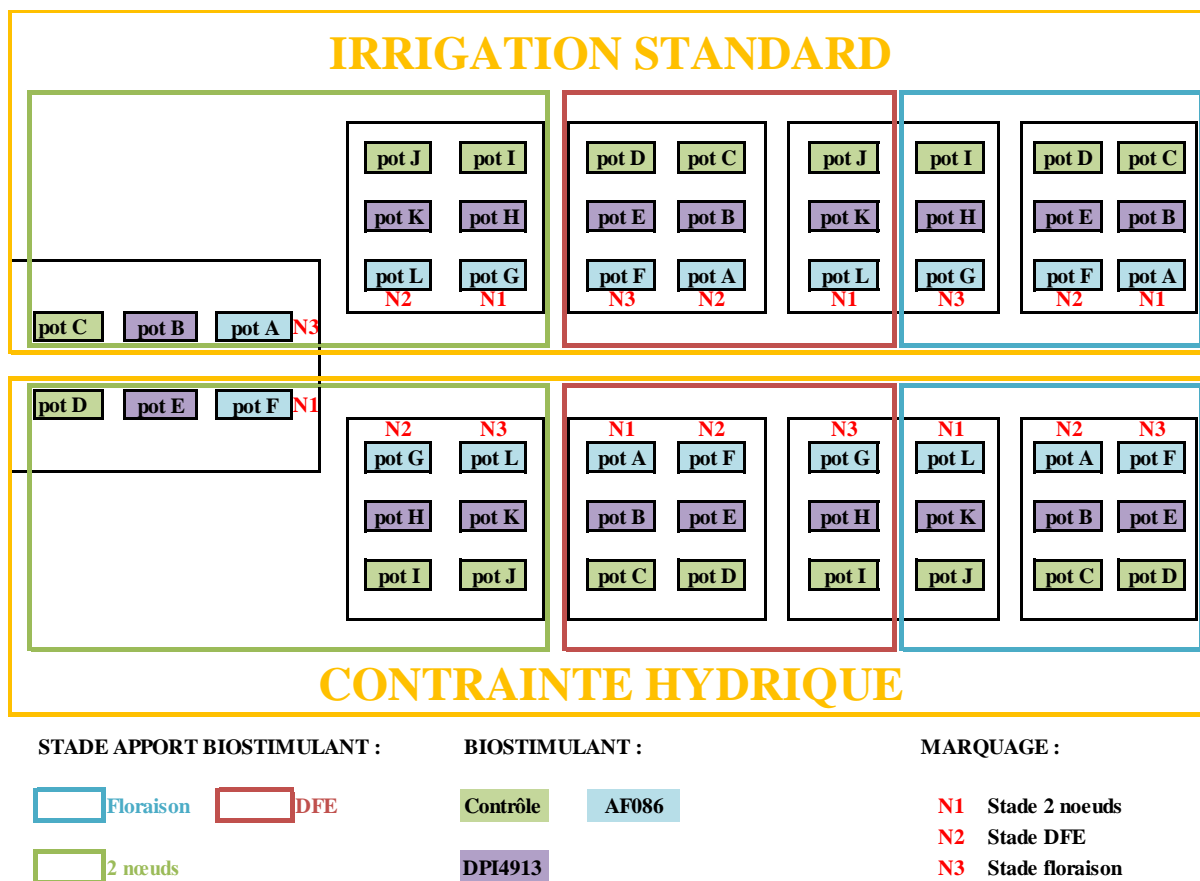


Figure 16 : Schéma d'un bloc de l'essai en serre 2016. Les facteurs testés étaient le niveau d'irrigation (standard, contrainte) ainsi que le type de biostimulant (DPI4913, AF086) et le stade auquel il était apporté (2 nœuds, DFE : dernière feuille étalée, floraison).

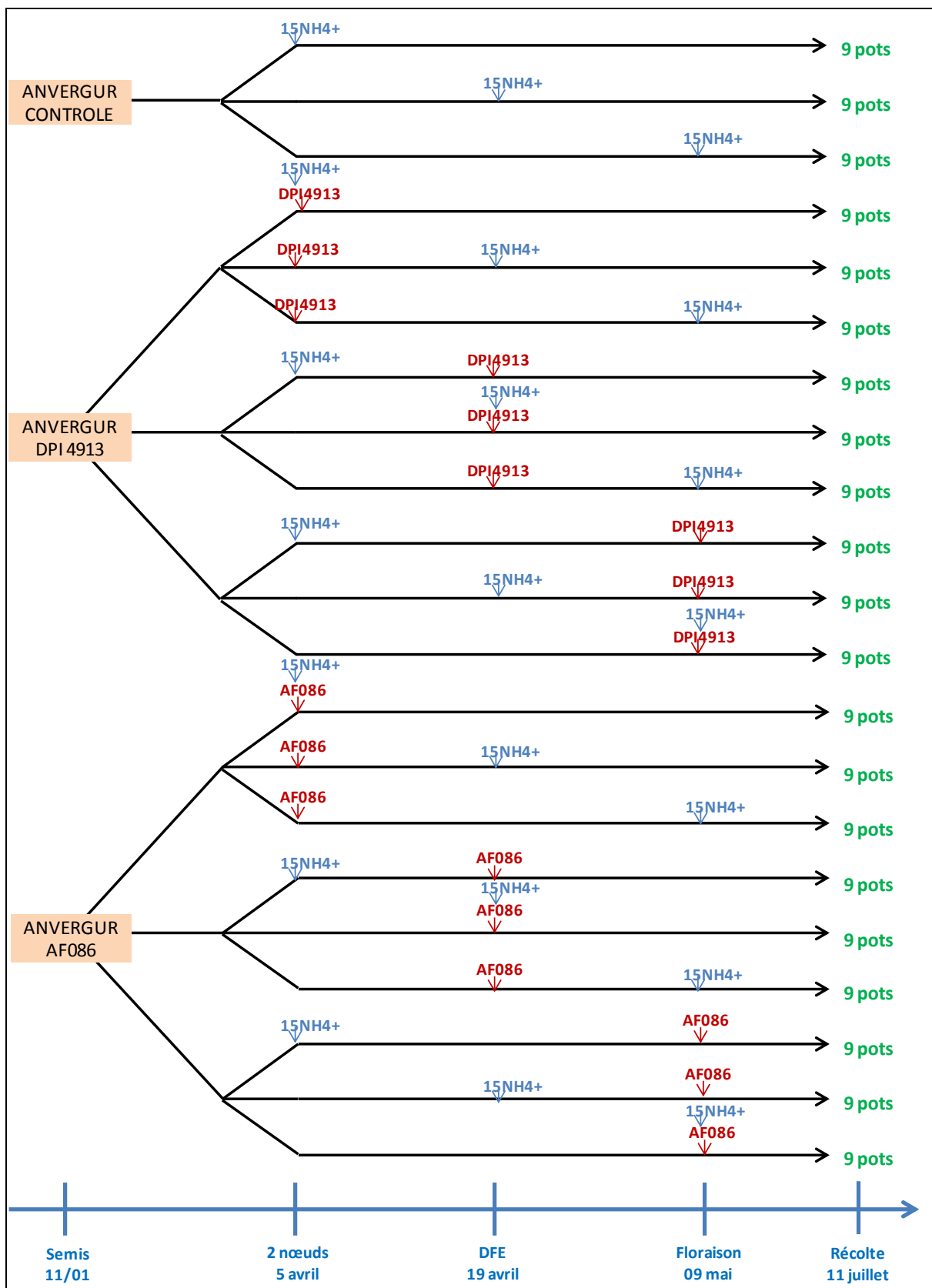


Figure 17 : Dispositif expérimental de l'essai en serre 2016, ce dispositif étant répété à l'identique pour les deux niveaux d'irrigation standard et contrainte

Dosage de l'azote total et du ¹⁵N

A maturité les plantes marquées et non marquées ont été récoltées et séparées en cinq lots par compartiments : grains, glumes et barbes, feuille drapeau, tiges et feuilles, parties racinaires. Chaque lot a été séché (60°C, 48 heures) et pesé, puis broyé en une fine poudre pour les analyses d'azote total (vario El cube elemental analyser, Elementar, Langenselbold, Germany).

Les analyses ¹⁵N ont été réalisées uniquement pour les modalités pour lesquelles des effets des biostimulants sur la biomasse en grains et la quantité de protéines dans les grains avaient été constatées. Les analyses ¹⁵N ont été réalisées comme décrit dans le paragraphe 2.1.3.

2.2.2 Campagne 2017

Mise en place de la culture

Les variétés Anvergur et Babylone ont été cultivées au cours de cette campagne. Les graines ont été semées début janvier dans des pots de 2 L contenant 2.2 kg de sol sableux (pH 5.3, 89.3 % de sable, 8.8 % de limon et 1.9 % d'argile). Comme en 2016, chaque pot contenait quatre plantes monotalles et 50 mL de solution nutritive leur étaient apportés deux à trois fois par semaine.

Gestion de l'irrigation

Un niveau d'irrigation standard a été appliqué (teneur en eau du sol proche de 75 % de la capacité au champ). Un nouveau système d'irrigation a été implanté au stade montaison (Photo 11). Une défaillance de ce système d'irrigation a entraîné un arrosage excessif résultant en un tassement des sols qui a perturbé l'enracinement des plantes.



Photo 11 : Système d'irrigation implanté sur l'essai en serre de 2017

Un second lot de plantes de la variété Anvergur a été semé pour réaliser des mesures complémentaires. Les plantes de ce second lot ont moins souffert de l'excès d'eau et ont été retenues pour réaliser le dispositif expérimental, mais le nombre de répétitions a dû être réduit (24 à 19). Parmi les pots du premier lot, ceux contenant des plantes acceptables ont été conservés pour effectuer des mesures de photosynthèse combinées à des mesures d'indice de chlorophylle. Malheureusement, aucune des mesures réalisées sur cet essai en serre n'ont pu être exploitées.

Marquage ^{15}N de l'azote minéral du sol et de l'engrais foliaire

Un apport d'azote de K^{15}NO_3 et $\text{Cl}^{15}\text{NH}_4$ a été effectué dans le sol de chaque pot par 50 mL de solution contenant K^{15}NO_3 et $\text{Cl}^{15}\text{NH}_4$ (6.25 mM et 0.12 mM respectivement, richesse isotopique de 99 %).

Un apport d'engrais foliaire AF001 enrichi en ^{15}N -urée a été effectué sur les feuilles d'autres plantes. L'apport consistait en une pulvérisation de AF001 (selon les doses prescrites par Agronutrition, voir paragraphe 1) contenant 25 % d'urée marquée ($^{15}\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, richesse isotopique de 99 %).

Design expérimental

Le dispositif expérimental présenté sur la Figure 18 est un dispositif en blocs à 19 répétitions avec deux facteurs de variations : le traitement biostimulant à 2 nœuds et à DFE (Contrôle, DPI4913, AF086) et l'apport d'azote foliaire (Azofol (-), Azofol (+)). Au total, l'essai comprenait 114 pots.

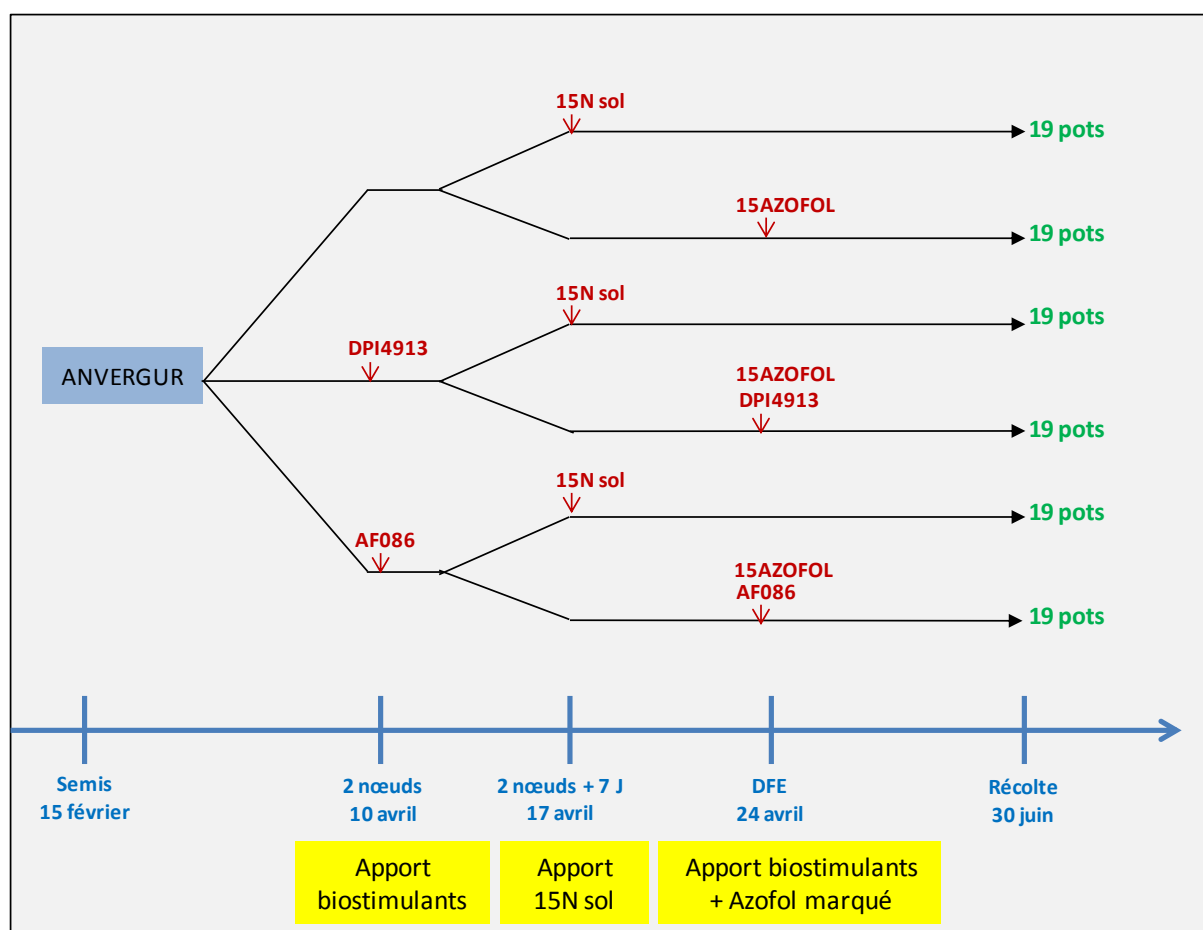


Figure 18 : Dispositif expérimental de l'essai en serre 2017

3 Exploitation statistique des données

L'ensemble des données a été soumis à des analyses de variance (ANOVAs) au seuil de 5 % sur le logiciel R (Free Software Foundation, Inc., Boston, USA), suivies le cas échéant de tests de Tukey. Les valeurs de F-ratios sont en générale présentées dans les tableaux d'analyses de variance car elles permettent de comparer le niveau d'impact des facteurs sur les variables étudiées. Ce paramètre correspond en effet à un rapport de variance (variance entre les groupes / variance au sein des groupes).

Chapitre III

*Effets des biostimulants sur
le rendement en grains et
sur la croissance*

CHAPITRE III : *Effets des biostimulants sur le rendement en grains et sur la croissance*

1 Essais au champ

Afin d'étudier l'impact des produits biostimulants DPI4913 et AF086 en conditions agronomiques, plusieurs essais au champ ont été menés (protocoles décrits dans le chapitre Matériel et Méthodes). Pour mémoire, le biostimulant DPI4913 est issu d'extrait d'algues *Ascophyllum nodosum* et d'acides aminés alors que le biostimulant AF086 contient un complexe enzymatique issu du champignon *Trichoderma*. Comme les biostimulants peuvent agir de manière contrastée (paragraphe 1.1), ils seront traités en parallèle dans les analyses présentées ci-après.

L'impact des biostimulants a été analysé, d'un point de vue quantitatif (rendement en grains et poids de mille grains) et qualitatif (teneur en protéines et quantité de protéines) en fonction de leurs stades d'application, ainsi que du niveau de fertilisation avec ou sans apport d'azote foliaire (Tableau 7).

Tableau 7 : Facteurs étudiés et modalités de facteurs pour les différents sites d'essai au champ
DFE : dernière feuille étalée

Site	N	n	Biostimulant			Stade d'application				Fertilisation		N foliaire	
			Contrôle	DPI4913	AF086	2 nœuds	DFE	2 nœuds + DFE	Floraison	Standard	Contrainte	Non	Oui
Saint-Sulpice 2015	10	10	X	X	X		X				X		X
Mervilla 2016 - 1	4	24	X	X	X	X	X		X	X	X	X	
Mervilla 2016 - 2	4	24	X	X	X	X	X		X	X	X	X	
Rebigue 2017 - 1	4	16	X	X	X			X		X	X	X	X
Rebigue 2017 - 2	4	16	X	X	X			X		X	X	X	X
Saint-Sulpice 2017	4	12	X	X		X	X	X		X		X	

N : nombre de répétitions par modalité, n : nombre de répétitions par biostimulant

Compte-tenu du fait que, pour des raisons opérationnelles, l'ensemble des facteurs ne sont pas testés sur tous les sites, une analyse de variance est conduite pour chaque essai indépendamment (Tableau 7). Pour chaque essai, on s'intéresse à l'effet des facteurs listés ci-dessus sur les variables suivantes : rendement en grains, teneur en protéines, quantité de protéines et poids de mille grains (PMG). Les biomasses de grains sont ramenées à 15 % d'humidité, ce qui est la norme en agronomie. Les valeurs moyennes de chacune de ces

variables sont présentées pour chaque site dans les Tableau 8 et Tableau 9, en fonction uniquement du facteur Biostimulant. Le détail des données pour toutes les modalités de facteurs testées est présenté en Annexe.

Dans un premier temps, une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée pour chaque essai indépendamment pour évaluer l'impact de chaque biostimulant sur les composantes du rendement mais aussi l'impact du stade d'application des biostimulants, du niveau de fertilisation ou d'un apport d'azote foliaire. Les résultats issus de cette analyse mettent en évidence un effet significatif (p -value < 0.001) et prépondérant (F-ratio de 8 à 2601 fois supérieur aux F-ratios des autres facteurs) de la fertilisation (Mervilla 1, Mervilla 2, Rebigue 1, Rebigue 2). Le fort effet de la fertilisation azotée sur les composantes du rendement et sur le contenu en protéines du grain est bien illustré dans la littérature (Liu et al., 2016; Mon et al., 2016; Terman et al., 1969). Cet effet pourrait masquer un effet plus subtil des biostimulants et milite donc pour des analyses plus fines en distinguant les modalités menées en fertilisation conventionnelle ou sous contrainte azotée pour les quatre sites. De ce fait, des ANOVAs ont été réalisées en séparant les modalités conduites en fertilisation standard et sous contrainte azotée (Tableau 8, Tableau 9). Sur chaque site et pour chaque modalité, les biostimulants n'ont pas d'effet significatif (Tableau 8, Tableau 9) à l'exception du poids de mille grains en fertilisation standard à Mervilla 1. Des effets d'un biostimulant à base d'extrait d'algues sur le poids de mille grains ont été reportés sur blé cultivé en serre (Zodape et al., 2012) mais cet effet dépend de la dose d'application du biostimulant. Dans leur étude sur les biostimulants, (Faessel et al., 2014) précisent que l'efficacité des biostimulants est fonction des conditions expérimentales. L'effet des biostimulants sur le poids de mille grains pourrait donc dépendre des conditions expérimentales et ne s'exprimer ici que sur l'essai de Mervilla 1.

Une augmentation du rendement non significative en fertilisation standard se retrouve pour tous les essais avec DPI4913 (+ 2.0 % en moyenne) et à 5 essais sur 9 avec AF086 (+ 1.0 % en moyenne). En contrainte azotée, cette tendance est très atténuée avec DPI4913 (+ 0.6 % en moyenne) et inexistante avec AF086 (- 0.3 % en moyenne). Une augmentation est également observée pour la quantité de protéines dans les grains avec DPI4913 pour 8 essais sur 10 (+ 1.8 % en moyenne en fertilisation standard et + 1.1 % en contrainte azotée) et pour 3 essais sur 9 pour AF086 en fertilisation standard (+ 0.8 %). Sous contrainte azotée, AF086 a un impact négatif sur cette variable (- 1.3 %). L'observation quasi systématique d'une

augmentation non significative du rendement et de la quantité de protéines avec DPI4913 peut s'expliquer par la variabilité des valeurs au sein de chaque site. En effet, en prenant par exemple le site de Mervilla 1 en fertilisation standard, les écart-types pour les modalités Contrôle, DPI4913 et AF086 sont proches de 10 Qx/ha tandis que les rendements sont proches de 85 Qx/ha et les écarts entre biostimulants et Contrôle de l'ordre de 2 Qx/ha.

Le stade d'application des biostimulants influence significativement les composantes du rendement en contrainte azotée : effet de DPI4913 sur le rendement et la quantité de protéines sur l'essai de Mervilla 1, et effet de AF086 sur la teneur en protéines sur l'essai de Mervilla 2. Cet impact du stade d'application est surprenant car il n'est pas associé à un effet significatif du facteur biostimulant. Nous supposons donc que la puissance de test statistique est trop faible pour mettre en évidence un effet du facteur biostimulant.

L'application d'azote foliaire AF001 à floraison a un effet significatif sur la teneur en protéines dans les grains en condition de contrainte azotée ou sur la quantité de protéines dans les grains en condition de fertilisation standard (Rebigue 1). L'apport d'azote foliaire en fin de cycle est reconnu pour avoir un impact sur le contenu en protéines du grain (Bly and Woodard, 2003; Woolfolk et al., 2002).

Afin de déterminer si les différents facteurs testés ont un impact sur l'efficacité des biostimulants, les interactions entre [Stade d'application x Biostimulant], [Fertilisation x Biostimulant] et [N foliaire x Biostimulant] ont également été étudiées. Elles ne sont globalement pas significatives. Sur l'ensemble de l'étude, seules trois interactions sont significatives : [Biostimulant DPI4913 x Stade] pour la teneur en protéines à Mervilla 2 en contrainte azotée, [Biostimulant AF086 x Stade] pour le poids de mille grains à Mervilla 1 et Mervilla 2 en contrainte azotée.

A l'issue de cette première étape d'analyse statistique "site par site" de l'impact des facteurs spécifiques à chaque site sur plusieurs variables agronomiques, une augmentation du rendement et de la quantité de protéines est observée suite à l'application de biostimulants, notamment DPI4913 en condition de fertilisation standard. Toutefois, les écarts ne sont pas statistiquement significatifs.

Tableau 8 : Variation du rendement, de la teneur en protéines, de la quantité de protéines et du poids de mille grains en fonction de la nature du biostimulant DPI4913, du stade d'application, de l'apport d'azote foliaire et du bloc d'origine pour différents sites d'essai au champ

Variable	N	Moyenne ± Ecart type		ANOVA											
		Contrôle	DPI4913	Biostimulant		Stade		N foliaire		Bloc		Biostimulants x Stade		Biostimulants x N foliaire	
				p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio
Saint-Sulpice 2015 - Fertilisation standard														20	
Rendement (Qx.ha-1)		83,80 ± 3,07	85,30 ± 6,15	ns	0,46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Teneur en protéines (%)		11,26 ± 0,09	11,26 ± 0,09	ns	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		9,43 ± 0,37	9,60 ± 0,72	ns	0,43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Poids de mille grains (g)		49,01 ± 2,70	49,26 ± 1,72	ns	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mervilla 1 - Fertilisation standard														24	
Rendement (Qx.ha-1)		84,60 ± 9,80	88,00 ± 7,00	ns	1,98	ns	0,98	-	-	**	9,05	ns	0,05	-	-
Teneur en protéines (%)		12,98 ± 0,40	12,91 ± 0,51	ns	0,30	ns	0,59	-	-	**	7,30	ns	0,06	-	-
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		10,90 ± 1,10	11,40 ± 0,70	ns	1,82	ns	1,71	-	-	*	4,92	ns	0,11	-	-
Poids de mille grains (g)		37,30 ± 2,80	39,50 ± 2,30	*	4,77	ns	0,64	-	-	ns	2,32	ns	1,57	-	-
Mervilla 1 - Contrainte azotée														24	
Rendement (Qx.ha-1)		70,50 ± 4,30	70,80 ± 4,70	ns	0,03	*	4,07	-	-	ns	2,42	ns	2,34	-	-
Teneur en protéines (%)		12,23 ± 0,61	12,03 ± 0,70	ns	0,78	ns	1,76	-	-	*	3,54	ns	0,56	-	-
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		8,60 ± 0,70	8,50 ± 1,00	ns	0,20	*	5,40	-	-	*	5,03	ns	2,62	-	-
Poids de mille grains (g)		38,30 ± 1,70	39,80 ± 3,80	ns	2,00	ns	2,38	-	-	ns	1,77	ns	0,30	-	-
Mervilla 2 - Fertilisation standard														24	
Rendement (Qx.ha-1)		91,00 ± 8,30	93,90 ± 7,40	ns	1,08	ns	0,99	-	-	*	3,65	ns	0,22	-	-
Teneur en protéines (%)		12,34 ± 0,59	12,40 ± 0,60	ns	0,10	ns	0,58	-	-	**	7,23	ns	0,51	-	-
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		11,30 ± 1,30	11,70 ± 1,10	ns	0,74	ns	0,29	-	-	*	3,40	ns	0,03	-	-
Poids de mille grains (g)		39,90 ± 3,00	39,40 ± 4,00	ns	0,08	ns	0,56	-	-	*	3,60	ns	0,06	-	-
Mervilla 2 - Contrainte azotée														24	
Rendement (Qx.ha-1)		81,80 ± 4,30	82,40 ± 5,40	ns	0,07	ns	0,13	-	-	ns	0,27	ns	0,03	-	-
Teneur en protéines (%)		11,38 ± 0,33	11,38 ± 0,47	ns	0,01	ns	3,17	-	-	ns	2,05	*	4,31	-	-
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		9,30 ± 0,60	9,40 ± 0,80	ns	0,02	ns	0,52	-	-	ns	0,68	ns	0,66	-	-
Poids de mille grains (g)		39,70 ± 2,40	40,60 ± 1,80	ns	1,09	ns	0,42	-	-	**	2,22	ns	0,91	-	-
Rebigue 1 - Fertilisation standard														16	
Rendement (Qx.ha-1)		85,59 ± 2,78	85,74 ± 2,58	ns	0,02	-	-	ns	0,59	*	4,51	-	-	ns	0,21
Teneur en protéines (%)		14,20 ± 0,62	14,29 ± 0,44	ns	0,22	-	-	ns	3,39	ns	1,29	-	-	ns	3,72
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		12,15 ± 0,62	12,25 ± 0,59	ns	0,20	-	-	ns	4,11	ns	3,57	-	-	ns	1,83
Poids de mille grains (g)		57,71 ± 1,71	58,46 ± 1,56	ns	0,83	-	-	ns	2,32	ns	0,22	-	-	ns	2,03
Rebigue 1 - Contrainte azotée														16	
Rendement (Qx.ha-1)		72,89 ± 6,76	73,38 ± 6,57	ns	0,17	-	-	ns	1,78	***	31,84	-	-	ns	3,71
Teneur en protéines (%)		11,18 ± 0,26	11,30 ± 0,50	ns	0,57	-	-	ns	2,42	*	5,51	-	-	ns	0,07
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		8,16 ± 0,93	8,33 ± 1,10	ns	0,61	-	-	ns	2,61	***	22,99	-	-	ns	1,89
Poids de mille grains (g)		56,53 ± 0,73	55,83 ± 0,68	ns	3,97	-	-	ns	0,00	ns	1,22	-	-	ns	1,47
Rebigue 2 - Fertilisation standard														16	
Rendement (Qx.ha-1)		86,41 ± 1,79	87,76 ± 3,89	ns	1,06	-	-	ns	0,00	ns	2,62	-	-	ns	1,89
Teneur en protéines (%)		14,48 ± 0,55	14,11 ± 0,49	ns	3,32	-	-	ns	3,00	*	3,84	-	-	ns	1,54
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		12,51 ± 0,61	12,38 ± 0,62	ns	0,43	-	-	ns	1,57	*	6,43	-	-	ns	0,00
Poids de mille grains (g)		57,03 ± 1,29	57,76 ± 1,32	ns	2,91	-	-	ns	0,08	**	7,12	-	-	ns	1,56
Rebigue 2 - Contrainte azotée														16	
Rendement (Qx.ha-1)		78,34 ± 4,83	78,78 ± 6,02	ns	0,03	-	-	ns	0,00	ns	2,33	-	-	ns	0,10
Teneur en protéines (%)		11,20 ± 0,47	11,30 ± 0,58	ns	0,14	-	-	ns	2,75	ns	0,98	-	-	ns	0,27
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		8,79 ± 0,85	8,91 ± 0,93	ns	0,08	-	-	ns	0,55	ns	1,71	-	-	ns	0,00
Poids de mille grains (g)		56,74 ± 0,58	55,88 ± 1,82	ns	1,83	-	-	ns	0,41	ns	1,49	-	-	ns	1,99
Saint-Sulpice 2017 - Fertilisation standard														24	
Rendement (Qx.ha-1)		87,29 ± 4,23	88,22 ± 2,88	ns	0,33	ns	0,16	-	-	-	ns	0,07	-	-	-
Teneur en protéines (%)		14,80 ± 0,42	14,81 ± 0,42	ns	0,00	ns	0,93	-	-	-	ns	0,20	-	-	-
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		12,92 ± 0,76	13,06 ± 0,54	ns	0,23	ns	0,19	-	-	-	ns	0,02	-	-	-
Poids de mille grains (g)		53,31 ± 2,33	52,21 ± 2,42	ns	1,10	ns	0,09	-	-	-	ns	0,37	-	-	-

N : nombre de microparcelles par essai

ns : non significatif, * significatif à P < 0,05, ** significatif à P < 0,01, *** significatif à P < 0,001

Tableau 9 : Variation du rendement, de la teneur en protéines, de la quantité de protéines et du poids de mille grains en fonction de la nature du biostimulant AF086, du stade d'application, de l'apport d'azote foliaire et du bloc d'origine pour différents sites d'essai au champ

Variable	N	Moyenne ± Ecart type		ANOVA											
		Contrôle	AF086	Biostimulant		Stade		N foliaire		Bloc		Biostimulants x Stade		Biostimulants x N foliaire	
				p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio
Saint-Sulpice 2015 - Fertilisation standard														20	
Rendement (Qx.ha-1)		83,80 ± 3,07	87,15 ± 5,02	ns	3,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Teneur en protéines (%)		11,26 ± 0,09	11,20 ± 0,10	ns	1,95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		9,43 ± 0,37	9,75 ± 0,60	ns	2,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Poids de mille grains (g)		49,01 ± 2,70	49,57 ± 3,34	ns	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Mervilla 1 - Fertilisation standard														24	
Rendement (Qx.ha-1)		84,60 ± 9,80	86,50 ± 5,60	ns	0,83	ns	1,05	-	-	***	12,36	ns	0,16	-	
Teneur en protéines (%)		12,98 ± 0,40	12,87 ± 0,49	ns	0,46	ns	0,77	-	-	ns	2,11	ns	0,02	-	
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		10,90 ± 1,10	11,10 ± 0,70	ns	0,54	ns	2,61	-	-	***	9,61	ns	0,19	-	
Poids de mille grains (g)		37,30 ± 2,80	37,90 ± 3,10	ns	0,22	ns	1,26	-	-	ns	1,36	ns	0,06	-	
Mervilla 1 - Contrainte azotée														24	
Rendement (Qx.ha-1)		70,50 ± 4,30	72,20 ± 3,50	ns	0,93	ns	1,48	-	-	ns	0,73	ns	0,31	-	
Teneur en protéines (%)		12,23 ± 0,61	12,18 ± 0,59	ns	0,05	ns	2,39	-	-	**	5,62	ns	0,06	-	
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		8,60 ± 0,70	8,80 ± 0,70	ns	0,50	ns	3,32	-	-	ns	3,12	ns	0,38	-	
Poids de mille grains (g)		38,30 ± 1,70	37,50 ± 2,30	ns	2,51	ns	2,06	-	-	***	10,78	*	5,15	-	
Mervilla 2 - Fertilisation standard														24	
Rendement (Qx.ha-1)		91,00 ± 8,30	90,60 ± 8,70	ns	0,01	ns	0,11	-	-	ns	1,47	ns	1,14	-	
Teneur en protéines (%)		12,34 ± 0,59	12,54 ± 0,80	ns	1,11	*	3,94	-	-	***	13,60	ns	1,60	-	
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		11,30 ± 1,30	11,30 ± 1,10	ns	0,02	ns	0,43	-	-	ns	0,90	ns	1,22	-	
Poids de mille grains (g)		39,90 ± 3,00	40,80 ± 2,90	ns	0,78	ns	0,82	-	-	*	3,38	ns	0,05	-	
Mervilla 2 - Contrainte azotée														24	
Rendement (Qx.ha-1)		81,80 ± 4,30	82,70 ± 4,90	ns	0,25	ns	1,78	-	-	ns	0,59	ns	0,87	-	
Teneur en protéines (%)		11,38 ± 0,33	11,54 ± 0,22	ns	1,99	ns	2,04	-	-	ns	0,60	ns	0,24	-	
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		9,30 ± 0,60	9,60 ± 0,70	ns	0,83	ns	2,97	-	-	ns	0,45	ns	0,89	-	
Poids de mille grains (g)		39,70 ± 2,40	39,80 ± 3,50	ns	0,05	ns	0,55	-	-	**	9,01	*	5,31	-	
Rebigue 1 - Fertilisation standard														16	
Rendement (Qx.ha-1)		85,59 ± 2,78	85,66 ± 3,68	ns	0,00	-	-	ns	2,60	ns	1,47	-	-	ns	1,93
Teneur en protéines (%)		14,20 ± 0,62	14,15 ± 0,49	ns	0,03	-	-	ns	4,24	ns	1,05	-	-	ns	1,93
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		12,15 ± 0,62	12,13 ± 0,66	ns	0,01	-	-	*	8,27	ns	1,71	-	-	ns	0,01
Poids de mille grains (g)		57,71 ± 1,71	58,48 ± 1,41	ns	0,94	-	-	ns	2,30	ns	0,12	-	-	ns	2,48
Rebigue 1 - Contrainte azotée														16	
Rendement (Qx.ha-1)		72,89 ± 6,76	72,63 ± 6,01	ns	0,02	-	-	ns	1,42	**	12,06	-	-	ns	1,10
Teneur en protéines (%)		11,18 ± 0,26	11,18 ± 0,41	ns	0,01	-	-	*	5,99	*	4,12	-	-	ns	0,18
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		8,16 ± 0,93	8,13 ± 0,95	ns	0,02	-	-	ns	2,73	**	10,50	-	-	ns	0,50
Poids de mille grains (g)		56,53 ± 0,73	56,56 ± 1,04	ns	0,01	-	-	ns	3,69	ns	1,48	-	-	ns	0,83
Rebigue 2 - Fertilisation standard														16	
Rendement (Qx.ha-1)		86,41 ± 1,79	85,65 ± 4,42	ns	0,29	-	-	ns	3,05	ns	2,58	-	-	ns	0,24
Teneur en protéines (%)		14,48 ± 0,55	14,44 ± 0,50	ns	0,02	-	-	ns	0,05	*	4,03	-	-	ns	0,48
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		12,51 ± 0,61	12,38 ± 0,89	ns	0,22	-	-	ns	0,80	*	4,62	-	-	ns	0,00
Poids de mille grains (g)		57,03 ± 1,29	57,08 ± 1,33	ns	0,01	-	-	ns	0,27	ns	1,47	-	-	ns	0,25
Rebigue 2 - Contrainte azotée														16	
Rendement (Qx.ha-1)		78,34 ± 4,83	74,90 ± 4,40	ns	1,74	-	-	ns	0,15	ns	0,61	-	-	ns	0,01
Teneur en protéines (%)		11,20 ± 0,47	10,96 ± 0,20	ns	1,72	-	-	ns	1,04	ns	1,62	-	-	ns	0,34
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		8,79 ± 0,85	8,20 ± 0,55	ns	2,06	-	-	ns	0,41	ns	0,45	-	-	ns	0,02
Poids de mille grains (g)		56,74 ± 0,58	56,45 ± 0,57	ns	0,83	-	-	ns	0,46	ns	0,69	-	-	ns	2,30

N : nombre de microparcelles par essai ns : non significatif, * significatif à P < 0,05, ** significatif à P < 0,01, *** significatif à P < 0,001

Au vu de la variabilité des données au sein de chaque site (significativité presque systématique de l'effet bloc), nous supposons que les biostimulants ont un effet sur le rendement et la quantité de protéines mais que la puissance des analyses statistiques site par site ne permet pas de le mettre en évidence. Il est possible d'augmenter la puissance du test statistique en augmentant la taille de l'échantillon, c'est-à-dire le nombre de répétitions, à travers la réalisation d'une étude multisite pour laquelle les facteurs sont communs à tous les sites d'essai. En ce sens, et en l'absence d'interactions fortes des facteurs Stade d'application, Fertilisation, N foliaire avec le facteur Biostimulant, une étude multisite plus globale a été réalisée en s'affranchissant de ces facteurs et en ne conservant que les facteurs Biostimulant et Bloc communs à tous les sites. Comme la fertilisation a un effet significatif fort en comparaison avec les autres facteurs, deux études multisite ont été menées, visant à étudier l'impact de chacun des biostimulants sur le rendement, la teneur en protéines, la quantité de protéines et le PMG en conditions de fertilisation standard, et en conditions de contrainte azotée (Tableau 10).

En conditions de fertilisation standard, DPI4913 augmente de manière significative le rendement (+ 2.3 %) et la quantité de protéines dans les grains (+ 2.4 %). A contrario, la teneur en protéines et le PMG ne sont pas affectés par son application. AF086 diminue de manière significative la teneur en protéines (- 2.8 %) mais n'affecte significativement ni le rendement, ni la quantité de protéines ou le PMG. AF086 conduit donc à une dilution des protéines caractérisée par augmentation du rendement (+ 0.9 %, non significatif) et de la quantité de protéines (+ 2.1 %, non significatif). Il existe une relation négative entre le rendement en grains et la teneur en protéines (Kibite and Evans, 1984).

En conditions de contrainte azotée, DPI4913 et AF086 n'ont pas d'effet significatif sur les variables mesurées. Pour les deux niveaux de fertilisation, le facteur Site a un effet significatif sur toutes les variables étudiées. C'est le cas également pour le facteur Bloc, à quelques exceptions près. Aucune interaction n'est significative. Ainsi, le site n'a pas d'effet sur l'efficacité des biostimulants sur les variables mesurées.

Tableau 10 : Variation du rendement, de la teneur en protéines, de la quantité de protéines et du poids de mille grains en fonction de la nature du biostimulant (a – DPI4913 et b – AF086) selon le niveau de fertilisation (fertilisation standard et contrainte azotée) pour un ensemble d'essais au champ

Variable	N	Moyenne ± Ecart type		ANOVA									
		Contrôle	DPI4913	DPI4913		Site		Bloc		DPI4913 x Site		DPI4913 x Bloc	
				p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio
Multisite - Fertilisation standard													
Rendement (Qx.ha-1)	172	86,58 ± 6,47	88,55 ± 6,06	*	5,3	***	7,5	***	6,1	ns	0,3	ns	1,1
Teneur en protéines (%)		13,28 ± 1,35	13,31 ± 1,28	ns	0,5	***	309,6	***	6,8	ns	0,7	ns	1,2
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		11,50 ± 1,45	11,78 ± 1,27	*	4,5	***	56,3	***	4,3	ns	0,4	ns	0,7
Poids de mille grains (g)		47,97 ± 8,36	48,29 ± 8,20	ns	0,5	***	255,1	*	2,4	ns	1,3	ns	0,4
Multisite - Contrainte azotée													
Rendement (Qx.ha-1)	120	75,94 ± 6,74	76,38 ± 7,24	ns	0,2	***	28,8	**	3,3	ns	0,0	ns	0,6
Teneur en protéines (%)		11,56 ± 0,63	11,54 ± 0,64	ns	0,0	***	16,8	*	2,4	ns	0,5	ns	1,3
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		8,78 ± 0,84	8,82 ± 1,01	ns	0,1	***	8,3	***	3,5	ns	0,1	ns	0,9
Poids de mille grains (g)		46,07 ± 8,90	46,46 ± 8,13	ns	0,4	***	513,7	ns	1,5	ns	1,8	ns	0,7

N : nombre de microparcelles ns : non significatif, * significatif à P < 0.05, ** significatif à P < 0.01, *** significatif à P < 0.001

Variable	N	Moyenne ± Ecart type		ANOVA									
		Contrôle	AF086	AF086		Site		Bloc		AF086 x Site		AF086 x Bloc	
				p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio
Multisite - Fertilisation standard													
Rendement (Qx.ha-1)	172	86,58 ± 6,47	87,33 ± 6,09	ns	0,7	**	4,3	***	5,0	ns	0,7	*	2,4
Teneur en protéines (%)		13,28 ± 1,35	12,91 ± 1,24	***	22,4	***	222,3	***	6,0	ns	0,6	ns	0,7
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		11,50 ± 1,45	11,26 ± 1,18	ns	2,8	***	43,2	**	3,1	ns	0,3	ns	1,5
Poids de mille grains (g)		47,97 ± 8,36	47,30 ± 8,69	ns	1,9	***	219,9	ns	1,5	ns	0,1	ns	0,5
Multisite - Contrainte azotée													
Rendement (Qx.ha-1)	120	75,94 ± 6,74	75,97 ± 6,43	ns	< 0.01	***	30,9	**	2,6	ns	1,3	ns	1,3
Teneur en protéines (%)		11,56 ± 0,63	11,54 ± 0,61	ns	0,0	***	44,6	***	3,7	ns	1,2	ns	1,9
Quantité de protéines (Qx.ha-1)		8,78 ± 0,84	8,77 ± 0,91	ns	< 0.01	***	15,0	**	2,8	ns	1,6	ns	1,4
Poids de mille grains (g)		46,07 ± 8,90	45,81 ± 9,17	ns	0,5	***	730,4	***	4,5	ns	0,4	ns	0,6

N : nombre de microparcelles ns : non significatif, * significatif à P < 0.05, ** significatif à P < 0.01, *** significatif à P < 0.001

2 Essai en serre

Afin de limiter la variabilité liée au contexte pédoclimatique et aux itinéraires techniques, un essai en conditions contrôlées en serre a été mené, selon un dispositif conçu en 9 blocs de répétition. Ce protocole est décrit au paragraphe 2.2. Dans cet essai, l'impact de chaque biostimulant a été testé, en fonction du stade d'application et de la contrainte hydrique.

L'objectif était de déterminer l'effet sur des variables reflétant i) la croissance (biomasse totale, des parties aériennes (PA), des parties racinaires (PR), et le ratio PA/PR) et ii) le rendement (biomasse des épis et des grains par épi, nombre de grains par épi, poids de mille grains). Une analyse de variance (ANOVA) globale a été réalisée en prenant en compte tous les facteurs et combinaisons de facteurs (Tableau 11).

Toutes modalités confondues, les biostimulants n'ont pas d'effet significatif sur la croissance et le rendement. Toutefois, on constate une augmentation systématique de l'ensemble des variables liées à la croissance et au rendement pour les deux biostimulants. Un effet significatif et prédominant du facteur Irrigation apparaît (F-ratios élevés). Le stade d'application du biostimulant DPI4913 impacte également significativement toutes les variables concernant la biomasse, tandis que le stade d'application du biostimulant AF086 n'affecte que le nombre de grains par épi. Cet effet du stade d'application est surprenant car il n'est pas corrélé à un effet significatif des biostimulants. Nous supposons donc que la variabilité est trop élevée (ratio moyenne / écart-type compris entre deux et sept) pour mettre en évidence un effet du facteur biostimulant. Enfin, il apparaît que le facteur bloc a un effet significatif sur toutes les variables, bien que nettement inférieur à celui de l'irrigation, mettant en exergue une hétérogénéité des conditions environnementales au sein de la serre (emplacement des pots). Des mesures de lumière et d'humidité ont été faites et montrent un gradient de ces variables en fonction de l'emplacement dans la serre.

Les principaux résultats mis en avant par cette analyse préliminaire sont que, toutes modalités confondues, les biostimulants n'ont pas d'effet significatif sur les variables liées à la croissance et au rendement, bien qu'une tendance systématique à l'augmentation de ces variables soit observée. Le stade d'application a un effet significatif dans plusieurs situations. Les résultats mettent en exergue un effet prédominant de la modalité d'irrigation (F-ratios élevés) et de l'emplacement des pots dans la serre (effet bloc).

Nos premiers résultats militent pour une analyse plus fine. Une ANOVA a été réalisée en distinguant les niveaux d'irrigation et le stade d'application de chaque biostimulant (Tableau 12, Tableau 13). Les résultats montrent que les biostimulants ont peu d'effet sur la croissance et le rendement en conditions de contrainte hydrique. Seule une diminution pour certaines variables apparaît : i) le nombre de grains par épi avec DPI4913 appliqué à 2 nœuds ou DFE et avec AF086 appliqué à floraison, ii) la biomasse des parties aériennes avec DPI4913 appliqué à DFE ou à floraison, iii) la biomasse de grains par épi avec DPI4913 appliqué à DFE. Les biostimulants ont donc peu d'effet, voire des effets négatifs en conditions de contrainte hydrique.

En condition d'irrigation standard, les biostimulants ont des effets principalement pour une application au stade 2 nœuds. Ces effets portent sur la biomasse sèche totale (+ 19.7 % et + 19.3 % pour DPI4913 et AF086), la biomasse sèche des parties aériennes (+ 19.5 % et + 17.8 % pour DPI4913 et AF086), la biomasse sèche des parties racinaires (+ 32.1 % pour AF086, non significatif pour DPI4913), la biomasse sèche des grains par épi (+ 23.9 % pour DPI4913 et + 20.4 % pour AF086), le nombre de grains par épi (+ 18.3 % pour DPI4913 et + 17.8 % pour AF086), et le PMG (+ 5.9 % et + 2.7 % pour DPI4913 et AF086). Après une application au stade DFE, aucun effet de DPI4913 n'est noté, et seul le nombre de grains par épi est affecté par l'application de AF086 (+ 9.3 %). Après une application au stade floraison, un effet significatif de DPI4913 sur le nombre de grains par épi (+ 12.6 %) est observé, ce qui est surprenant puisqu'au stade floraison, le nombre de grains par épi est déjà fixé. Des effets d'un biostimulant commercial à base d'extrait d'algues sur le nombre de grains par épi ont également été reporté par (Szczepanek et al., 2015). AF086 et DPI4913 pourraient donc avoir un effet sur la fertilité de l'épi. Aussi, pour une application au stade floraison, la biomasse des parties aériennes et des grains par épi est significativement augmentée (respectivement + 10.4 % et + 12.4 %). Cette augmentation est moins importante que pour une application au stade 2 nœuds, et elle ne concerne que DPI4913.

Tableau 11 : Variation de la Biomasse sèche totale, de la Biomasse des PA, de la Biomasse des PR, de la Biomasse de grains par épi, du nombre de grains par épi et du poids de mille grains en fonction de la nature du traitement biostimulant (a – DPI4913 et b – AF086), du stade d'application, du niveau d'irrigation et du bloc d'origine pour l'essai en serre mené au cours de la campagne 2016

a)

N	Moyenne ± Ecart type		ANOVA													
	Contrôle	DPI4913	Biostimulants		Irrigation		Stade		Bloc		Biostimulants x Irrigation		Biostimulants x Stade		Biostimulants x Bloc	
			p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio
Serre																
Tous stades et niveaux d'irrigation	378															
Biomasse totale (g)	2,40 ± 0,61	2,48 ± 0,73	ns	1,57 ***	249,78	**	6,05 ***	12,74	**	9,86	*	3,10	ns	0,99		
Biomasse PA (g)	2,15 ± 0,55	2,21 ± 0,66	ns	0,27 ***	291,10	**	5,33 ***	13,05	***	13,41	ns	2,75	ns	1,29		
Biomasse PR (g)	0,26 ± 0,11	0,28 ± 0,13	ns	1,01 ***	12,95	*	3,05 ***	4,95	ns	0,03	ns	1,55	ns	0,95		
Biomasse grains par épi (g)	0,97 ± 0,33	1,01 ± 0,39	ns	1,22 ***	279,72	**	5,46 ***	11,81	***	11,55	ns	0,26	ns	1,44		
Nombre de grains par épi	27,24 ± 6,96	28,04 ± 9,33	ns	0,85 ***	272,88	ns	2,85 **	3,13	***	11,39	ns	1,53	ns	1,46		
Poids de mille grains (g)	35,41 ± 5,28	36,14 ± 6,09	ns	1,69 **	7,63	ns	1,63 ***	30,69	ns	0,00	ns	0,93	ns	1,13		

N : nombre de microparcelles ns : non significatif, * significatif à P < 0.05, ** significatif à P < 0.01, *** significatif à P < 0.001

b)

N	Moyenne ± Ecart type		ANOVA													
	Contrôle	AF086	Biostimulants		Irrigation		Stade		Bloc		Biostimulants x Irrigation		Biostimulants x Stade		Biostimulants x Bloc	
			p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio
Serre																
Tous stades et niveaux d'irrigation	378															
Biomasse totale (g)	2,40 ± 0,61	2,47 ± 0,70	ns	0,98 ***	186,28	ns	2,60 **	3,41	*	5,92	ns	10,05	**	2,70		
Biomasse PA (g)	2,15 ± 0,55	2,19 ± 0,65	ns	0,43 ***	205,49	ns	1,92 **	3,35	**	7,43	ns	1,05	**	3,34		
Biomasse PR (g)	0,26 ± 0,11	0,28 ± 0,13	ns	2,51 ***	16,35	ns	2,82 **	2,79	ns	0,01	ns	1,46	ns	0,57		
Biomasse grains par épi (g)	0,97 ± 0,33	0,99 ± 0,37	ns	0,32 ***	214,23	ns	2,36 ***	4,19	*	6,28	ns	1,25	***	3,78		
Nombre de grains par épi	27,24 ± 6,96	27,91 ± 8,95	ns	0,71 ***	283,19	*	3,60 *	2,62	**	9,55	ns	1,85	***	3,94		
Poids de mille grains (g)	35,41 ± 5,28	35,69 ± 5,87	ns	0,33 *	4,44	ns	0,84 ***	30,59	ns	0,18	ns	0,45	ns	1,41		

N : nombre de microparcelles ns : non significatif, * significatif à P < 0.05, ** significatif à P < 0.01, *** significatif à P < 0.001

Tableau 12 : Variation de la Biomasse sèche totale, de la Biomasse des parties aériennes (PA), de la Biomasse des parties racinaires (PR), de la Biomasse de grains par épi, du nombre de grains par épi et du poids de mille grains en fonction du biostimulant DPI4913 et du Bloc d'origine pour chaque stade d'application et niveau d'irrigation pour l'essai en serre mené au cours de la campagne 2016

	N	Moyenne ± Ecart type		ANOVA			
		Contrôle	DPI4913	Biostimulant		Bloc	
				p-value	F ratio	p-value	F ratio
Irrigation standard	108						
2 nœuds	36						
Biomasse totale (g)		2,69 ± 0,59 a	3,22 ± 0,64 b	***	14,00	**	3,88
Biomasse PA (g)		2,41 ± 0,53 a	2,88 ± 0,58 b	***	14,97	***	4,90
Biomasse PR (g)		0,28 ± 0,13 a	0,35 ± 0,19 a	ns	2,31	ns	1,72
Biomasse grains par épi (g)		1,13 ± 0,33 a	1,40 ± 0,38 b	***	12,89	**	4,19
Nombre de grains par épi		31 ± 6 a	37 ± 8 b	**	10,38	*	2,67
Poids de mille grains (g)		36,08 ± 5,84 a	38,20 ± 4,70 b	**	8,01	***	14,70
DFE							
Biomasse totale (g)	36	2,69 ± 0,59 a	2,79 ± 0,51 a	ns	0,62	***	4,67
Biomasse PA (g)		2,41 ± 0,53 a	2,51 ± 0,47 a	ns	0,81	***	4,76
Biomasse PR (g)		0,28 ± 0,13 a	0,28 ± 0,09 a	ns	0,04	ns	1,38
Biomasse grains par épi (g)		1,13 ± 0,33 a	1,17 ± 0,30 a	ns	0,40	**	4,18
Nombre de grains par épi		31 ± 6 a	33 ± 6 a	ns	0,83	ns	1,53
Poids de mille grains (g)		36,08 ± 5,84 a	36,33 ± 7,07 a	ns	0,05	***	11,42
Floraison	36						
Biomasse totale (g)		2,69 ± 0,59 a	2,92 ± 0,57 a	ns	3,76	***	5,63
Biomasse PA (g)		2,41 ± 0,53 a	2,66 ± 0,47 b	*	5,56	***	5,55
Biomasse PR (g)		0,28 ± 0,13 a	0,27 ± 0,14 a	ns	0,31	*	2,25
Biomasse grains par épi (g)		1,13 ± 0,33 a	1,27 ± 0,27 b	*	5,45	***	6,11
Nombre de grains par épi		31 ± 6 a	35 ± 5 b	*	6,16	ns	1,48
Poids de mille grains (g)		36,08 ± 5,84 a	36,24 ± 4,96 a	ns	0,04	***	15,72
Contrainte hydrique	108						
2 nœuds	36						
Biomasse totale (g)		2,11 ± 0,48 a	2,04 ± 0,51 a	ns	0,54	***	7,57
Biomasse PA (g)		1,88 ± 0,44 a	1,79 ± 0,43 a	ns	1,54	***	8,02
Biomasse PR (g)		0,23 ± 0,08 a	0,26 ± 0,11 a	ns	2,63	**	4,25
Biomasse grains par épi (g)		0,81 ± 0,26 a	0,76 ± 0,22 a	ns	1,56	***	8,10
Nombre de grains par épi		23 ± 5 b	21 ± 3 a	*	4,88	**	4,28
Poids de mille grains (g)		34,75 ± 4,66 a	35,68 ± 6,60 a	ns	0,83	***	8,71
DFE							
Biomasse totale (g)	36	2,11 ± 0,48 a	1,94 ± 0,46 a	ns	2,92	***	4,72
Biomasse PA (g)		1,88 ± 0,44 b	1,71 ± 0,39 a	*	4,43	***	5,31
Biomasse PR (g)		0,23 ± 0,08 a	0,23 ± 0,11 a	ns	0,07	*	2,33
Biomasse grains par épi (g)		0,81 ± 0,26 b	0,71 ± 0,21 a	*	4,74	***	5,84
Nombre de grains par épi		23 ± 5 b	21 ± 6 a	*	5,97	***	4,47
Poids de mille grains (g)		34,75 ± 4,66 a	35,25 ± 6,59 a	ns	0,19	***	5,92
Floraison	36						
Biomasse totale (g)		2,11 ± 0,48 a	1,97 ± 0,39 a	ns	2,34	***	5,22
Biomasse PA (g)		1,88 ± 0,44 b	1,72 ± 0,32 a	*	4,65	***	5,67
Biomasse PR (g)		0,23 ± 0,08 a	0,25 ± 0,12 a	ns	1,06	ns	2,06
Biomasse grains par épi (g)		0,81 ± 0,26 a	0,73 ± 0,20 a	ns	3,72	***	7,06
Nombre de grains par épi		23 ± 5 a	22 ± 7 a	ns	1,18	**	3,24
Poids de mille grains (g)		34,75 ± 4,66 a	35,13 ± 6,31 a	ns	0,10	***	4,44

N : nombre de pots ns : non significatif, * significatif à P < 0.05, ** significatif à P < 0.01, *** significatif à P < 0.001
 Note : Les lettres en minuscule indiquent une différence statistiquement significative (P < 0.05) entre les traitements

Tableau 13 : Variation de la Biomasse sèche totale, de la Biomasse des parties aériennes (PA), de la Biomasse des parties racinaires (PR), de la Biomasse de grains par épi, du nombre de grains par épi et du poids de mille grains en fonction du biostimulant AF086 et du Bloc d'origine pour chaque stade d'application et niveau d'irrigation pour l'essai en serre mené au cours de la campagne 2016

	N	Moyenne ± Ecart type		ANOVA					
		Contrôle	AF086	Biostimulant		Bloc			
				p-value	F ratio	p-value	F ratio		
Irrigation standard	108								
2 nœuds	36								
Biomasse totale (g)		2,69 ± 0,59 a	3,21 ± 0,65 b	***	13,42	ns	1,79		
Biomasse PA (g)		2,41 ± 0,53 a	2,84 ± 0,61 b	**	11,93	ns	2,09		
Biomasse PR (g)		0,28 ± 0,13 a	0,37 ± 0,16 b	*	5,93	ns	2,12		
Biomasse grains par épi (g)		1,13 ± 0,33 a	1,36 ± 0,36 b	**	10,14	*	2,30		
Nombre de grains par épi		31 ± 6 a	37 ± 7 b	**	11,54	ns	0,56		
Poids de mille grains (g)		36,08 ± 5,84 a	37,04 ± 4,78 a	ns	1,61	***	14,19		
DFE									
Biomasse totale (g)	36	2,69 ± 0,59 a	2,81 ± 0,51 a	ns	1,17	***	5,04		
Biomasse PA (g)		2,41 ± 0,53 a	2,54 ± 0,47 a	ns	1,79	***	5,94		
Biomasse PR (g)		0,28 ± 0,13 a	0,28 ± 0,12 a	ns	0,06	ns	1,28		
Biomasse grains par épi (g)		1,13 ± 0,33 a	1,21 ± 0,28 a	ns	1,99	***	5,92		
Nombre de grains par épi		31 ± 6 a	34 ± 6 b	*	4,26	*	2,21		
Poids de mille grains (g)		36,08 ± 5,84 a	35,81 ± 6,02 a	ns	0,10	***	16,26		
Floraison	36								
Biomasse totale (g)		2,69 ± 0,59 a	2,78 ± 0,52 a	ns	0,43	ns	1,82		
Biomasse PA (g)		2,41 ± 0,53 a	2,49 ± 0,44 a	ns	0,45	ns	1,81		
Biomasse PR (g)		0,28 ± 0,13 a	0,30 ± 0,13 a	ns	0,08	ns	1,30		
Biomasse grains par épi (g)		1,13 ± 0,33 a	1,14 ± 0,23 a	ns	0,03	ns	2,05		
Nombre de grains par épi		31 ± 6 a	32 ± 5 a	ns	0,45	ns	0,93		
Poids de mille grains (g)		36,08 ± 5,84 a	35,74 ± 5,42 a	ns	0,15	***	13,53		
Contrainte hydrique	108								
2 nœuds	36								
Biomasse totale (g)		2,11 ± 0,48 a	1,96 ± 0,48 a	ns	1,91	**	3,54		
Biomasse PA (g)		1,88 ± 0,44 a	1,71 ± 0,44 a	ns	3,19	**	3,63		
Biomasse PR (g)		0,23 ± 0,08 a	0,25 ± 0,10 a	ns	0,96	ns	0,96		
Biomasse grains par épi (g)		0,81 ± 0,26 a	0,70 ± 0,26 a	ns	3,57	**	4,01		
Nombre de grains par épi		23 ± 5 a	22 ± 6 a	ns	1,54	*	2,76		
Poids de mille grains (g)		34,75 ± 4,66 a	33,27 ± 6,42 a	ns	1,56	***	4,78		
DFE									
Biomasse totale (g)	36	2,11 ± 0,48 a	2,01 ± 0,43 a	ns	0,77	*	2,65		
Biomasse PA (g)		1,88 ± 0,44 a	1,76 ± 0,39 a	ns	1,49	*	2,91		
Biomasse PR (g)		0,23 ± 0,08 a	0,25 ± 0,11 a	ns	0,67	ns	1,42		
Biomasse grains par épi (g)		0,81 ± 0,26 a	0,77 ± 0,20 a	ns	0,40	**	3,28		
Nombre de grains par épi		23 ± 5 a	22 ± 5 a	ns	1,21	*	2,28		
Poids de mille grains (g)		34,75 ± 4,66 a	36,15 ± 6,89 a	ns	1,95	***	10,09		
Floraison	36								
Biomasse totale (g)		2,11 ± 0,48 a	2,04 ± 0,48 a	ns	0,57	**	3,51		
Biomasse PA (g)		1,88 ± 0,44 a	1,78 ± 0,45 a	ns	1,57	**	3,97		
Biomasse PR (g)		0,23 ± 0,08 a	0,26 ± 0,08 a	ns	2,29	ns	0,66		
Biomasse grains par épi (g)		0,81 ± 0,26 a	0,74 ± 0,25 a	ns	2,46	***	4,69		
Nombre de grains par épi		23 ± 5 b	21 ± 7 a	*	5,38	***	6,99		
Poids de mille grains (g)		34,75 ± 4,66 a	36,10 ± 5,25 a	ns	1,66	**	4,08		

N : nombre de pots ns : non significatif, * significatif à P < 0.05, ** significatif à P < 0.01, *** significatif à P < 0.001
 Note : Les lettres en minuscule indiquent une différence statistiquement significative (P < 0.05) entre les traitements

3 Détermination des conditions optimales d'application

L'étude multisite conduite sur l'ensemble des essais au champ montre qu'en condition de contrainte azotée, DPI493 et AF086 n'ont pas d'effet sur le rendement en grains et en protéines, et sur la teneur en protéines des grains. Lors de l'essai en serre de 2016 en condition de contrainte hydrique, DPI4913 et AF086 n'ont pas affecté le rendement et la production de biomasse. Ces résultats contrastent avec l'idée selon laquelle les biostimulants, et notamment ceux à base d'extraits d'algue *Ascophyllum nodosum* (DPI4913) ou de champignon *Trichoderma* (AF086), amélioreraient la résistance des plantes aux stress abiotiques (Calvo et al., 2014; López-Bucio et al., 2015). Nous supposons que le niveau de contrainte était trop élevé et a pu masquer les effets des biostimulants. Par ailleurs, les conditions "standard" de fertilisation ou d'irrigation pouvant correspondre à des conditions non-optimales et des contraintes ponctuelles difficiles à estimer, notre compréhension des mécanismes d'action de DPI4913 et AF086 ne nous permet pas de définir un seuil de contrainte à partir duquel les biostimulants pourraient avoir un impact positif sur la production quantitative et qualitative du blé dur. En effet, dans leur revue sur les biostimulants, Brown and Saa (2015) expliquent que les réponses à l'application de biostimulants varient en fonction de nombreux facteurs comme les conditions environnementales.

En conditions de fertilisation standard pour tous les essais au champ, l'application de DPI4913 conduit à une augmentation du rendement en grains (+ 2.3 %) et du rendement en protéines (+ 2.4 %), tandis que l'application d'AF086 n'a pas d'effet sur ces deux variables. Pour des raisons opérationnelles, tous les stades d'applications n'ont pas pu être testés sur l'ensemble des essais au champ, et l'étude multisite ne nous permet pas de déterminer le stade d'application optimal. En serre par contre, en condition d'irrigation standard et principalement pour une application au stade deux nœuds, nous avons montré des effets de DPI4913 et AF086 sur le rendement en grains (respectivement + 23.9 % et + 20.4 %), la biomasse sèche totale (respectivement + 19.7 % et + 19.3 %) et le rendement en protéines (respectivement + 24.8 % et + 25.9 %), sans modification de la teneur en protéines. Finalement, l'application de DPI4913 et AF086 a des effets optimaux pour une application au stade deux nœuds, en conditions de fertilisation et d'irrigation standard.

Chapitre IV

Effets des biostimulants sur la dynamique de l'azote dans la plante

CHAPITRE IV : *Effets des biostimulants sur la dynamique de l'azote dans la plante*

Afin de cibler les effets des biostimulants DPI4913 et AF086 sur l'utilisation de l'azote par la plante, nous nous sommes intéressés à la dynamique de cet élément dans la plante. Nous avons quantifié le prélèvement d'azote minéral par la plante et sa répartition entre les différents compartiments (parties racinaires, tiges et feuilles, épi) en utilisant le marquage ^{15}N . Les résultats obtenus sont présentés et discutés dans un article intitulé « Marine and fungal biostimulants improve grain yield, nitrogen absorption and allocation in durum wheat plants ». Cet article est en cours de révision par le journal *Frontiers in Plant Science*. L'application de biostimulants en combinaison avec un apport du fertilisant azoté foliaire AF001 a aussi été testée. L'apport d'engrais foliaire AF001 marqué à l'urée (^{15}N) a permis de suivre l'absorption et la migration de l'azote issue du fertilisant. Ces résultats sont présentés dans une deuxième partie.

1 Marine and fungal biostimulants improve grain yield, nitrogen absorption and allocation in durum wheat plants

Eve-Anne Laurent^{1,2,3 † *}, Nawel Ahmed^{1,4 †}, Céline Durieu³, Philippe Grieu^{1††}, Thierry Lamaze^{2††}

¹UMR 1248 AGIR, INRA, Université de Toulouse, Castanet-Tolosan, France

²UMR 5126, CESBIO, Université de Toulouse, Toulouse, France

³Agronutrition, Carbonne, France

⁴Genetics and Cereal Breeding Laboratory, INAT, Department of Agronomy and Plant Biotechnology, University of Carthage, Tunis, Tunisia

† These authors have contributed equally to this work.

†† These authors have contributed equally to this work, as supervisors.

Under review by Frontiers in Plant Science

Abstract

Durum wheat culture requires a high N fertilization to achieve protein concentration for semolina and pasta quality, contributing to N losses to atmosphere and water. Optimizing plant N use efficiency could improve agroenvironmental balance. Here, we studied the impact of the marine (DPI4913) and fungal (AF086) extracts applied on leaves (at two stages) on growth, N absorption, and N fluxes in durum wheat.

Field experiments were performed under two N fertilizations and a greenhouse experiment under varying water regimes. ^{15}N labelings were performed at flag-leaf fully emerged stage. All plants were sampled at maturity for analysis. In the field, $^{15}\text{NO}_3^-$ and $^{15}\text{NH}_4^+$ were injected into the soil; in the greenhouse, some plants were $^{15}\text{NH}_4^+$ labeled on the flag-leaf whereas the flag-leaf of other plants was removed. Flag-leaf senescence was studied by estimating leaf chlorophyll concentration.

Under field standard N conditions, biostimulants increased mean grain yield. Under greenhouse standard soil water content, biostimulants increased grain yield, total N in both plant and ear, and proportion of total plant N in ears. When N or water were limited, neither biostimulant had any effect. In the field, DPI4913 increased soil mineral ^{15}N accumulated in grains. In the greenhouse, flag-leaf N was very mobile (^{15}N resorption of 98.2 %). Biostimulants increased the proportion of ^{15}N applied to the flag-leaf recovered in grains and accelerated leaf senescence by about 7 days. The key-role of flag-leaf in N grain filling other than the leaf net N resorption was revealed since flag-leaf ablation decreased N amount in grains by more than flag-leaf N content at the time of ablation. For plants treated with biostimulants, flag-leaf N resorption increased, contributing to increased grain N by 4.3 %. Thus, biostimulants had a larger positive impact on mineral N root uptake than on N remobilization.

In conclusion, our work has shown that, in standard N fertilization and standard water conditions, DPI4913 – and to a lesser extent AF086 – promote plant growth and grain yield, N uptake and remobilization. Thus, these biostimulants could be used to optimize durum wheat N fertilization and then contribute to reduced N leaching.

Introduction

Durum wheat (*Triticum durum*) is a crop mainly cultivated to produce pasta and semolina. A high level of proteins confers to the grains properties that are sought for the transformation process in pastry industry (Bushuk, 1997). The percentage of proteins in grains is enhanced by increased N fertilization (Daniel and Triboi, 2000). On the other hand, farmers are concerned by the constraints inherent to environmental issues. In Europe, the Nitrates Directive aims at protecting ground and surface water from nitrate pollution (Monteny, 2001). To meet both industrial and environmental requirements, complementary processes have to be developed to better manage crop nutrition.

New strategies such as the use of biological molecules that act as biostimulants are proposed. Yakhin et al., (2017) defined biostimulants as “a formulated product of biological origin that improves plant productivity as a consequence of the novel or emergent properties of the complex of constituents, and not as a sole consequence of the presence of known essential plant nutrients, plant growth regulators, or plant protective compounds”. They are also able to increase the plant nutrient use efficiency and tolerance to abiotic and biotic stresses (Colla et al., 2015b; Nardi et al., 2016; Tanou et al., 2017). In addition, they can enhance the effectiveness of conventional mineral fertilizers (Bulgari et al., 2015; Craigie, 2011b). Biostimulants are available in a variety of formulations, originating from different organic materials. They include humic substances, complex organic materials, beneficial chemical elements, peptides and amino acids, inorganic salts, seaweed extracts, chitin and chitosan derivatives, antitranspirants, amino acids and other N-containing substances (Nardi et al., 2016). Among these categories, substances extracted from seaweeds are the most studied, and fungi extracts are receiving increasing attention (du Jardin, 2015).

Studies on the effect of seaweed extracts have shown that they can improve growth in treated grapevine, strawberry, *Arabidopsis thaliana* and rapeseed (Jannin, 2012; Mancuso et al., 2006; Rayorath et al., 2008; Roussos et al., 2009). For grapevine, marine bioactive substances induced a higher capacity to accumulate macronutrients, especially in leaves. Moreover, it helped plants to better resist water stress, maintaining a higher leaf water potential and stomatal conductance (Mancuso et al., 2006). Enhanced root length and increased nitrate reductase activity have been reported in *Arabidopsis thaliana* (Durand et al., 2003; Rayorath

et al., 2008). Nitrogen uptake was stimulated by seaweed extract application on rapeseed (Jannin et al., 2013).

Fungal bioactive substances released by *Trichoderma* can supply nutrients to the host plant (Behie and Bidochka, 2014). These substances also displayed biopesticidal and biocontrol capacities (Mukherjee et al., 2013; Nicolás et al., 2014). *Trichoderma* application to vegetable crops could increase tolerance to abiotic stress (Shoresh et al., 2010), nutrient use efficiency and organ growth (Colla et al., 2015). The release of active metabolites by *Trichoderma* would help to improve water and nutrients uptake capacity, thereby having an effect on abiotic stress tolerance, plant yield and growth (López-Bucio et al., 2015).

The effect of marine and fungal biostimulants depend on many factors such as species or experimental conditions (Faessel et al., 2014). Although marine and fungi biostimulants are widely studied for their effect on yield and plant growth (Hermosa et al., 2012; Khan et al., 2009; Latique et al., 2014), only few studies refer to their specific effect on durum wheat crop. Moreover, mechanisms involved in the effects of biostimulants on N nutrition and fluxes within the plants are poorly understood (Calvo et al., 2014).

Brown and Saa, (2015) assume that biostimulants would reduce negative plant response to stress by interacting with plant signaling processes. Indeed, algae and their extracts can be used in crop management to increase abiotic and biotic stress resistance (Sharma et al., 2014). Also, *Trichoderma* induces plant defense responses under stress conditions (Contreras-Cornejo et al., 2015; Mastouri et al., 2012).

The objective of the present work was to quantify the effect of two biostimulants (marine, DPI4913 and fungal, AF086) used in foliar application on durum wheat, regarding crucial agronomic traits that are yield and grain N relations, in both field and greenhouse experiments. Herein, we aim at elucidating the impact of these biostimulants on N absorption and N fluxes within the plant, especially toward grains. To our knowledge, only few studies have focused on the impact of biostimulants on N use efficiency at the whole plant scale.

Material and Methods

Experimental designs

A first field experiment (Experiment 1) was conducted from October 2014 to July 2015 in Saint-Sulpice, France (43°33'39'' N, 1°27'11'' E). Durum wheat var. Miradoux was sown with a seed rate of 300 seeds/m² in a silty, clayey, sandy soil (pH 8.0, 41.1 % silt, 32.9 % clay, 26.0 % sand, 19.5 g.kg⁻¹ organic matter). N fertilization was designed to follow conventional farmer practices. 180 kg N/ha were supplied in four applications, the first of which took place in February at the end of tillering stage (granules of ammonium nitrate: 50 kg N/ha), the second application was conducted at the first node stage (granulated nitrogen-sulfur fertilizer: 40 kg N/ha), the third application at the second node stage (granules of ammonium nitrate: 60 kg N/ha) and the fourth at the flag-leaf fully emerged stage (granules of ammonium nitrate: 30 kg N/ha). The experiment used a completely randomized design, and each treatment was replicated 10 times.

Another field experiment (Experiment 2) was conducted from October 2015 to July 2016 in Mervilla, France (43°50'34'' N, 1°47'23'' E). Durum wheat var. Anvergur was sown with 300 seeds/m² in a silty, clayey, sandy soil (pH 8.2, 37.6 % silt, 32.0 % clay and 30.4 % sand, 9.7 g.kg⁻¹ organic matter). Two levels of N fertilization were applied: low N (115 kg N/ha) and standard N (200 kg N/ha). N was supplied in three applications, the first of which took place at the start of stem elongation (granulated nitrogen-sulfur fertilizer: 65 kg N/ha for both standard N and low N), the second application was conducted at the first node stage (granules of perlurea fertilizer: 85 kg N/ha for standard N and 0 kg N /ha for low N) and the third application at the flag-leaf visible stage (granules of ammonium nitrate: 50 kg N/ha for both standard N and low N). The experiment used a split-plot design in which N treatment was randomized on main plots, biostimulant treatments were randomized on the sub-plots and each treatment was replicated 8 times. Plot dimensions were 2 by 4 m.

A greenhouse experiment was carried out from January to June 2016 in Toulouse, France (43°52'72'' N, 1°50'14'' E). Seeds of durum wheat var. Anvergur were germinated in plastic goblets filled with sand for one week in a growth chamber (25°C/20°C day/night, light intensity of 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR, photoperiod of 12 hours) and then for two weeks in the greenhouse (temperature > 10°C, ambient light, fertirrigated with a modified Coïc-Lesaint solution). The nutrient solution composition was the following: NO₃⁻ 9.03 mM, NH₄⁺

1.25 mM, PO_4^{3-} 0.88 mM, K^+ 3.49 mM, Ca^{2+} 2.70 mM, Mg^{2+} 0.96 mM, SO_4^{2-} 0.96 mM. Seedlings were transferred to 2 L plastic pots containing 2.2 kg of sandy soil (pH 5.0, 86.4 % sand, 10.6 % silt, 3.0 % clay, 51.7 g.kg^{-1} organic matter). Each pot contained four one-tiller plants and received 50 mL of nutrient solution two to three times a week depending on plant needs.

The soil water retention capacity was determined as follows: five 2 L pots were filled with soil saturated with water. After the complete percolation of free water, the soil water content reached field capacity. The soil samples were then weighed, placed in an oven at 105°C for 48 hours and then weighed again. The soil water content at field capacity was calculated as the difference between the two weights: 20.6 %.

From second node stage until harvest, pots were weighed three times a week and soil water content was adjusted to 75% of field capacity for the standard irrigated conditions and to 60 % for the water-stressed conditions.

The greenhouse experiment used a randomized complete block design. Each block contained a complete set of treatments. The experiment was divided into 8 blocks, each containing one replication of each treatment. One pot containing four plants is a replication.

Biostimulant treatments

The following products were tested: DPI4913 containing *Ascophyllum nodosum* extract and a mix of amino acids; AF086 containing enzymes extracted from *Trichoderma*. Three treatments were compared: Control (no foliar treatment), DPI4913 (foliar application at a rate of 1 L/ha) and AF086, (foliar application at a rate of 5 L/ha). Both DPI4913 and AF086 were provided by Agronutrition (nutritional supplements company, De Sangosse Group, Carbonne, France). Treatments were applied at flag-leaf fully emerged stage for the field experiment in Carbonne and, at second node stage for the field experiment in Mervilla and the greenhouse experiment in Toulouse.

Plant labeling

In the field Experiment 1, to estimate the potential of the plants to transfer soil mineral N to grains, the soil NH_4^+ and NO_3^- pool was labeled with $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ and K^{15}NO_3 as described previously by Pornon et al., (2007). Briefly, the labeling solution (2.4 L, 2.38 mM NH_4^+ and

2.15 mM NO₃⁻, ¹⁵N abundance of 99 atom per cent) was injected into the upper 15 cm of soil with a needle (24 injection points in 45 × 60 cm² plots) at flag-leaf fully emerged stage. The amounts of ¹⁵N supplied to the plots were calculated to be suitable to detect the label after its dilution in the plant-soil system and were sufficiently low to avoid any meaningful modification of the total soil N.

In the greenhouse, two plants per pot received 25 μL of Cl¹⁵NH₄ solution (1.28 M abundance of 99 atom per cent) on the flag-leaf when it was fully emerged for one group of plants and at flowering stage for another group of plants. The Cl¹⁵NH₄ solution was deposited on the lower leaf surface using a propette. The deposit zone was previously gently rubbed with a brush.

Harvest

For both field experiments, harvest was performed at maturity with a plot combine-harvester (Delta plot combine, Wintersteiger, Austria). For each plot, grain yield was measured. Protein concentration was determined by spectroscopy on a sample of about 2 kg of grains, using a grain analyzer (FOSS InfratecTM1241, Foss, Nanterre, France).

In the greenhouse, plants were harvested at maturity and divided in roots, grains, remaining ears (glumes and beards), flag-leaf and remaining shoots (stems and leaves). They were then dried (60°C for 48 hours) for dry weight determination and then ground into a fine powder for ¹⁵N and N analysis with a mass spectrometer (IsoprimeTM) coupled to an elemental auto-analyzer (EA 2000, EuroVectorTM, Manchester, UK). Natural ¹⁵N abundance was measured on four samples of each compartment from plant not exposed to ¹⁵N labeling. The amount of ¹⁵N (g) in samples was calculated as:

$$^{15}\text{N} = ^{15}\text{N}_{\text{excess}} = \text{Mass}_{\text{sample}} \times [\text{N}]_{\text{sample}} \times (A_{\text{sample}} - A_{\text{natural}}) \quad \text{with :}$$

Mass_{sample}: dry mass of the sample (g dry weight)

[N]_{sample}: N concentration (%) of the sample

A_{sample}: ¹⁵N abundance in sample from ¹⁵N labeled plots

A_{natural}: ¹⁵N abundance in sample from unlabeled plants.

The flag-leaf of some plants was harvested when fully emerged while for other it was harvested at maturity. For both, the ears were harvested at maturity. Each plant organ (flag-

leaf and ear) was dried (60°C for 48 hours) for dry weight determination and then ground into a fine powder for N analysis (vario El cube elemental analyser, Elementar, Langensfeld, Germany). N remobilization efficiency (NRE, proportion of N in the flag-leaf when fully emerged that is not present at harvest) was calculated using Equation 1.

$$NRE = \frac{(N_F - N_M) \times 100}{N_F} \text{ (Equation 1) with:}$$

N_F : amount of N in flag-leaf fully emerged stage

N_M : amount of N in flag-leaf at maturity

SPAD values of flag-leaves were determined using a chlorophyll meter (Minolta SPAD-502) two to three times a week from flowering till complete senescence.

Statistical analysis

Data were analyzed using R software (Free Software Foundation, Inc., Boston, USA). ANOVAs were followed by Tukey test.

Results

Field experiments

Grain yield and protein concentration

Under standard N fertilization, both biostimulants increased grain yield mean values (DPI4913: + 1.8% and + 5.5%, AF086: + 4.0% and + 3.9% in Experiment 1 (Table 1) and Experiment 2 (Table 2), respectively. However, the effect was not statistically significant. In Experiment 2 (Table 2), for the low N fertilization plots, grain yield was significantly lower (- 13.9%) as well as grain protein concentration (- 7.1%). For both fertilization treatments, the biostimulants had no effect on grain protein concentration (Table 1 and 2).

Table 1: Grain yield and protein concentration in wheat under different foliar treatments (field experiment 1)

		Grain yield (ql/ha)			Grain protein concentration (%)		
Average \pm SD ; n=10							
	CONTROL	83.80	\pm 3.07	a	11.26	\pm 0.09	a
	DPI 4913	85.30	\pm 6.16	a	11.26	\pm 0.09	a
	AF086	87.15	\pm 5.02	a	11.20	\pm 0.10	a

Note : Cases indicate a statistical difference ($P < 0.05$) between treatments

Table 2: Grain yield and protein concentration in wheat under different foliar treatments and two fertilization levels (field experiment 2)

		Grain yield (ql/ha)			Grain protein concentration (%)		
Average \pm SD; n=8							
Standard N fertilization	CONTROL	85.0	\pm 8.1	(a) ^B	12.7	\pm 0.6	(a) ^B
	DPI4913	89.7	\pm 9.4	(a) ^B	12.7	\pm 0.6	(a) ^B
	AF086	88.3	\pm 6.9	(a) ^B	12.6	\pm 0.6	(a) ^B
Low N fertilization	CONTROL	75.0	\pm 7.2	(a) ^A	11.6	\pm 0.7	(a) ^A
	DPI4913	75.4	\pm 8.3	(a) ^A	11.8	\pm 0.6	(a) ^A
	AF086	75.7	\pm 7.4	(a) ^A	11.7	\pm 0.5	(a) ^A

Note : Lower cases indicate a statistical difference ($P < 0.05$) between treatments for a given fertilization level, whereas uppercases highlights a statistical difference between fertilization levels

Soil mineral N accumulation in grains

After the injection of $^{15}\text{NH}_4^+$ and $^{15}\text{NO}_3^-$ in the soil at flag-leaf fully emerged stage, the proportion of ^{15}N recovered in grains, glumes and beards (GGB) at harvest was significantly increased by 24.7% for the plants treated with DPI4913 (Table 3). Although this average proportion was 18.7% higher with AF086 treatment than for the Control, the effect was not significant.

Table 3: Proportion of ^{15}N injected as $^{15}\text{NH}_4^+$ and $^{15}\text{NO}_3^-$ into the soil at flag-leaf fully emerged stage recovered in the ear at harvest, (field experiment)

		Proportion of 15N injected into the soil solution recovered in the ear at harvest (%)		
Average \pm SD; n=10				
	CONTROL	15.47	\pm 4.36	a
	DPI4913	19.29	\pm 4.87	b
	AF086	18.37	\pm 5.36	ab

Cases indicate a statistical difference ($P < 0.05$) between treatments

Greenhouse experiment

Biomass in plant compartments

The plants bore only one ear each as they had only one tiller each. The water restricted regime significantly decreased total dry biomass per plant by 33.0% (Table 4).

For the standard irrigation regime, the total dry biomass per plant was significantly higher for plants treated with biostimulants (+ 19.7% for DPI4913 and + 19.3% for AF086, Table 4) compared to Control. This was mainly due to a marked effect on shoot dry biomass for treated plants (+ 19.7% for DPI4913 and + 19.3% for AF086), as a result of higher grain dry biomass (+ 23.9% for DPI4913 and + 20.4% for AF086). Although the mean value of root dry biomass was higher in treated plants than in Control, the effect was not significant.

Under water limitation, biostimulants slightly negatively affected dry biomass in a non-significant way. Therefore, the putative positive effects of biostimulants were thereafter only studied in standard conditions of irrigation.

Table 4: Dry biomass of wheat compartments under different foliar treatments for two irrigation regimes (greenhouse experiment)

		Total dry biomass per plant (g)	Shoot dry biomass per plant (g)	Root dry biomass per plant (g)	Grain dry biomass per plant (g)
Average \pm SD; n=8					
Standard irrigation	CONTROL	2.69 \pm 0.59 (a) ^B	2.41 \pm 0.53 (a) ^B	0.28 \pm 0.13 (a) ^A	1.13 \pm 0.33 (a) ^B
	DPI 4913	3.22 \pm 0.64 (b) ^B	2.88 \pm 0.58 (b) ^B	0.35 \pm 0.19 (a) ^A	1.40 \pm 0.35 (b) ^B
	AF086	3.21 \pm 0.65 (b) ^B	2.84 \pm 0.61 (b) ^B	0.37 \pm 0.16 (a) ^A	1.36 \pm 0.36 (b) ^B
Water limitation	CONTROL	2.11 \pm 0.48 (a) ^A	1.88 \pm 0.44 (a) ^A	0.23 \pm 0.08 (a) ^A	0.81 \pm 0.26 (a) ^A
	DPI 4913	2.04 \pm 0.51 (a) ^A	1.79 \pm 0.43 (a) ^A	0.26 \pm 0.11 (a) ^A	0.76 \pm 0.22 (a) ^A
	AF086	1.96 \pm 0.48 (a) ^A	1.71 \pm 0.44 (a) ^A	0.25 \pm 0.10 (a) ^A	0.70 \pm 0.26 (a) ^A

Note : Lower cases indicate a statistical difference ($P < 0.05$) between treatments for a given irrigation level, whereas uppercases highlights a statistical difference between irrigation levels

Nitrogen amount in plant

The N amount accumulated in plant compartments were considered: in grains (G), in glumes and beards (GB), in shoots except ear (S) and roots (R).

DPI4913 treatment significantly increased the total amount of N in plants (+ 28.9%, Table 5) as compared to the Control. The increase for AF086 treatment (+ 23.3%) was not significant. For plants treated respectively with DPI4913 and AF086, the proportion of N in ear (GGB)

was increased by 12.3% with DPI4613 and 8.0% with AF086. The proportion of N in S and R was lower for treated plants (DPI4913: - 19.6% in S and - 49.9% in R; AF086: - 2.4% in S and - 33.7% in R) but the difference was not significant for AF086 concerning S.

Table 5: Amount of nitrogen in plant and nitrogen distribution within plant compartments (greenhouse experiment); G: Grains, GB: Glumes and beards, S: Shoots except ear, R: Roots

$$\text{Proportion of N in compartment (\%)} = \frac{\text{Amount of N in a compartment}}{\text{Total amount of N per plant}} \times 100$$

	Total amount of N per plant (mg)	Proportion of N in GGB (%)	Proportion of N in S (%)	Proportion of N in R (%)
Average ± SD; n=8				
CONTROL	58.58 ± 11.76 a	68.68 ± 5.31 a	23.52 ± 4.05 b	7.82 ± 2.96 b
DPI 4913	75.49 ± 12.42 b	77.14 ± 5.87 b	18.92 ± 3.63 a	3.92 ± 2.64 a
AF086	72.22 ± 17.33 ab	74.20 ± 6.44 b	20.61 ± 4.86 ab	5.19 ± 2.88 a

Note : Cases indicate a statistical difference (P < 0.05) between treatments

For both biostimulants, the amount of N in grains per plant was statistically higher in treated plants than in Control (Table 6). The supplementary amount of N found in grains was 9.4 mg with DPI4913 (+ 24.8% compared to Control) and 8.4 mg with AF086 (+ 22.3% compared to Control). However, grain nitrogen concentration was not affected by the application of biostimulants.

Table 6: Nitrogen concentration and amount in grains per plant (greenhouse experiment)

	N concentration in grains (%)			Amount of N in grains per plant (mg)		
Average ± SD; n=8						
CONTROL	3.34	± 0.34	a	37.74	± 9.86	a
DPI 4913	3.37	± 0.13	a	47.12	± 11.22	b
AF086	3.39	± 0.28	a	46.15	± 12.41	b

Note : Cases indicate a statistical difference (P < 0.05) between treatments

Nitrogen remobilization

Dry biomass, N concentration and N amount in flag-leaves showed a significant decrease between the flag-leaf fully emerged stage and maturity: respectively - 9.9%, - 71.7% and - 74.8% (Table 7).

Table 7: Flag-leaf dry biomass, N concentration and N amount at two developmental stages: flag-leaf fully emerged and harvest (at maturity, greenhouse experiment)

		Flag-leaf dry biomass (mg)	Flag-leaf nitrogen concentration (%)	Amount of nitrogen in the flag-leaf (mg)
Average \pm SD; n=8				
Flag-leaf removed at flag- leaf fully emerged stage	CONTROL	50.36 \pm 11.99 (a) ^B	4.90 \pm 0.23 (ab) ^B	2.47 \pm 0.61 (a) ^B
	DPI 4913	61.79 \pm 13.51 (b) ^B	5.01 \pm 0.22 (b) ^B	3.11 \pm 0.76 (b) ^B
	AF086	54.53 \pm 9.51 (ab) ^B	4.76 \pm 0.25 (a) ^B	2.61 \pm 0.54 (ab) ^B
Flag-leaf removed at maturity	CONTROL	49.33 \pm 10.64 (a) ^A	1.43 \pm 0.38 (a) ^A	0.69 \pm 0.14 (a) ^A
	DPI 4913	47.05 \pm 10.29 (a) ^A	1.28 \pm 0.23 (a) ^A	0.61 \pm 0.18 (a) ^A
	AF086	53.86 \pm 15.51 (a) ^A	1.44 \pm 0.28 (a) ^A	0.76 \pm 0.19 (a) ^A

Note: Lower cases indicate a statistical difference ($P < 0.05$) between treatments for a given sampling stage, whereas uppercases highlights a statistical difference between sampling stages.

At flag-leaf fully emerged stage, the flag-leaf dry biomass and amount of N were significantly increased in plants treated with DPI4913 (dry biomass: + 22.7%, amount of N: + 25.9%). Mean values were also increased by AF086 but this was not significant (dry biomass: + 8.3%, amount of N: + 5.7%). Flag-leaf N concentration was not affected by biostimulants application.

At maturity, flag-leaf dry biomass, N concentration and amount of N were not affected by the application of biostimulants.

Flag-leaf N remobilization efficiency (NRE) was calculated as the proportion of N in the flag-leaf at fully emerged stage that is not present in the flag-leaf at maturity (Equation 1). For the Control plants, this proportion was 68.2%. It was slightly higher for AF086 (+ 69.6%) and even higher for DPI4913 (+ 79.6%) but this was not significant (p-value = 0.12).

Flag-leaf endogenous N was labeled with $^{15}\text{NH}_4^+$. When ^{15}N labeling was performed at fully emerged stage, the proportion of ^{15}N supplied to the flag-leaf and still present in this leaf at harvest was around 2% and the proportion of ^{15}N recovered in the rest of the plant was between 52% and more than 64% according to the treatments. The proportion of ^{15}N recovered in the rest of the plant at maturity was significantly enhanced by 23.9% for plants treated with DPI4913 (Table 8). The mean ^{15}N value was increased by 15.6% with AF086 but the difference was not significant.

Table 8: Proportion of ¹⁵N applied on the flag-leaf at flag-leaf fully emerged stage recovered in total plant, in grains and remaining in the flag-leaf at harvest (greenhouse experiment)

	Proportion of ¹⁵ N applied to the flag-leaf recovered in the rest of the plant at harvest (%)	Proportion of ¹⁵ N applied to the flag-leaf recovered in grains at harvest (%)	Proportion of ¹⁵ N applied to the flag-leaf remaining in the flag-leaf at harvest (%)
Average ± SD			
CONTROL	52.00 ± 16.89 a	40.86 ± 13.41 a	2.24 ± 0.93 a
DPI4913	64.44 ± 10.53 b	52.48 ± 10.48 a	1.66 ± 0.85 a
AF086	60.11 ± 17.84 ab	47.21 ± 15.27 a	1.55 ± 0.54 a

Note : Cases indicate a statistical difference (P < 0.05) between treatments.

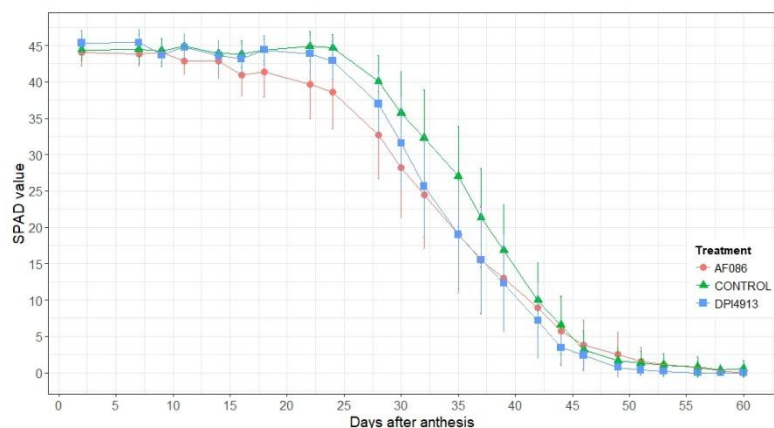
Following ¹⁵N labeling of the flag-leaf, 78.6% of the ¹⁵N recovered in the rest of the Control plants at maturity was found in grains. The proportion of ¹⁵N applied to the flag-leaf recovered in grains at harvest was increased by DPI4913 (+ 28.4%) and AF086 (+ 15.5%) but this was not significant (p-value=0.09).

When ¹⁵N labeling was performed at flowering, the proportion of ¹⁵N retained by flag-leaf at maturity was significantly enhanced as compared to labeling performed at earlier developmental stage (3.9 times higher). Labeling stage had only a slight effect on the proportion of ¹⁵N recovered in grains at harvest (see below). Biostimulants had no effect on the proportion of ¹⁵N remaining in the flag-leaf (Control: 7.06%, DPI4913: 7.46%, AF086: 6.75%) nor on the proportion recovered in grains (Control: 41.09%, DPI4913: 44.04%, AF086: 34.44%) at harvest.

Flag-leaf senescence

DPI4913 and AF086 significantly reduced SPAD values in flag-leaves of treated plants compared to Control during grain filling period (Figure 1). For Control treatment, SPAD value declined from 24 days after anthesis until maturity. Decline started earlier for plants treated with DPI4913 (16 days after anthesis) and AF086 (9 days after anthesis). Photosynthesis was altered in leaves displaying SPAD values lower than 15 (data not shown), which happened earlier for DPI4913 and AF086 than for Control. During later filling stage, DPI4913 and AF086 treatments reduced SPAD value and shortened the duration of the photosynthetic function in flag-leaves.

Figure 1: Changes in SPAD values in flag-leaves under different treatments (greenhouse experiment)



Flag-leaf contribution towards grain filling

Flag-leaf ablation at fully emerged stage significantly reduced by 16.0% grain dry biomass per ear at maturity (Table 9). The amount of N per ear was also significantly decreased by 15.3% (5.92 mg). Grain N concentration was not affected by flag-leaf ablation at flag-leaf fully emerged stage.

Table 9: Grain dry biomass and amount of N per plant, and N concentration at maturity (greenhouse experiment)

	Grain dry biomass per ear (g)	Grain nitrogen concentration (%)	Amount of nitrogen in grains per ear (mg)
Average ± SD			
Flag-leaf removed at flag-leaf fully emerged stage	1.00 ± 0.34 a	3.33 ± 0.40 a	32.81 ± 11.30 a
Control	1.19 ± 0.35 b	3.26 ± 0.30 a	38.73 ± 12.80 b

Note : Cases indicate a statistical difference (P < 0.05) between treatments

Discussion

Results on the putative improvement in growth, nutrient absorption, stress tolerance and crop quality by the application of biostimulants are contrasted in the literature. The positive effects of biostimulants depend on many factors such as varieties, environmental conditions, application conditions (dose, foliar or root application), plant development stage, product formulation or storage conditions (Faessel et al., 2014). To our knowledge, many studies have considered biostimulants effects on soft wheat but only a few on durum wheat.

In field experiments, no significant effects of biostimulants were observed on grain yield and protein concentration. However, mean values of grain yield were higher for plants treated by

biostimulants under standard N fertilization (Experiment 1: + 1.8% for DPI4913 and + 4.0% for AF086, Experiment 2: + 5.5% for DPI4913 and + 3.9% for AF086). Variability between plots (soil and climatic conditions) may have had a greater impact than the use of biostimulants. In the same way, Al Majathoub (2004) observed that foliar application of four types of biostimulants (micronutrients, humic acid, seaweed extracts and amino acids) in a field experiment systematically affected plant growth and wheat yield, although this was only significant for the seaweed extract.

Greenhouse standard conditions: biostimulants increased biomass and the amount of N in grains per plant but did not affect N grain concentration

In the greenhouse experiment under standard irrigation regime, biostimulants significantly improved total dry biomass. This was mainly due to the increase in grain biomass. Indeed, a significant effect of biostimulants on grain yield was shown (+ 23.9% for DPI4913 and + 20.4% for AF086). Grain biomass increase contributed to 50.9% of the biomass increase for plants treated with DPI4913 and 44.2% for plants treated with AF086. Thus, biostimulants had a marked specific positive effect on the most important plant compartment from an agronomic point of view, as observed by Rathore et al. (2009) for soybean, by Jannin et al. (2013) for rapeseed and by Polo and Mata (2018) for gold cherry tomato.

No significant effect was reported on grain N concentration. However, as the grain biomass was higher for plants treated with biostimulants, the amount of N in grain yield per plant increased (+ 24.8% for DPI4913 and + 22.3% for AF086).

Biostimulants did not display any effect under water or N low conditions

Although biostimulants may have an effect on grain yield under standard N fertilization and standard water conditions (significant in the greenhouse experiment, not in the field experiments), no effect of biostimulants application appeared under low N and water limitation. Our results do not agree with the common idea that *Ascophyllum nodosum* and *Trichoderma* extracts enhance stress tolerance in plants (Calvo et al., 2014; López-Bucio et al., 2015). The constraints encountered in our experiments can have masked the effects of biostimulants usually observed in literature.

Effect of biostimulants on the total amount of N contained per plant, under standard growth conditions (greenhouse experiment)

Due to the absence of effect in constraint conditions, the impacts of biostimulants were further analyzed for plants treated under standard growth conditions (in greenhouse). Because the total amount of N in plants at maturity was significantly improved (28.9% with DPI4913 and 23.3% with AF086), it is suggested that biostimulants have a positive effect on N net uptake by plants, as already observed for the application of marine biostimulants on vine (Mugnai et al., 2007). This is strengthened by the results of a field experiment (Experiment 1) where $^{15}\text{NH}_4^+$ and $^{15}\text{NO}_3^-$ ions were injected into the soil at flag-leaf fully emerged stage. The amount of ^{15}N recovered in ears at maturity was significantly increased by 24.7% by DPI4913 and (non-significantly) increased by 18.7% by AF086. This revealed that DPI4913, and to a lesser extent AF086, increased the transfer to grains of mineral soil N, suggesting an improved root N uptake, at least from flag-leaf fully emerged stage to maturity.

Effect of biostimulants on N allocation to the ear, at the expense of other compartments

The total amount of N in plant at maturity was increased by DPI4913 and to a lesser extent by AF086. The proportion of N in the ear at maturity was higher for treated plants with biostimulants (+ 12.3% for DPI4913, + 8.0% for AF086) whereas the proportion of N in other compartments was lower (shoots except ear: - 19.6% for DPI4913 and - 12.4% for AF086, roots: - 49.9% for DPI4913 and - 33.7% for AF086). Nitrogen remobilization to the ear was thus improved by DPI4913 and AF086 application. Labeling of fully emerged flag-leaf with $\text{Cl}^{15}\text{NH}_4$ supports this conclusion: ^{15}N remobilization from flag-leaf to grains was higher for plant treated by biostimulants. Billard et al. (2014) also reported the positive effects of a biostimulant derived from algae on macronutrient uptake (N, S, K, and P) for winter oilseed rape, as well as on root-to-shoot translocation of Fe and Zn. But to our knowledge, little is known about biostimulants effects on N fluxes.

Effect of biostimulants on ^{15}N remobilization from flag-leaf to grains

According to Gate (1995), flag-leaf contributes to 24% of the N remobilization to the grains from flowering until harvest. To study biostimulants effect on N remobilization, flag-leaf was labeled with $^{15}\text{NH}_4^+$ when fully emerged stage and at flowering stage.

Labeling stage had a significant effect on the proportion of ^{15}N remained in the flag-leaf at maturity but in both cases most of the tracer supplied to the leaves was redistributed to other plant compartments at harvest. This indicates that N in flag-leaves was very mobile, suggesting that flag-leaves were like a turntable for plant N metabolism during all leaf life-span.

Most of the ^{15}N applied to the flag-leaf recovered in the rest of the plant was found in grains (79.6%). This illustrates the source-sink relationship between flag-leaves and ears. Biostimulants tend to increase the proportion of ^{15}N applied fully emerged flag-leaf, recovered in grains at harvest (+ 28.4% for DPI4913, + 15.5% for AF086). When labeling was performed at flowering stage, it was not observed any biostimulant effect on ^{15}N allocation to grains. Thus, we can suggest that mechanisms of action of biostimulants on flag-leaves, mainly took place between flag-leaf fully emerged stage and flowering stage.

The proportion of ^{15}N applied to flag-leaves recovered in the plant at harvest was significantly increased by 23.9% by DPI4913 and 15.6% by AF086 (not significant). This indicates that, following deposition, foliar N was more efficiently retained in the plant due to redistribution between plant compartments.

This main result suggests that application of biostimulants lead to a higher turn-over of N in flag-leaves. This hypothesis is under investigation.

Remobilization

Senescence processes in wheat are associated with nutrients remobilization from senescing leaves to other organs (Gregersen et al., 2008). Chlorophyll index obtained from anthesis to complete senescence have shown a premature loss of chlorophyll due to biostimulants application. According to the previous authors, we suggest that DPI4913 and AF086 accelerate leaf senescence and thus remobilization.

Effect of ablation of fully emerged flag-leaf on the amount of N in grains at maturity

From flag-leaf fully emerged stage until harvest, the amount of N in the flag-leaf only decreased by 1.78 mg for Control, 2.50 mg for DPI4913 and 1.85 mg for AF086 treatments (**Table 7**). The amount of N in grains was around 37 mg and 47 mg per plant for Control and DPI4913, respectively. In terms of net N fluxes, flag-leaf N resorption cannot be a major

source for N grain filling. ¹⁵N labeling experiment suggests that flag-leaf played a central role in plant N metabolism. In order to study the involvement of flag-leaf in grain N filling other than through remobilization, flag-leaf ablation was performed when fully emerged. This reduced by 5.92 mg the amount of N in grains per ear at maturity (**Table 9**). This demonstrated that flag-leaves largely participate to the mechanisms of grain N filling but not as a main N source, as observed by Harper et al. (1987). The increase in the amount of N in grains (and in the whole plant) resulting of biostimulant application must be associated with enhanced N uptake by root as suggested by our study of labeled mineral N soil accumulation in grains.

Conclusion

This study gives clues about the mechanisms of action of DPI4913 and AF086 biostimulants on durum wheat. In the absence of N or water limitations, both biostimulants improved yield (grain biomass) and N recovery in whole plant at maturity was enhanced. However, the effect of the fungal biostimulant AF086 was less marked than that of the marine biostimulant DPI4913. A higher amount of N recovered in crop means less N leaching, which can bring an answer to the soil and groundwater nitrate pollution issues. Finally, taking into account these main results, it would be relevant to evaluate the interest of the use of these biostimulants in combination with foliar application of N on durum wheat to increase the protein concentration in grains.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

EAL oversaw the field Experiment 2 in Mervilla and the greenhouse experiment, collected and analyzed the data, and wrote the first draft of the manuscript. NA oversaw the Experiment 1 in Saint-Sulpice, collected and analyzed the data. CD provided expertise on biostimulants and helped design the experiments. PG and TL supervised the research work, helped design the experiment, analyzed data and improved the manuscript content.

Funding

This study was part of the INNOPERF-BLE project, selected and supported by Pôle Agri-Sud-Ouest Innovation, and funded by French FUI (Fond Unique Interministeriel), Midi-Pyrénées Region and Bpifrance (Banque Publique d'Investissement). ANRT supported the PhD grant (CIFRE).

Acknowledgments

The authors acknowledge Pascal Tillard (BPMP) for ^{15}N analysis; Agronutrition experimentation team, Bernard Leguevaques, Denis Loubet, Michel Labarrère, Eric Lecloux, Sébastien Viudes, Bastien Dauphin, Diana Lezier and Maxime Chabeaudie for their technical assistance; Staphyt company for harvesting the field. The authors thank Emilie Tierchant for proof reading the English of the article.

References

- Al Majathoub, M. (2004). Effect of biostimulants on production of wheat (*Triticum aestivum* L.). in *Options méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens* (Zaragoza, CIHEAM: Cantero-Martinez C., Gabiña D.), 147–150.
- Behie, S. W., and Bidochka, M. J. (2014). Nutrient transfer in plant–fungal symbioses. *Trends Plant Sci.* 19, 734–740. doi:10.1016/j.tplants.2014.06.007.
- Billard, V., Etienne, P., Jannin, L., Garnica, M., Cruz, F., Garcia-Mina, J.-M., et al. (2014). Two Biostimulants Derived from Algae or Humic Acid Induce Similar Responses in the Mineral Content and Gene Expression of Winter Oilseed Rape. *J. Plant Growth Regul.* 33, 305–316. doi:10.1007/s00344-013-9372-2.
- Brown, P., and Saa, S. (2015). Biostimulants in agriculture. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00671.
- Bulgari, R., Cocetta, G., Trivellini, A., Vernieri, P., and Ferrante, A. (2015). Biostimulants and crop responses: A review. *ResearchGate* 31, 1–17. doi:10.1080/01448765.2014.964649.
- Bushuk, W. (1997). “Wheat breeding for end-product use,” in *Wheat: Prospects for Global Improvement* Developments in Plant Breeding. (Springer, Dordrecht), 203–211. doi:10.1007/978-94-011-4896-2_27.
- Calvo, P., Nelson, L., and Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* 383, 3–41.
- Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., et al. (2015a). Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196, 28–38. doi:10.1016/j.scienta.2015.08.037.

- Colla, G., Rouphael, Y., Di Mattia, E., El-Nakhel, C., and Cardarelli, M. (2015b). Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. *J. Sci. Food Agric.* 95, 1706–1715. doi:10.1002/jsfa.6875.
- Contreras-Cornejo, H. A., López-Bucio, J. S., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ramos-Vega, M., Guevara-García, Á. A., et al. (2015). Mitogen-Activated Protein Kinase 6 and Ethylene and Auxin Signaling Pathways Are Involved in Arabidopsis Root-System Architecture Alterations by *Trichoderma atroviride*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 28, 701–710. doi:10.1094/MPMI-01-15-0005-R.
- Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *J. Appl. Phycol.* 23, 371.
- Daniel, C., and Triboi, E. (2000). Effects of Temperature and Nitrogen Nutrition on the Grain Composition of Winter Wheat: Effects on Gliadin Content and Composition. *J. Cereal Sci.* 32, 45–56. doi:10.1006/jcrs.2000.0313.
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* 196, 3–14. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.021.
- Durand, N., Briand, X., and Meyer, C. (2003). The effect of marine bioactive substances (N PRO) and exogenous cytokinins on nitrate reductase activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 119, 489–493. doi:10.1046/j.1399-3054.2003.00207.x.
- Faessel, L., Gomy, C., Nassr, N., Tostivint, C., Hipper, C., and Dechanteloup, A. (2014). *Produits de stimulation en agriculture visant à améliorer les fonctionnalités biologiques des sols et des plantes - Etude des connaissances disponibles et recommandations stratégiques*. Étude commanditée par le Centre d'Études et de Prospective du Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (MAAF) et financée par le MAAF dans le cadre du programme 215 (Marché n° SSP-2013-094).
- Gate, P. (1995). “Elaboration de la teneur en protéines du grain et influence de la nutrition azotée,” in *Ecophysiologie du blé* (Tec & Doc Lavoisier), 301–308.
- Gregersen, P. L., Holm, P. B., and Krupinska, K. (2008). Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biol.* 10, 37–49. doi:10.1111/j.1438-8677.2008.00114.x.
- Harper, L. A., Sharpe, R. R., Langdale, G. W., and Giddens, J. E. (1987). Nitrogen Cycling in a Wheat Crop: Soil, Plant, and Aerial Nitrogen Transport 1. *Agron. J.* 79, 965–973. doi:10.2134/agronj1987.00021962007900060004x.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., and Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158, 17–25. doi:10.1099/mic.0.052274-0.
- Jannin, L. (2012). Caractérisation des modifications physiologiques et métaboliques induites chez *Brassica napus* L. par l'apport d'extraits algaux ou d'acides humiques.

- Jannin, L., Arkoun, M., Etienne, P., Lâiné, P., Goux, D., Garnica, M., et al. (2013). Brassica napus Growth is Promoted by Ascophyllum nodosum (L.) Le Jol. Seaweed Extract: Microarray Analysis and Physiological Characterization of N, C, and S Metabolisms. *J. Plant Growth Regul.* 32, 31–52. doi:10.1007/s00344-012-9273-9.
- Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., et al. (2009). Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. *J. Plant Growth Regul.* 28, 386–399. doi:10.1007/s00344-009-9103-x.
- Latique, S., Elouaer, M. A., Chernane, H., Hannachi, C., and Elkaoua, M. (2014). Effect of Seaweed Liquid Extract of Sargassum vulgare on Growth of Durum Wheat Seedlings (Triticum durum L) under salt stress. *Int. J. Innov. Appl. Stud.* 7, 1430–1435.
- López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., and Herrera-Estrella, A. (2015). Trichoderma as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Sci. Hortic.* 196, 109–123. doi:10.1016/j.scienta.2015.08.043.
- Mancuso, S., Azzarello, E., Mugnai, S., and Briand, X. (2006). Marine bioactive substances (IPA extract) improve foliar ion uptake and water stress tolerance in potted Vitis vinifera plants. *Adv. Hortic. Sci.* 20, 156–161.
- Mastouri, F., Björkman, T., and Harman, G. E. (2012). Trichoderma harzianum Enhances Antioxidant Defense of Tomato Seedlings and Resistance to Water Deficit. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 25, 1264–1271. doi:10.1094/MPMI-09-11-0240.
- Monteny, G. J. (2001). The EU Nitrates Directive: A European approach to combat water pollution from agriculture. *ScientificWorldJournal* 1 Suppl 2, 927–935. doi:10.1100/tsw.2001.377.
- Mugnai, S., Azzarello, E., Pandolfi, C., Salamagne, S., Briand, X., and Mancuso, S. (2007). Enhancement of ammonium and potassium root influxes by the application of marine bioactive substances positively affects Vitis vinifera plant growth. *J. Appl. Phycol.* 20, 177–182. doi:10.1007/s10811-007-9203-6.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., and Kenerley, C. M. (2013). Trichoderma Research in the Genome Era. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 105–129. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102353.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Schiavon, M., Ertani, A., Nardi, S., Pizzeghello, D., et al. (2016). Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Sci. Agric.* 73, 18–23. doi:10.1590/0103-9016-2015-0006.
- Nicolás, C., Hermosa, R., Rubio, B., Mukherjee, P. K., and Monte, E. (2014). Trichoderma genes in plants for stress tolerance-status and prospects. *Plant Sci.* 228, 71–78. doi:10.1016/j.plantsci.2014.03.005.

- Polo, J., and Mata, P. (2018). Evaluation of a Biostimulant (Pepton) Based in Enzymatic Hydrolyzed Animal Protein in Comparison to Seaweed Extracts on Root Development, Vegetative Growth, Flowering, and Yield of Gold Cherry Tomatoes Grown under Low Stress Ambient Field Conditions. *Front. Plant Sci.* 8. doi:10.3389/fpls.2017.02261.
- Pornon, A., Escaravage, N., and Lamaze, T. (2007). Complementarity in mineral nitrogen use among dominant plant species in a subalpine community. *Am. J. Bot.* 94, 1778–1785. doi:10.3732/ajb.94.11.1778.
- Rathore, S. S., Chaudhary, D. R., Boricha, G. N., Ghosh, A., Bhatt, B. P., Zodape, S. T., et al. (2009). Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. *South Afr. J. Bot.* 75, 351–355. doi:10.1016/j.sajb.2008.10.009.
- Rayorath, P., Jithesh, M. N., Farid, A., Khan, W., Palanisamy, R., Hankins, S. D., et al. (2008). Rapid bioassays to evaluate the plant growth promoting activity of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. using a model plant, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *J. Appl. Phycol.* 20, 423–429. doi:10.1007/s10811-007-9280-6.
- Roussos, P. A., Denaxa, N.-K., and Damvakaris, T. (2009). Strawberry fruit quality attributes after application of plant growth stimulating compounds. *Sci. Hortic.* 119, 138–146. doi:10.1016/j.scienta.2008.07.021.
- Sharma, H., Fleming, C., Selby, C., Rao, J., and Martin, T. (2014). Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *J. Appl. Phycol.* 26, 465.
- Shoresh, M., Harman, G. E., and Mastouri, F. (2010). Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 21–43. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114450.
- Tanou, G., Ziogas, V., and Molassiotis, A. (2017). Foliar Nutrition, Biostimulants and Prime-Like Dynamics in Fruit Tree Physiology: New Insights on an Old Topic. *Front. Plant Sci.* 8. doi:10.3389/fpls.2017.00075.
- Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A., and Brown, P. H. (2017). Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Front. Plant Sci.* 7. doi:10.3389/fpls.2016.02049.

2 Efficacité d'utilisation des apports d'azote foliaire en fonction du niveau de fertilisation

L'impact des produits biostimulants DPI4913 et AF086 sur l'efficacité d'utilisation d'azote foliaire (AF001 apporté au stade floraison) est étudié sur l'essai au champ mené à Rebigue en 2017. Pour cette étude, nous groupons sous le terme Rebigue les essais Rebigue 1 et Rebigue 2 dont les dispositifs étaient identiques (voir chapitre Matériels et Méthodes, paragraphe 2.1.3).

L'effet des biostimulants est mesuré par des variables reflétant l'absorption du fertilisant foliaire AF001 par la plante (ratio entre la quantité de ^{15}N retrouvée dans la plante à maturité et la quantité de ^{15}N -urée apportée à floraison) et la migration de l'azote vers les grains (proportion de ^{15}N absorbé retrouvée dans l'épi, les grains, les glumes et les barbes, ainsi que les tiges et feuilles). Une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée pour chaque biostimulant en prenant en compte tous les facteurs et combinaisons de facteurs (Tableau 14, Tableau 15).

Dans cet essai, le facteur bloc n'a pas d'effet sur les variables observées, suggérant que l'hétérogénéité des conditions environnementales au sein du champ a eu peu d'impact sur l'absorption d'urée foliaire et la répartition de l'azote dans la plante. Les interactions entre les différents facteurs ne sont pas non plus significatives, pour toutes les variables observées.

Répartition de l'azote issu de l'apport de ^{15}N -urée au sein de l'épi

Tous niveaux de fertilisation confondus, DPI4913 et AF086 n'ont pas d'impact sur la proportion de ^{15}N -urée retrouvée dans la plante à maturité, ni sur la proportion du ^{15}N -urée retrouvée dans l'épi ou dans les tiges et feuilles. Toutefois, les deux biostimulants ont un même effet positif sur la proportion de ^{15}N -urée retrouvée dans les grains à maturité (+ 1 % tendanciel pour DPI4913 et + 1.4 % significatif pour AF086). Par contre, ils ont un effet significativement négatif sur la proportion de ^{15}N -urée retrouvée dans les glumes et barbes à maturité (- 30.2 % pour DPI4913 et - 29.1 % pour AF086).

De nombreuses études s'intéressent aux effets des biostimulants sur l'efficacité d'utilisation des nutriments par la plante du sol absorbés par les racines (Halpern et al., 2015). A notre connaissance, aucune étude ne s'intéresse à cette efficacité pour l'absorption foliaire.

Nous montrons ici que les biostimulants n'ont pas d'impact sur l'absorption du fertilisant azoté foliaire AF001. En revanche AF086, et DPI4913 dans une moindre mesure, améliorent la migration de l'azote issue de AF001 vers les grains.

Effet différencié selon le niveau de fertilisation

La fertilisation (standard ou réduite) a un effet significatif et prédominant (F-ratios élevés) sur l'absorption et la distribution du ^{15}N -urée après traitement par les biostimulants. Une ANOVA a été réalisée pour chaque niveau de fertilisation (fertilisation standard et réduite). En fertilisation standard, la proportion de ^{15}N retrouvée dans les grains à maturité est significativement augmentée par AF086 (+ 1.5 %) tandis qu'elle est diminuée dans les glumes et barbes (- 48.4 %). Concernant DPI4913, en contrainte azotée, la proportion de ^{15}N retrouvée dans les glumes et barbes à maturité est significativement diminuée (- 24.5 %). Aucun autre effet sur la répartition du ^{15}N dans la plante à maturité n'est observé, quel que soit la fertilisation.

L'analyse statistique ne montre pas d'effet des biostimulants sur la proportion de ^{15}N -urée apportée à floraison et retrouvée dans la plante à maturité. DPI4913 et AF086 n'affectent donc pas l'absorption d'urée par les feuilles. En revanche, ils ont un impact sur la répartition de l'azote absorbé dans la plante. AF086 augmente la proportion d'azote absorbé par les feuilles retrouvé dans les grains à maturité et diminue la proportion retrouvé dans les glumes et barbes, sans impacter la proportion de cet azote dans l'épi. AF086 ne modifie pas la migration de l'azote apporté aux feuilles vers l'épi mais modifie la distribution de cet azote au sein de l'épi, en favorisant le flux vers les grains. Le seul effet significatif de DPI4913 concerne la diminution de la proportion d'azote issu d'engrais foliaire retrouvé dans les glumes et barbes à maturité.

Tableau 14 : Variation de la proportion de ¹⁵N absorbé par la plante et répartition du 15N absorbé dans les différents compartiments de la plante (épi ; grains ; glumes et barbes ; tiges et feuilles TF) en fonction du biostimulant DPI4913, du niveau de fertilisation et du bloc d'origine pour l'essai au champ mené à Rebigue au cours de la campagne 2017. Les analyses sont faites sur la globalité de l'essai et en séparant les modalités de fertilisation

Variable	N	Moyenne ± Ecart type				ANOVA									
		Contrôle		DPI4913		Biostimulant		Fertilisation		Bloc		Biostimulants x Fertilisation		Biostimulants x Bloc	
						p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio
Champ	48														
Proportion de 15N absorbé (%)		20,8 ± 2,7	20,1 ± 2,7	ns	4,70	ns	18,08	ns	3,58	ns	0,52	ns	1,31		
Proportion de 15N dans l'épi (%)		94,2 ± 1,6	94,0 ± 1,4	ns	0,07	ns	0,43	ns	0,82	ns	0,06	ns	0,76		
Proportion de 15N dans les TF (%)		5,8 ± 1,6	6,0 ± 1,4	ns	0,07	ns	0,43	ns	0,82	ns	0,06	ns	0,01		
Proportion de 15N dans les grains (%)		90,6 ± 2,0	91,5 ± 1,8	0,09	2,96	**	12,89	ns	0,04	ns	0,07	ns	0,11		
Proportion de 15N dans les GB (%)		3,6 ± 1,7	2,5 ± 0,9	**	9,81	***	21,62	ns	1,16	ns	0,02	ns	0,67		
Fertilisation standard	24														
Proportion de 15N absorbé (%)		22,4 ± 1,5	21,9 ± 1,5	ns	0,50	-	-	ns	0,32	-	-	ns	3,03		
Proportion de 15N dans l'épi (%)		94,3 ± 1,8	94,3 ± 0,8	ns	0,00	-	-	ns	0,37	-	-	ns	0,00		
Proportion de 15N dans les TF (%)		5,7 ± 1,8	5,7 ± 0,8	ns	0,00	-	-	ns	0,37	-	-	ns	0,00		
Proportion de 15N dans les grains (%)		91,5 ± 1,5	92,6 ± 1,0	0,08	3,65	-	-	ns	1,19	-	-	ns	3,81		
Proportion de 15N dans les GB (%)		2,8 ± 1,9	1,7 ± 0,4	0,09	3,36	-	-	ns	3,12	-	-	ns	3,54		
Contrainte azotée	24														
Proportion de 15N absorbé (%)		19,3 ± 2,7	18,3 ± 2,5	ns	0,54	-	-	ns	0,44	-	-	ns	0,10		
Proportion de 15N dans l'épi (%)		94,1 ± 1,4	93,8 ± 1,8	ns	0,12	-	-	ns	0,45	-	-	ns	1,30		
Proportion de 15N dans les TF (%)		5,9 ± 1,4	6,2 ± 1,8	ns	0,12	-	-	ns	0,45	-	-	ns	1,30		
Proportion de 15N dans les grains (%)		89,6 ± 2,1	90,4 ± 1,9	ns	0,73	-	-	ns	1,81	-	-	ns	2,47		
Proportion de 15N dans les GB (%)		4,5 ± 1,0	3,4 ± 0,4	**	9,53	-	-	ns	0,81	-	-	ns	2,62		

N : nombre de microparcelles par essai

ns : non significatif, * significatif à P < 0.05, ** significatif à P < 0.01, *** significatif à P < 0.001

Tableau 15 : Variation de la proportion de ¹⁵N absorbé par la plante et répartition du ¹⁵N absorbé dans les différents compartiments de la plante (épi ; grains ; glumes et barbes ; tiges et feuilles TF) en fonction du biostimulant AF086, du niveau de fertilisation et du bloc d'origine pour l'essai au champ mené à Rebigue au cours de la campagne 2017. Les analyses sont faites sur la globalité de l'essai, et en séparant les modalités de fertilisation

Variable	N	Moyenne ± Ecart type				ANOVA									
		Contrôle		AF086		Biostimulant		Fertilisation		Bloc		Biostimulants x Fertilisation		Biostimulants x Bloc	
						p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio	p-value	F ratio
Champ	48														
Proportion de ¹⁵ N absorbé (%)		20,8 ± 2,7	20,4 ± 3,6	ns	0,19	*	5,42	ns	0,12	ns	0,32	ns	0,01		
Proportion de ¹⁵ N dans l'épi (%)		94,2 ± 1,6	94,4 ± 0,8	ns	0,31	ns	0,00	ns	1,22	ns	0,32	ns	1,17		
Proportion de ¹⁵ N dans les TF (%)		5,8 ± 1,6	5,6 ± 0,8	ns	0,31	ns	0,00	ns	1,22	ns	0,32	ns	1,17		
Proportion de ¹⁵ N dans les grains (%)		90,6 ± 2,0	91,9 ± 1,7	*	6,65	***	14,06	ns	1,27	ns	0,01	ns	0,29		
Proportion de ¹⁵ N dans les GB (%)		3,6 ± 1,7	2,6 ± 1,7	*	5,00	***	16,46	ns	0,03	ns	0,42	ns	4,19		
Fertilisation standard	24														
Proportion de ¹⁵ N absorbé (%)		22,4 ± 1,5	21,3 ± 3,5	ns	0,60	-	-	ns	6,91	-	-	ns	0,11		
Proportion de ¹⁵ N dans l'épi (%)		94,3 ± 1,8	94,3 ± 0,8	ns	0,00	-	-	ns	0,10	-	-	ns	0,98		
Proportion de ¹⁵ N dans les TF (%)		5,7 ± 1,8	5,7 ± 0,8	ns	0,00	-	-	ns	0,10	-	-	ns	0,98		
Proportion de ¹⁵ N dans les grains (%)		91,5 ± 1,5	92,8 ± 0,8	*	6,37	-	-	ns	4,30	-	-	ns	1,35		
Proportion de ¹⁵ N dans les GB (%)		2,8 ± 1,9	1,5 ± 0,4	*	5,18	-	-	ns	2,18	-	-	*	4,91		
Contrainte azotée	24														
Proportion de ¹⁵ N absorbé (%)		19,3 ± 2,7	19,4 ± 3,6	ns	0,01	-	-	ns	1,63	-	-	ns	0,18		
Proportion de ¹⁵ N dans l'épi (%)		94,1 ± 1,4	94,6 ± 0,9	ns	0,89	-	-	*	5,27	-	-	ns	0,23		
Proportion de ¹⁵ N dans les TF (%)		5,9 ± 1,4	5,4 ± 0,9	ns	0,89	-	-	*	5,27	-	-	ns	0,23		
Proportion de ¹⁵ N dans les grains (%)		89,6 ± 2,1	90,9 ± 1,9	ns	2,13	-	-	*	6,94	-	-	ns	0,01		
Proportion de ¹⁵ N dans les GB (%)		4,5 ± 1,0	3,7 ± 1,9	ns	1,06	-	-	ns	2,06	-	-	ns	0,05		

N : nombre de microparcelles par essai

ns : non significatif, * significatif à P < 0.05, ** significatif à P < 0.01, *** significatif à P < 0.001

Chapitre V

*Effets des biostimulants sur
la composition et le rendement
protéique du grain*

CHAPITRE V : *Effets des biostimulants sur la composition et le rendement protéique du grain*

Nous avons montré dans les chapitres III et IV un effet des biostimulants sur la quantité d'azote contenue dans des grains à la récolte. Une étude protéomique globale a permis de déterminer de plus l'effet des biostimulants sur la composition en protéines du grain. Les résultats sont présentés dans un article intitulé « Durum Wheat Proteome Changes under Marine and Fungal Biostimulants Treatments », soumis à Journal of Proteomics.

Durum Wheat Proteome Changes under Marine and Fungal Biostimulant Treatments

Carole Pichereaux^{1,2†}, Eve-Anne Laurent^{3, 4, 5†}, Audrey Gargaros², Sébastien Viudes³, Céline Durieu⁵, Thierry Lamaze⁴, Philippe Grieu³, Odile Burlet-Schiltz²

¹ Fédération de Recherche (FR3450), Agrobiosciences, Interactions et Biodiversité (AIB), CNRS, Toulouse, France

² Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse UPS, CNRS, Toulouse, France

³ UMR 1248 AGIR, INRA, Université de Toulouse, Castanet-Tolosan, France

⁴ UMR 5126, CESBIO, Université de Toulouse, Toulouse, France

⁵ Agronutrition, Carbonne, France

† These authors have contributed equally to this work.

To be submitted in Journal of Proteomics

Abstract

Durum wheat requires high nitrogen inputs to obtain the high protein concentration necessary to satisfy pasta and semolina quality criteria. Optimizing plant nitrogen use efficiency is therefore of major importance for wheat grain quality. Here, we studied the impact on grain yield, protein concentration, and for the first time on protein composition of a marine (DPI4913) and a fungal (AF086) biostimulants applied to plant leaves. Plants were grown in a greenhouse and sampled at maturity for grain analysis. The protein concentration and quantity in grains per plant were determined, as well as water-use efficiency. A large-scale quantitative proteomics study of wheat flour samples was performed to determine the effect of biostimulant treatment on grain protein composition. Grain dry biomass and protein quantity were increased by 23.9% and 24.8% respectively with DPI4913, and by 27.4% and 25.9%, respectively, with AF086. A total of 1391 proteins were identified. Quantitative proteomics analysis revealed 26 and 38 proteins with a significantly varying abundance after DPI4913 and AF086 treatment, respectively. Among these, 14 proteins were affected by both DPI4913 and AF086 treatments. The highest variations in proteins abundances were found for proteins involved in grain technological properties such as grain hardness, in storage functions with the substantial over-representation of the gluten protein gamma-gliadin, in regulation processes with the over-representation of proteins that play a transcription regulator role, and in stress responses with the over-representation of proteins implied in biotic and abiotic stress defense. The involvement of biostimulants in the abiotic stress response is suggested by the increase in water-use efficiency for DPI4913 treatment (15.4%) and for AF086 treatment (9.9%). In conclusion, our work, performed in greenhouse, has shown that DPI4913 and AF086 treatments promote grain yield while maintaining protein concentration in grains, and positively affect protein composition in term of grain quality. This study suggests that these biostimulants could be used to optimize durum wheat production and quality in field conditions.

Highlights

- DPI4913 and AF086 induce an increase in grain yield and protein quantity
- Global protein composition is affected by biostimulant treatments
- Differentially represented proteins: involved in storage, regulation, and defense
- Gamma-gliadin is substantially over-represented by both biostimulants

1 Introduction

Durum wheat (*Triticum durum*) is a major agricultural crop that is primarily grown to produce mostly pasta and semolina. A total of 39.9 million tons' are produced per year and it is mainly cultivated in the Mediterranean basin and in North America (FranceAgriMer, 2018b). The main crop characteristics sought by producers are yield and protein concentration, requiring high nitrogen inputs (Samson et al., 2016; Savill et al., 2018). However, with increasing fertilizer prices and the risk of nitrogen leaching, farmers have to modify their fertilizing practices. Thus, to meet both industrial and environmental requirements, complementary processes have to be developed to optimize plant growth efficiency and environmental adaptability.

New strategies to enhance nitrogen uptake are frequently based on the use of biological molecules that act as biostimulants. According to the European Biostimulants Industry Council (EBIC), biostimulants are defined as follows: "Plant biostimulants contain substance(s) and/or micro-organisms whose function when applied to plants or the rhizosphere is to stimulate natural processes to enhance/benefit nutrient uptake, nutrient efficiency, tolerance to abiotic stress, and crop quality. Biostimulants have no direct action against pests, and therefore do not fall within the regulatory framework of pesticides" (European Biostimulants Industry Council, 2012). Biostimulants were considered by Zhang and Schmidt (Zhang and Schmidt, 1997) as "materials, other than fertilizers, that promote plant growth when they are applied in small quantities." In addition, they can be used to enhance the effectiveness of conventional mineral fertilizers (Craigie, 2011b). Among the different categories of biostimulants, substances extracted from seaweeds are the most frequently studied, and substances extracted from fungi are receiving increasing attention (du Jardin, 2015). Marine and fungal bioactive substances are widely studied for their effect on yield, growth and nutrient absorption. This effect depends on many factors such as species or

experimental conditions (Faessel et al., 2014). Only a few studies in the literature refer to durum wheat crops (Arena et al., 2017; Giuliani et al., 2015; Visioli et al., 2016) and even less to the effect of biostimulants on the protein composition of wheat grain (Latique et al., 2014). Among them, experiments showed that wheat grain protein concentration was increased by the application of biostimulants based on amino acids (Popko et al., 2018) or fungal biostimulants (Colla et al., 2015c). It has also been shown that nitrogen accumulation in wheat grains was increased by seaweed extracts (Szczepanek et al., 2015). Moreover, biostimulants are reported to improve fruit quality for various crops such as grapevine with seaweed extract application or vine-shoot extract (Frioni et al., 2018; Sánchez-Gómez et al., 2017), tomato with protein hydrolysate, plant and seaweed extracts (Colla et al., 2017a; Roupheal et al., 2017), orange with plant extract and yeast (El-Boray et al., 2015), and cherry with seaweed extract (Correia et al., 2015).

The increase in nitrogen inputs has been shown to lead to changes in the protein composition of the grain, which depends mainly on the final quantity of nitrogen accumulated during grain filling (Triboï et al., 2003). Mature wheat grains contain 60 to 75% starch, 6 to 20% proteins, about 10% moisture, and 1.5 to 2% lipids (Barak et al., 2015). According to the Osborne classification (Osborne, 1907), proteins are divided into four main groups: albumins (soluble in water), globulins (soluble in a dilute salt solution), gliadins (soluble in 70% ethyl alcohol), and glutenins (soluble in a dilute acidic or basic solution). When the total amount of N in grain increases, the glutenin fraction remains stable while the gliadin fraction increases and the albumin-globulin fraction decreases (Pechanek et al., 1997; Triboï et al., 2003). Moreover, nitrogen concentration is linked to protein concentration through a nitrogen-to-protein conversion factor specific to each cereal product (Fujihara et al., 2008). Gliadins and glutenins are referred to as prolamins. They represent major storage proteins, accounting for 70-80% of the total proteins, and are responsible for the technological quality of flour (Costa et al., 2013; Liu et al., 2011). More precisely, the rheological properties of durum wheat depend on the balance between gliadins and glutenins. Gliadins are known to confer extensibility to the dough (Song and Zheng, 2008). Glutenins are divided into low-molecular weight glutenin subunits (LMW-GS) and high-molecular weight glutenin subunits (HMW-GS). HMW-GS is considered to have an impact on bread-making quality (Barro et al., 1997), whereas LMW-GS is considered to contribute to pasta-making quality (Masci et al., 2000). Albumins and globulins account for 15-20% of the total proteins and are involved in

important functions in grain metabolism and regulation processes (Simoes Larraz Ferreira, 2011). They include various enzymes and polypeptide inhibitors (Arena et al., 2017) such as alpha and beta-amylase, protease, oxidoreductase, and enzyme inhibitor (Simoes Larraz Ferreira, 2011) that affect many metabolism pathways and cellular processes such as redox homeostasis, cell cycle, cell defense and photosynthesis.

Mass spectrometry-based proteomics is a very efficient strategy to identify proteins in various matrices. In addition, a quantitative differential analysis allows the determination of protein variations under several conditions. In the literature, research has been conducted to investigate protein synthesis and accumulation in developing wheat grains using proteomics (Chaoying Ma et al., 2014). However, few studies have applied proteomic approaches to study durum wheat grains (Arena et al., 2017; Daaloul Bouacha et al., 2015; Masci et al., 2000). Most approaches used fractional extraction of proteins to target reserve proteins (Giuliani et al., 2015; Mazzeo et al., 2017; Victorio et al., 2018) followed by two-dimensional electrophoresis (2-DE) (Giuliani et al., 2015; Visioli et al., 2016) or two-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE). However, these approaches suffer from several limitations such as a low identification rate of proteins (Altenbach et al., 2011a) and a lack of accurate protein quantification.

The objective of the present study was to determine the effects of two foliar biostimulants, the seaweed extract DPI4913 and the fungal extract AF086, on a durum wheat crop, focusing on the plant nitrogen uptake and the variations in the protein composition in the grain on biostimulant treatments.

We used a large-scale label-free quantitative proteomics approach to analyze the total protein extract from flour. This unbiased method allowed the identification and quantification of near 1000 proteins in mature durum wheat grain. The analysis of protein variations showed several important biological pathways affected by both biostimulant treatments, including technological grain properties, storage functions, regulation processes and stress responses.

2 Materials and methods

2.1 Experimental design and plant material

A greenhouse experiment was carried out from January to June 2016 in Toulouse, France (43°52'72" N, 1°50'14" E). The experiment consisted of durum wheat var. Anvergur is a

variety with good gluten quality and good protein concentration. One factor was studied: the foliar application of biostimulants. The following products were tested: DPI4913 containing *Ascophyllum nodosum* extract and a mix of amino acids; AF086 containing enzymes extracted from *Trichoderma*. Three treatments were compared: a Control, with no foliar treatment; DPI4913, with a foliar application at a rate of 1 L/ha; and AF086, with a foliar application at a rate of 5 L/ha. Both DPI4913 and AF086 were provided by Agronutrition (a nutritional supplement company, a subsidiary of the De Sangosse Group, Carbonne, France). Treatments were applied at the second node stage.

The experiment used a randomized complete block design. Each block contained a complete set of treatments. Differences among blocks could be due to factors other than treatments, including abiotic factors (illumination, temperature or humidity). Therefore, this variability could be estimated as a separate source of variation. The experiment was divided into nine plots containing two repetitions of each treatment. One pot containing four plants was a replication.

Seeds of durum wheat var. Anvergur were germinated in plastic goblets filled with sand for one week in a growth chamber (25°C/20°C day/night; light intensity: 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR; photoperiod: 12 hours) and then for two weeks in the greenhouse (temperature > 10°C, ambient light, fertigated with a modified Coïc-Lesaint solution). The nutrient solution composition was the following: NO_3^- 9.03 mM, NH_4^+ 1.25 mM, PO_4^{3-} 0.88 mM, K^+ 3.49 mM, Ca^{2+} 2.70 mM, Mg^{2+} 0.96 mM, SO_4^{2-} 0.96 mM. Seedlings were transferred to 2L plastic pots containing 2.2 kg of sandy soil (pH 5.0, 86.4% sand, 10.6% silt, and 3.0% clay). Each pot contained four one-tiller plants and received 50 mL of nutrient solution two to three times a week depending on plant needs.

The soil water retention capacity (SWC) was determined as follows: five 2 L pots were saturated with water. After the complete percolation of free water, the soil water content reached field capacity. The soil samples were then weighed, placed in an oven at 105°C for 48 hours and then weighed again. The soil water content at field capacity was calculated as the difference between the two weights: 20.6%. From the second node stage until harvest, pots were weighed three times a week and soil water content was adjusted to 75% of field capacity. However, before watering, the moisture content in the soil was sometimes lower than 60%, indicating a slight water stress.

Weight loss between two weighing operations was considered to be due to transpiration. Water-use efficiency (WUE) was determined as follows:

$$WUE = \frac{\text{total biomass per plant at harvest (g)}}{\text{water transpired from second node stage until harvest (L)}}$$

2.2 Nitrogen-to-protein quantification

Grains harvested at maturity were dried (60°C for 48 hours) in a drying oven for DW determination and ground into a fine powder for N and proteomics analysis. Total N content was determined by Continuous-Flow Mass Spectrometry using a Euro-EA Eurovector elemental analyzer coupled with an IsoPrime mass spectrometer (GV Instruments, Crewe, UK), at the Biochemistry and Plant Molecular Physiology Laboratory (BPMP) in Montpellier, France.

Protein concentration was calculated using the nitrogen-to-protein conversion factor for hard durum wheat flour: 5.81 (Fujihara et al., 2008).

2.3 Sample preparation for proteomics analysis

Wheat flour samples were obtained by finely grinding wheat grains. Flour samples from replicate experiments were pooled to avoid biological variability. A quantity of 50 mg flour was mixed with 1.5 ml lysis buffer (SDS 2%, 80 mM TrisHCL pH 8.5) and vortexed for 2 h at room temperature. After centrifugation (8000 g, 4°C, 15 min) the supernatant was collected. Protein concentration was determined by DC protein assay (Biorad). A total of 100 µg of proteins was reduced in Laemmli buffer containing 25 mM dithiothreitol (DTT) at 95°C for 5 min, and cysteines were alkylated by the addition of 90 mM iodoacetamide for 30 min at room temperature. Protein samples were loaded onto a 12% SDS-polyacrylamide gel and subjected to short electrophoresis. After Instant Blue (Invitrogen) staining of the gel, one gel band was excised, washed twice with 50 mM ammonium bicarbonate-acetonitrile (1:1, v:v) and then washed once with acetonitrile. Proteins were in-gel digested by the addition of 50 µL of a solution of modified sequencing grade trypsin in 25 mM ammonium bicarbonate (30 ng/µL, sequence grade, Promega, Charbonnières, France). The mixture was incubated at 37 °C overnight. The resulting peptides were extracted from the gel by one round of incubation (15 min, 37°C) in 1% formic acid–acetonitrile (40%) and two rounds of incubation (15 min each, 37°C) in 1% formic acid–acetonitrile (1:1). The three extracted fractions were

pooled and air-dried. Tryptic peptides were resuspended in 100 μ l of 2% acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid for further MS analysis. A mix of standard synthetic peptides (iRT Kit; Biognosys, 0.2X) was spiked in all of the samples to monitor the stability of the nanoLC-MS/MS system during the analytical sequence.

2.4 NanoLC-MS/MS analysis

Peptide mixtures at 1 μ g/ μ l were analyzed by nanoLC-MS/MS using a nanoRS UHPLC system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) coupled to an LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Each sample was analyzed in triplicate injections. Two microliters of each sample (2 μ g) were loaded on a C18 pre-column (5 mm \times 300 μ m; Dionex) at 20 μ L/min in 2% acetonitrile, 0.05% trifluoroacetic acid. After 5 min of desalting, the pre-column was switched online with the analytical C18 column (50 cm \times 75 μ m inner diameter; in-house packed with Reprosil C18) equilibrated in 95% of solvent A (5% acetonitrile + 0.2% formic acid in water) and 5% of solvent B (80% acetonitrile + 0.2% formic acid in water). Peptides were eluted using a 5-50% gradient of B for 105 min at a 300 nL/min flow rate. The LTQ-Orbitrap was operated in data-dependent acquisition mode with Xcalibur software. Survey scan MS spectra were acquired in the Orbitrap on the 300-2000 m/z range with the resolution set to a value of 60000. The 20 most intense ion survey scans were selected for CID (collision-induced dissociation) fragmentation, and the resulting fragments were analyzed in the linear trap (LTQ). Dynamic exclusion was used within 60 s to prevent repetitive selection of the same peptide.

2.5 Bioinformatics analysis of nanoLC-MS/MS data

Acquired MS and MS/MS data were processed using MaxQuant software (version 1.5.3). Derived peak lists were submitted to the Andromeda search engine and data were searched against the UNIPROT protein repository release 2017_03 (<http://uniprot.org>) with a mixed database composed of annotations for *T. aestivum* and *T. Durum* (146,782 sequences; 65,059,445 residues; 20170323) and a list of potential contaminant sequences. The precursor mass tolerance was set to 20 ppm for initial searches and 6 ppm for main Andromeda database searches. The fragment ion mass tolerance was set to 0.8 Da. Trypsin/P was chosen as the enzyme and two missed cleavages were allowed. Oxidation of methionine and protein N-terminal acetylation were defined as variable modifications, and carbamidomethylation of cysteine was defined as a fixed modification. The minimum peptide length was set to seven

amino acids. The minimum number of unique peptides was set to one. The maximum false discovery rate (FDR), calculated by employing a reverse database strategy, was set to 1% for peptides and proteins.

For label-free relative quantification of the samples, the “match between runs” option of MaxQuant was enabled to allow cross-assignment of MS features detected in the different runs. The minimal ratio count was set to 1 for calculation of LFQ intensities. The LFQ metric was used to perform relative quantification between proteins identified in different biological conditions (reflecting a normalized protein quantity deduced from all peptide intensity values). Protein entries identified as potential contaminants by MaxQuant were eliminated from the analysis. Missing values were replaced by a constant noise value determined independently for each analytical run as the 1% percentile of the total protein population.

2.6 Statistical and functional data analysis

For each comparison of quantitative proteomics data, only proteins quantified in a minimum of three replicate experiments in at least one of the biological conditions were subjected to statistical analysis. A p-value and a ratio of the average normalized area were calculated. Proteins are considered variants when the p-value < 0.05 and the ratio < 0.5 or > 2. Volcano plots were drawn to visualize significant protein abundance variations between two conditions. They represent log₁₀ (p-value) according to the log₂ ratio.

Functional data analysis was performed using Gene Ontology (GO) annotations referring to biological processes and cellular components (<https://www.uniprot.org/uploadlists/>).

3 Results and discussion

3.1 Grain dry biomass and protein accumulation

For both biostimulant treatments, the grain biomass and the amount of protein accumulated in grains per plant (one-tiller plants) was statistically higher for treated plants (Table 1). It was increased by 24.8% with DPI4913 and by 25.9% with AF086. Grain dry biomass was also significantly higher for treated plants (23.9% for DPI4913 and 27.4% for AF086, respectively). The grain dry biomass and the amount of protein in grains per plant were positively affected by biostimulant application, but the protein concentration in grains per plant was not affected. These results contrast with the inverse correlation between grain

protein concentration and yield, as commonly shown by Baker et al. and Simmonds (Baker et al., 2004; Simmonds Norman W, 2006). This deviation from the protein dilution curve (grain protein concentration as a function of yield) is a required criterion for wheat varietal selection (Du Cheyron et al., 2014). In our results, this positive deviation can be obtained by the use of biostimulants, leading to an increase in protein yield.

Table 1: Grain dry biomass per plant, protein concentration and amount of protein in grains per plant with different foliar treatments in a greenhouse experiment; southwest France.

	Grain dry biomass per plant (g)				Protein concentration in grains (%)			Amount of protein in grains per plant (mg)				
Average ± SD												
CONTROL	1.13	±	0.33	a	19.51	±	2.25	a	214.9	±	50.2	a
DPI 4913	1.40	±	0.35	b	19.95	±	1.58	a	268.2	±	64.9	b
AF086	1.44	±	0.36	b	19.30	±	1.59	a	270.6	±	72.7	b
ANOVA P-value												
Treatment	0.007				NS			0.001				
Block	0.05				0.01			NS				

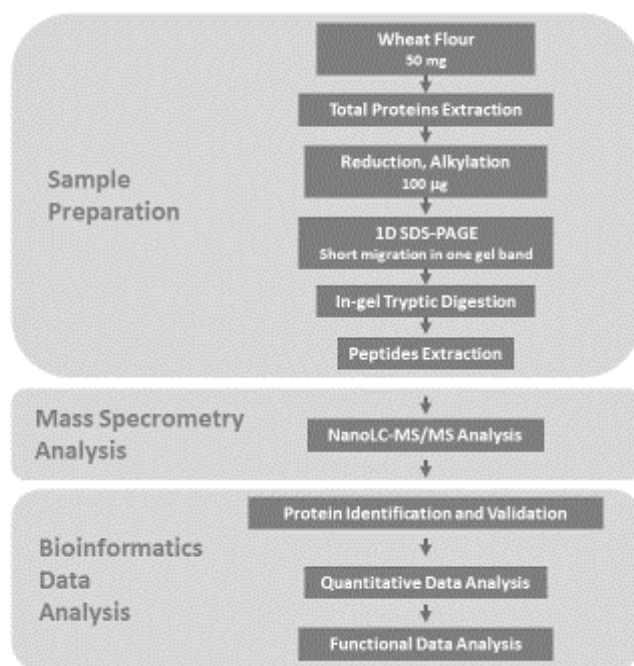
Note : The letters (a and b) indicate a statistical difference ($P < 0.05$) between treatments

The increase in the amount of protein in grains per plant, and thus of the amount of nitrogen, has been shown to be correlated with a variation of protein composition (Ferrise et al., 2015). To study the impact of biostimulants on this variation, proteomic analyzes were performed to identify the differentially-represented proteins under biostimulant treatment.

3.2 Protein composition of durum wheat flours

In order to identify the largest number of durum wheat proteins and to determine the variations in the protein composition in the grain using biostimulants treatment, we used a large-scale label-free quantitative proteomics approach based on the analysis of the total protein extract from flour samples obtained from milled grains. The workflow is presented in Fig. 1. Proteins were extracted from flour samples using an optimized protocol. Protein separation using one-dimensional SDS PAGE was used to verify that the complexity of the protein mixtures and the distribution of proteins along the gel between 20kDa and 100kDa were similar for each sample (data not shown). For further proteomics analyzes, only a short electrophoretic migration was performed and one gel band was excised. Proteins were in-gel digested with trypsin and subjected to nanoLC-MS/MS analysis for protein identification, validation and quantification.

Figure 1: Workflow of wheat flour proteomics analysis.



In our study, three conditions were considered: a Control sample, without biostimulant treatment of the plant, and two flour samples from plants treated, by either DPI4913 or AF086 as described (see material and methods section). For each condition, 24 plant culture replicates have been obtained leading to 72 samples in total. The corresponding flour samples were then pooled for each condition to average culture variations in samples. Three flour replicates per conditions and three technical replicates per flour sample were further analyzed to allow statistical analysis.

For each condition, almost 1500 proteins were identified (1459 for the Control sample, 1449 for the AF086-treated sample, and 1456 for the DPI4913-treated sample) leading to 1471 proteins identified in total. We used a mixed *Triticum* database composed of *Triticum aestivum* and *Triticum turgidum ssp. durum* (146,782 sequences; 65,059,445 residues; 20170323) since there were only two proteins in the SwissProt database for durum wheat and only 715 proteins were translated from the genomic EMBL database. However, only 40% of the identified proteins were characterized. To our knowledge, this represents the largest dataset of proteins identified for durum wheat.

In order to characterize better this dataset, a functional analysis based on Gene Ontology (GO) terms for molecular functions and biological processes was conducted. The resulting 1471

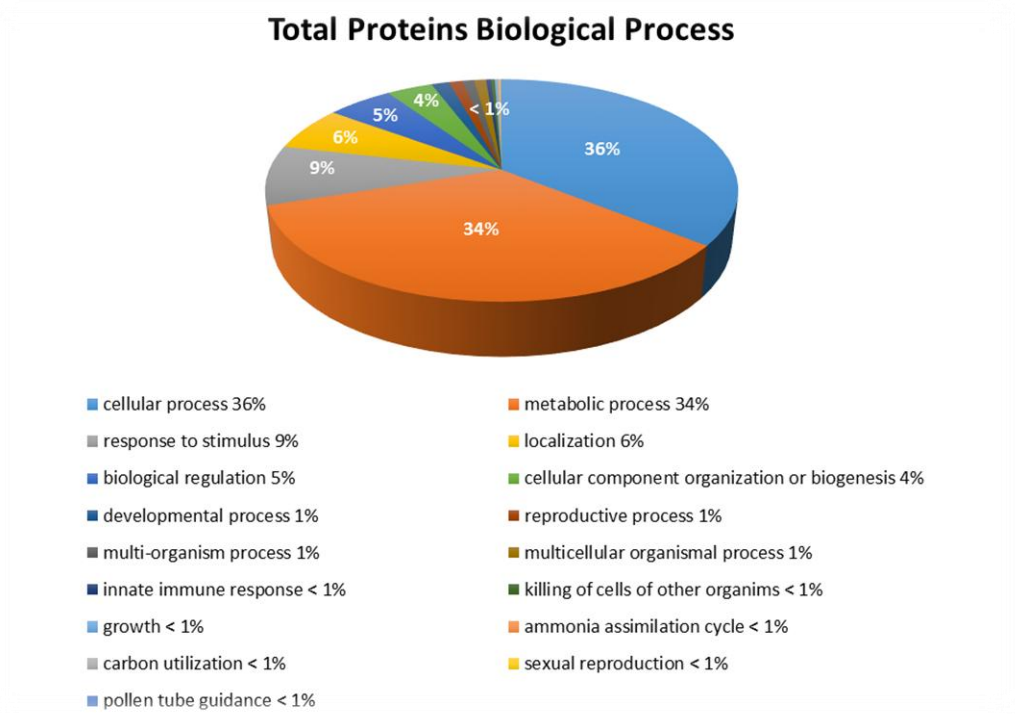
identified proteins (for all conditions) were used, after removing redundant protein codes, and only 40% of them were associated with a GO category (Fig. 2). This analysis showed that the main molecular functions associated to durum wheat flour were catalytic activity (41%) and binding (37%), followed by structural molecule activity (7%), nutrient reservoir activity (4%), and transporter activity (3%). When considering the role of proteins in biological processes, the main categories were cellular (36%) and metabolic processes (34%), followed by response to stimulus (9%), localization (6%), biological regulation (5%), and cellular components organization or biogenesis (4%). These categories have already been described in previous proteomics studies of wheat grains (Yang et al., 2016; Zhen et al., 2017) and reflect the protein composition of the mature grains.

The same functional analysis based on GO terms was also performed using the proteins identified in each condition independently (the Control samples, the AF086 and the DPI4913-treated samples). It showed a similar protein distribution for all conditions (data not shown). It can thus be concluded that there is no effect of the biostimulants used on the overall protein categories distribution in the grain.

Quantitative analyzes were then performed to determine the effect of biostimulants on the abundance of each protein in wheat grain. Comparison of DPI4913-treated and AF086-treated samples with Control samples allowed the quantification of 1391 proteins. Among these, 20 and 22 were over-represented after DPI4913 and AF086 treatments of the plant, respectively; and 6 and 16 were under-represented after DPI4913 and AF086 treatments of the plant respectively (Fig. 3). Thus, only a small set of proteins seems to be affected by biostimulants treatments. However, abundance ratios were rather high for some proteins, like the gamma-gliadin increased 100 times.

Figure 2: Pie charts of the distribution of differentially represented proteins based on their predicted: (A) biological processes; (B) molecular functions. This involves all the proteins identified in the three conditions, i.e. a total of 1471 proteins.

A



B

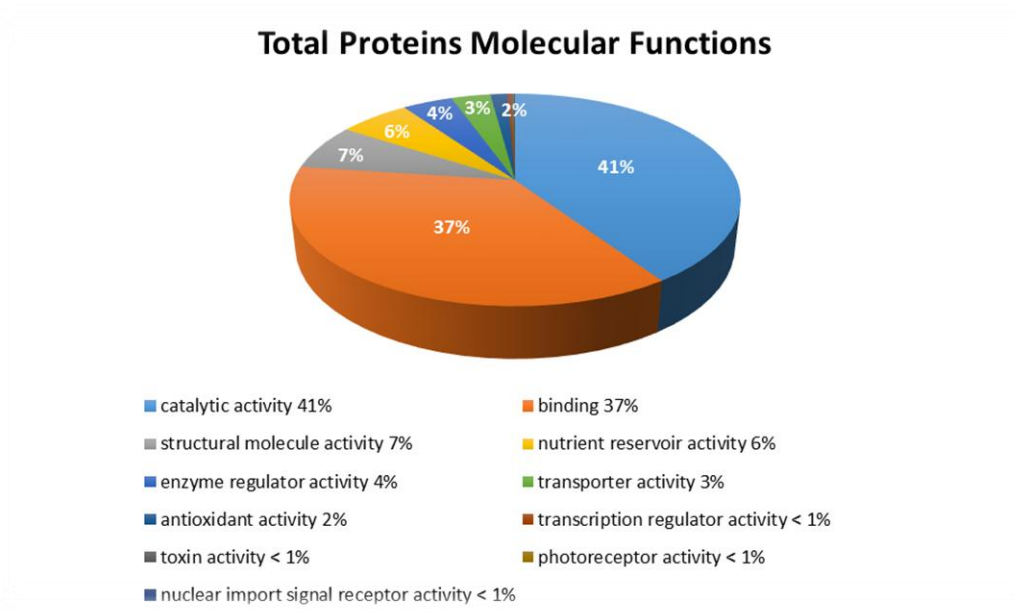
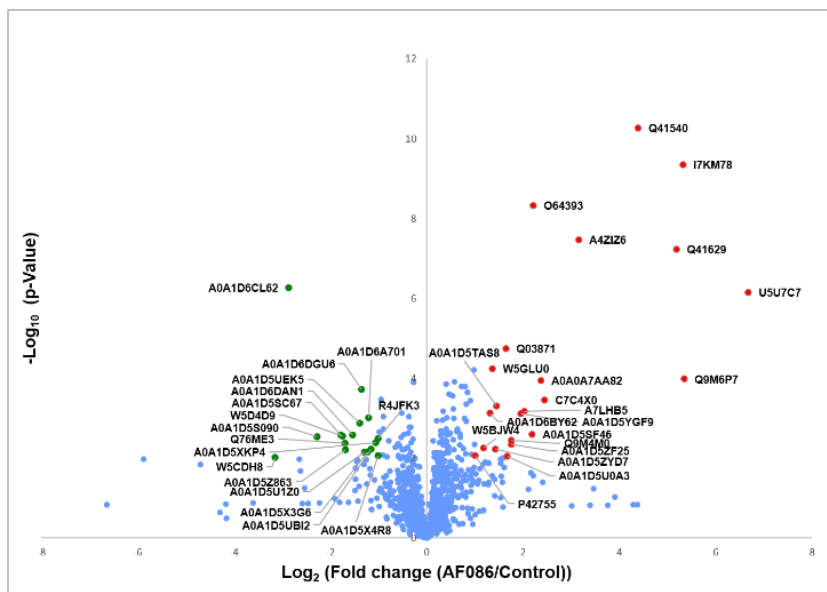
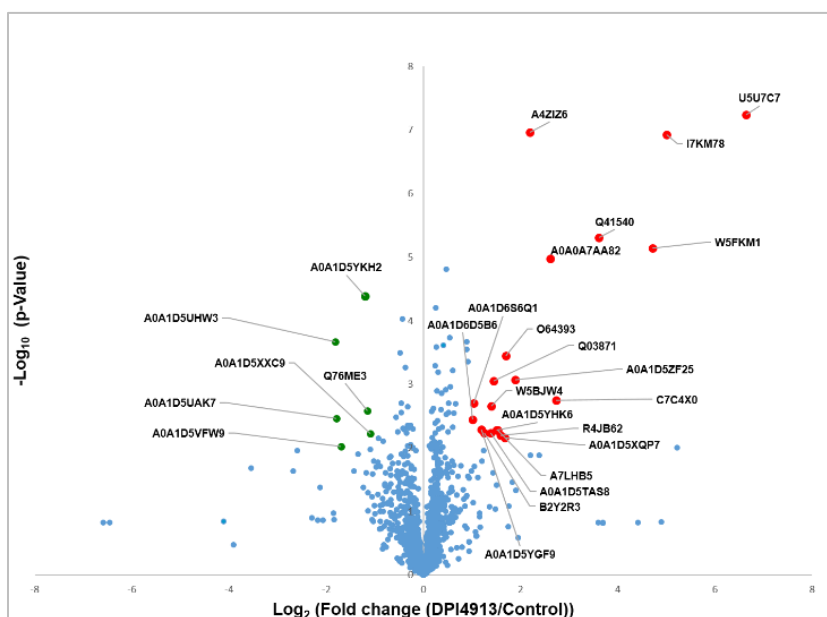


Figure 3: Quantitative Proteomics analysis of flour samples from durum wheat grain after biostimulants (A) AF086 and (B) DPI4919 biostimulant treatments of the plant. Volcano plot [$-\log_{10}(\text{p-value})$ vs. $\log_2(\text{fold change})$] highlighting proteins with significantly varying abundance in the samples. Statistical analysis was performed from three biological replicates with a two-sided Student t-test, variance correction and permutation-based false discovery rate (FDR). Proteins with an adjusted p-value ≤ 0.05 were considered to be significantly regulated if they presented a \log_2 -fold change ≥ 1 (in red) or ≤ -1 (in green) (corresponding to a 2-fold change in protein abundance). Those proteins considered to be significant are shown with their corresponding accession names.

A



B



Grain proteins with varying abundances after biostimulants treatment were classified in four functional categories: grain technological properties, storage function, regulation processes and stress/defense responses. A total of 14 proteins, including nine defense proteins, four storage proteins and one protein involved in grain technological properties, were found to be differentially represented for both DPI4913 and AF086-treated samples as compared to Control (Table 2). 12 proteins were found to be differentially represented specifically in DPI4913-treated samples, of which two defense proteins, two storage proteins, six regulation proteins and two unclassified proteins (Table 3). We found 24 proteins differentially represented specifically in AF086-treated samples, of which 12 defense proteins, three regulation proteins, three storage proteins, one protein involved in technological properties and five unclassified proteins (Table 4).

3.3 Proteins involved in grain technological properties

Among the technological properties of durum wheat described by Troccoli et al. (Troccoli et al., 2000), grain hardness and protein concentration are the main traits taken into account.

In our study, two proteins differentially represented by biostimulants have these traits. A grain softness protein from the puroindoline-like family, Gsp1D, was found to be five times more abundant after both DPI4913 and AF086 treatments, compared to the Control treatment. Its role is uncertain but puroindolines may enhance grain hardness, having an effect on the adhesion between the constituent polymers (starch granules and protein network) of endosperm cells, impacting milling behavior and flour yield. In the same way, Heinze et al. have shown that increased grain hardness may occur due to the failure of PU1A-encoding gene expression or mutations in the PU1B-encoding gene (Heinze et al., 2016). This result suggests that DPI4913 and AF086 would increase grain hardness.

A protein ubiquitin-protein transferase (A0A1D5S090, uncharacterized protein) was specifically under-represented by AF086 (five time less abundant than for the Control treatment). It has been shown that ubiquitin-related genes are differentially represented in isogenic lines contrasting for pericarp cell size and grain weight in hexaploid wheat (Brinton et al., 2017). Thus, AF086 would increase cell size and grain weight.

3.4 Proteins involved in storage functions

Storage proteins accumulation depends on regulatory proteins. Indeed, in the developing endosperm cells, prolamins are folded and assembled in the endoplasmic reticulum, where the enzyme protein disulfide isomerase may catalyze disulfide bond formation and exchange, affecting the functional properties of gluten (Kim et al., 1988; Shewry and Tatham, 1997).

The ratios between the different components of storage proteins has been associated with technological performances (Flagella et al., 2010). In our study, gluten components proteins were differentially represented by both the DPI4913 and AF086 treatments.

Gliadin family proteins differentially represented by DPI4913 and AF086 were substantially over-represented (maximum fold change: 102.0). Glutenin fractions differentially represented by DPI4913 and AF086 were less over-represented (maximum fold-change: 3.1) or under-represented. It appears that the gliadin-to-glutenin ratio was increased by biostimulants. Similarly, nitrogen supply has been shown to be accompanied by an increase in gliadin-to-glutenin ratio (Daniel and Triboni, 2000). In our experiment, the effect of DPI4913 and AF086 on the increase of the amount of proteins in grains per plant (see Section 3.1) led to an increase in the gliadin-to-glutenin ratio.

An increase in the expression of gamma-gliadin and alpha-gliadin was observed in grains of plants treated with DPI4913 and AF086. Previous studies reported alpha-gliadin to be over-represented under water or heat stress (Majoul et al., 2004; Pompa et al., 2013) and under water stress for gamma-gliadin (Giuliani et al., 2015). HMW-GS expression was also increased by DPI4913 and AF086. Like gamma-gliadin and alpha-gliadin, HMW-GS has been reported by Pompa et al. (Pompa et al., 2013) to be over-represented under heat stress. It appears that mechanisms similar to those implied in response to water stress or heat stress are activated by biostimulant application.

Furthermore, HMW-GS and gamma-gliadin are interesting proteins able to store nitrogen when the supply of nitrogen increases (Altenbach et al., 2011a; Dupont and Altenbach, 2003). Thus, the over-representation of HMW-GS and gamma-gliadin by biostimulants can be linked with a need to store nitrogen, and thus to an increase in the amount of nitrogen in grains.

LMW-GS expression was affected by both biostimulants but not in the same way. It was over-represented by DPI4913 and under-represented by AF086. As mentioned above, HMW-GS is considered to have an impact on bread-making quality (Barro et al., 1997), whereas LMW-GS is considered to contribute to pasta-making quality (Masci et al., 2000). DPI4913 would then have a greater influence on pasta-making quality than AF086.

However, since HMW-GS and LMW-GS are respectively over-represented and under-represented by AF086, it increases the HMW-GS-to-LMW-GS ratio, which has been associated with a better technological performance (Flagella et al., 2010). Moreover, the observed under-representation of LMW-GS with AF086 is similar to that observed in response to water stress (Giuliani et al., 2015) or heat stress (Pompa et al., 2013). Then, AF086 – as DPI4913 – impacts metabolic pathways involved in response to water stress or heat stress and contributes to improve wheat technological quality.

3.5 Proteins involved in regulation processes

Among the proteins involved in regulation processes, transcription factors are DNA binding proteins that control the rate of transcription of genetic information from DNA to messenger RNA by binding to a specific DNA sequence (Romeuf et al., 2010). Histones are also involved in the regulation of transcription since they are responsible for DNA condensation, organization and regulation in the nucleus, impacting accessibility and effectiveness of the transcriptional machinery (Asensi-Fabado et al., 2017; Bonnot et al., 2017).

Regulation pathways concerning information within the individual cell and throughout the plant are activated at the cellular level when subjected to biotic and abiotic stresses. In this study, grain proteins involved in regulation processes were differentially represented by DPI4913 and AF086, but none was differentially represented by both biostimulants.

DNA-binding protein expression was influenced by DPI4913 application. Indeed, proteins belonging to the DNA-binding protein family were differentially represented by DPI4913: a histone H2A was under-represented, and an uncharacterized DNA-binding protein was over-represented. One DNA-binding protein, a histone H2B protein, was down-regulated by AF086. Zhou et al. (Zhou et al., 2015) discussed the role of two H2A-H2B dimers, constituting the entry/exit point of nucleosomal DNA access. It thus appears that DPI4913 and AF086 have an impact on the transcriptional machinery regulation.

Moreover, an uncharacterized protein belonging to the zinc-binding protein was over-represented by DPI4913. Forty percent of the Zn-binding proteins are transcription factors and it has been shown that the number of zinc-binding proteins is linearly correlated with the total number of proteins encoded by the genome of vegetal or animal organisms (Andreini et al., 2006; Cakmak et al., 2010). The over-representation of a zinc-binding protein is correlated with the observed increase of the total amount of proteins in grains for plants treated with DPI4913.

A protein-disulfide isomerase was over-represented by DPI4913. This enzyme is necessary for synthesis, polymerization and the accumulation of storage proteins in many tissues (Bulleid and Freedman, 1988; Li et al., 1993), this result can be linked to the previously described modification of storage proteins expression by DPI4913.

A beta-amylase was under-represented by DPI4913. During grain development, beta-amylase is a starch-degrading enzyme that cleaves a 1,4-D-glucosidic bond from polyglucans (Vinje et al., 2011). It is considered to be one of the major proteins in the starchy endosperm. The under-representation of beta-amylase by DPI4913 might lead to starch accumulation in grains.

Similarly, an uncharacterized protein with hydrolase activity, hydrolyzing O-Glycosyl compounds, was down-regulated by DPI4913. O-Glycosyl hydrolases hydrolyze the glycosidic bond between two or more carbohydrates. Inactivating the sucrose degradation pathways is linked to an increased accumulation of soluble carbohydrates (Nair et al., 2012).

An uncharacterized protein described as having a phosphoenolpyruvate carboxylase activity was down-regulated by AF086. Phosphoenolpyruvate carboxylase was identified by González et al. in the protein bodies of immature durum wheat grains (Araus et al., 1993) and reported to contribute to amino acid and protein biosynthesis during grain development (González et al., 1998). Our results suggest that AF086 influences amino acid and protein biosynthesis during grain development.

Aspartic-type endopeptidase was under-represented by AF086. It was suggested by Darabi and Seddigh that it participates in storage protein degradation during the mobilization of reserve proteins in seed germination of wheat (Darabi and Seddigh, 2015). Aspartic-type endopeptidase also regulates other plant mechanisms such as senescence, stress responses, programmed cell death, reproduction, and antimicrobial defenses (Davies, 1990; Ge et al.,

2005; Guevara et al., 2004; Mutlu and Gal, 1999; Rawlings and Barrett, 1995; Simões and Faro, 2004). The level of expression of this enzyme is of great importance since it may be potentially damaging when over-represented or present in high concentrations (Rawlings et al., 2004). Thus, by down-expressing aspartic-type endopeptidase activity, AF086 may reduce protein degradation and have an impact on senescence, stress response, programmed cell death, reproduction, and antimicrobial defenses.

Variations of regulatory proteins after treatments may impact important cellular pathways and functions like protein synthesis and protein degradation that may have direct effect on protein accumulation in the grain or that may be related to responses to various abiotic and biotic stresses.

3.6 Proteins involved in stress and defense response

Some proteins involved in stress and defense responses are differentially represented by both DPI4913 and AF086, while others are differentially represented specifically either by DPI4913 or by AF086.

Three proteins belonging to the alpha-amylase inhibitor family were over-represented by both DPI4913 and AF086: CM 17 protein, monomeric alpha-amylase inhibitor and alpha-amylase inhibitor CM1. Alpha-amylase inhibitor proteins are key natural players in plant defense against insect and microorganisms (Fürstenberg-Hägg et al., 2013). Among defense proteins, alpha-amylase inhibitor proteins were identified as defense-related enzymes. Alpha-amylase inhibitors are also considered to be storage proteins that compensate for amino acid insufficiency during seedling growth (Altenbach et al., 2011b). The multiple forms of proteins in this family, and their abundance during grain development is linked to a need to protect starch, deposited in the endosperm from degradative enzymes (Skylas et al., 2000). Therefore, DPI4913 and AF086 may have an impact on grain filling by protecting starch deposition or by storing amino acids.

A cysteine-type endopeptidase inhibitor was specifically under-represented by DPI4913. Cysteine-type endopeptidases are enzymes involved in storage protein maturation (Capocchi et al., 2000; Muramatsu and Fukazawa, 1993) and can be induced in seeds for stress tolerance such as drought (Harrak et al., 2001; Koizumi et al., 1993) or damage by pathogens (Linthorst et al., 1993; Stevens et al., 1996). Even if DPI4913 has a positive effect on grain filling and

stress defense through the over-representation of certain types of proteins, it appears that it has a more debatable effect on protein maturation and stress defense through the under-representation of a cysteine-type endopeptidase.

Two uncharacterized proteins belonging to the unfolded protein binding family were specifically over-represented by AF086. Unfolded protein-binding families are molecular chaperones, binding proteins that are in unstable, non-native structural states (Boston et al., 1996). AF086 would help to prevent protein denaturation in the case of a stressful environment.

One ATP-binding protein belonging to the Heat Shock Protein 70 family (HSP 70) was over-represented by both DPI4913 and AF086, whereas another one was specifically under-represented by AF086. HSP70 protein expression increases in response to high temperature during grain filling (Hurkman et al., 1998). The mechanisms of sHSP action are not fully understood, even if they are highly inducible by stress. They have an ATP-independent chaperone activity and prevent thermal aggregation by binding to denatured proteins. They help in the proper folding of proteins in association with other chaperones (Lee and Vierling, 2000; Sun et al., 2002). Two other heat-stress-induced proteins, peptidylprolyl isomerase (Kurek et al., 1999) and wheatwin-2 protein (Altenbach et al., 2007) were over-represented by both DPI4913 and AF086. Thus, our results show that DPI4913 and AF086 differentially express some heat-stress-responsive proteins.

A GTP-binding protein, which is an ADP-ribosylation factor affected by environmental stresses (Pu et al., 2014), was under-represented by both DPI4913 and AF086. In addition, an uncharacterized protein belonging to the GTP-binding protein family was specifically under-represented by DPI4913. Grover et al. (2001) observed that GTP-binding proteins led to the regulation of a cascade of kinases that play a substantial role in environmental stress signal transduction. High temperatures would also increase the production of GTP-binding proteins, leading to the enhancement of kinase activities. Contrary to what has been reported above, DPI4913 and AF086 under-represented some heat-responsive proteins.

The expression of a calcium-transporting ATPase that plays a role in transport systems and stress signaling in cellular homeostasis (Huda et al., 2013) was increased by both DPI4913 and AF086. Therefore, DPI4913 and AF086 also had a role on stress signaling pathways.

In addition, calcium-transporting ATPases are defense-related enzymes that play a role in transport systems and stress signalling in cellular homeostasis (Huda et al., 2013). Calcium is known as a secondary messenger in many signaling pathways. It mediates responses to environmental stresses such as heat and cold stresses, salinity, osmotic and oxidative stress, drought, plant hormones and pathogens (McAinsh and Pittman, 2009).

An ATP carrier protein 1 was specifically over-represented by AF086. This protein catalyzes the exchange of ADP and ATP across the mitochondrial inner membrane and may control reactive oxygen species generation by means of energy-dissipating systems (Pastore et al., 2007). A peroxidase, also reported to respond to oxidative stress (Zhang et al., 2017), was also specifically over-represented by AF086. Moreover, the protein peroxidase is described as having an antifungal function (Caruso et al., 2001; Victorio et al., 2018). Thus, AF086 had a positive effect on plant response to oxidative stress and enhanced plant response to biotic stress.

A protein from the Glutathione S-transferase family was under-represented by AF086. Glutathione S-transferase proteins were reported to have different enzymatic properties and to be differentially regulated by xenobiotics and by pathogen attacks (Mauch and Dudler, 1993). This implies that AF086 was involved in biotic stress response.

An uncharacterized protein belonging to the late embryo abundant (LEA) protein family was over-represented by AF086. Two uncharacterized proteins involved in response to freezing and to cold were also under-represented by AF086. An Em protein, H5, was over-represented by AF086. The Em gene of wheat encodes the first LEA protein group (Nezhadahmadi et al., 2013), playing a key role in environmental stress response (Li et al., 2018). They help other proteins to fold after denaturation during water stress (Campbell and Close, 1997). Thus, AF086 induced the differential expression of proteins involved in abiotic stress responses.

In our results, the determination of water-use efficiency, which refers to the ratio of biomass produced to the cumulative transpiration, was improved by 15.4% by DPI4913 and by 9.9% by AF086 application (Table 5). A high water-use efficiency is usually considered as a trait of water deficit tolerance. The total dry biomass produced per unit of water transpired was significantly higher for plants treated with both DPI4913 and AF086. This result is in agreement with the observed effect of biostimulants on grain protein expression. DPI4913 and

AF086 appeared to increase the expression of some proteins involved in abiotic stress defense.

Table 5: Water-use efficiency with different foliar treatments in a greenhouse experiment; southwest France

	Water-use efficiency (g.L ⁻¹)			
Average ± SD				
CONTROL	0.71	±	0.11	a
DPI 4913	0.82	±	0.14	b
AF086	0.78	±	0.12	b
ANOVA P-value				
Treatment	< 0.001			
Block	0.06			

Note : The letters (a and b) indicate a statistical difference (P < 0.05) between treatments

(WUE = total dry biomass per plant at harvest/water transpired from second node stage until harvest)

Table 2: List of significantly over- or under-represented proteins identified in mature grains of durum wheat both after DPI4913 and AF086 treatments

Gene name	UniProt Accession number	Protein name	Molecular function	Fold change Biostimulant vs Control	
				AF086	DPI4913
<i>Defense</i>					
	Q41540	CM 17 protein	Alpha-amylase inhibitor activity	20.9	12.2
	A4ZIZ6	Monomeric alpha-amylase inhibitor (Fragment)	Alpha-amylase inhibitor activity	8.9	4.6
wtai-CM1	C7C4X0	Alpha amylase inhibitor CM1 (Fragment)	Alpha-amylase inhibitor activity	5.5	6.7
PR4B	O64393	Wheatwin-2	Antimicrobial. Fungicide. Pathogenesis-related protein	4.6	3.2
	A0A1D5YGF9	Peptidylprolyl isomerase	Interconversion of cis-trans isomers	3.9	2.3
	A0A1D5ZF25	Calcium-transporting ATPase	Roles in transport systems and stress signaling in cellular homeostasis	3.4	3.7
	A0A1D5TAS8	Uncharacterized protein	ATP-binding	2.7	2.6
	W5BJW4	Uncharacterized protein	GTP-binding	2.3	2.6
arf	Q76ME3	ADP-ribosylation factor	GTP-binding	0.3	0.4
<i>Storage</i>					
	U5U7C7	Gamma-gliadin	Nutrient reservoir activity	102.0	99.3
GID-HE1	I7KM78	Gamma-gliadin	Nutrient reservoir activity	39.9	32.2
gli-wE12	A7LHB5	Alpha gliadin	Nutrient reservoir activity	4.1	2.9
Glu-1By9	Q03871	HMW glutenin subunit 1By9	Nutrient reservoir activity	3.1	2.7
<i>Technological properties</i>					
Gsp-1D	A0A0A7AA82	Grain softness protein (Fragment)	Puroindoline like	5.2	6.1

Table 3: List of significantly over- or under-represented proteins identified in mature grains of durum wheat specifically for the DPI4913 treatment

<i>Gene name</i>	<i>Accession number</i>	<i>Gene-product</i>	<i>Molecular function</i>	<i>Fold change DPI4913 vs Control</i>
<i>Defense</i>				
	A0A1D5UAK7	Cysteine proteinase inhibitor	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity	0.3
	A0A1D5UHW3	Uncharacterized protein	GTP binding (small GTPase mediated signal transduction)	0.3
<i>Regulation</i>				
	W5FKM1	Uncharacterized protein	Zinc ion binding	26.3
	A0A1D5XQP7	Protein disulfide-isomerase	Cell redox homeostasis	3.2
	A0A1D6S6Q1	Uncharacterized protein	DNA binding/ transcription factor activity. sequence-specific DNA binding	2.1
	A0A1D5XXC9	Beta-amylase / Amylopectin maltohydrolase	Amylopectin maltohydrolase activity/ beta-amylase activity	0.5
	A0A1D5YKH2	Histone H2A	DNA binding/ protein heterodimerization activity	0.4
	A0A1D5VFW9	Uncharacterized protein	Hydrolase activity ; hydrolyzing O-glycosyl compounds (carbohydrate metabolic process)	0.3
<i>Storage</i>				
LMW-GS	R4JB62	Low-molecular-weight glutenin subunit	Nutrient reservoir activity	3.0
GluB3-6	B2Y2R3	Low molecular weight glutenin subunit	Nutrient reservoir activity	2.4
<i>Unclassified</i>				
	A0A1D5YHK6	Uncharacterized protein		2.8
	A0A1D6D5B6	Uncharacterized protein		2.0

Table 4: List of significantly over- or under-represented proteins identified in mature grains of durum wheat specifically for the AF086 treatment

Gene name	UniProt Accession number	Protein name	Molecular function	Fold change AF086 vs Control
<i>Defense</i>				
ANT-G1	Q41629	ADP.ATP carrier protein 1 ; mitochondrial	Catalyzes the exchange of ADP and ATP across the mitochondrial inner membrane	36.3
	A0A1D5SF46	Uncharacterized protein	Unfolded protein binding	4.6
	A0A1D5U0A3	Uncharacterized protein	Unfolded protein binding	3.2
	A0A1D5ZYD7	Uncharacterized protein	Oxidoreductase activity/ zinc ion binding	2.7
	W5GLU0	Uncharacterized protein	Co and Zn ion binding / proton-transporting ATP synthase activity. rotational mechanism	2.6
EMH5	A0A1D6BY62	Peroxidase	Hydrogen peroxide catabolic process/ response to oxidative stress	2.5
	P42755	Em protein H5	Stress response	2.0
	A0A1D5XKP4	Uncharacterized protein	Response to freezing	0.5
	A0A1D5UBI2	Uncharacterized protein	Response to cold/oxidative stress	0.4
	A0A1D6DGU6	Uncharacterized protein	ATP binding	0.4
TRAES_3BF06360 0070CFD_c1	A0A1D5SC67	Uncharacterized protein	Unknown (belongs to LEA protein family)	0.3
	W5D4D9	Uncharacterized protein	Glutathion S-transferase activity	0.3
<i>Regulation</i>				
	A0A1D5X4R8	Histone H2B	Regulation of transcription. replication and repair of DNA	0.5
	A0A1D6CL62	Uncharacterized protein	Phosphoenolpyruvate carboxylase activity	0.1
	A0A1D5X3G6	Uncharacterized protein	Aspartic-type endopeptidase activity	0.4
<i>Storage</i>				
LMW-GS	Q9M6P7	Gamma-gliadin (fragment)	Nutrient reservoir activity	40.5
	Q9M4M0	Alpha-gliadin	Nutrient reservoir activity	3.4
	R4JFK3	Low-molecular-weight glutenin subunit (fragment)	Nutrient reservoir activity	0.5
<i>Technological properties</i>				
	A0A1D5S090	Uncharacterized protein	Ubiquitin-protein transferase activity	0.2
<i>Unclassified</i>				
	A0A1D5U1Z0	Malate synthase	Malate synthase activity	0.4
	A0A1D6A701	Uncharacterized protein		0.4
	A0A1D5UEK5	Uncharacterized protein		0.4
	A0A1D6DAN1	Uncharacterized protein		0.3
	A0A1D5Z863	Uncharacterized protein		0.3

4 Conclusions

This study provides clues about the effects of DPI4913 and AF086 on wheat grain production and quality. Biostimulants induce an increase in grain yield and protein quantity. The increase in the protein quantity is associated with a modification of the protein composition in the grains. To investigate the changes in protein composition of wheat grain after DPI4913 and AF086 biostimulants treatments of the plant, we performed a comparative total proteome analysis of the flour from milled grains of durum wheat. Fifty proteins were found to be differentially represented after DPI4913 and AF086 treatments, including 14 in common to both treatments.

These identified proteins were involved in metabolic pathways and processes, including storage, regulation processes, and defense response against abiotic and biotic stresses. Among them, four proteins were particularly differentially represented: i) gamma-gliadin, which is a storage protein that is substantially over-represented by both DPI4913 and AF086, implied in technological properties and water stress response; ii) ADP/ATP carrier protein-1, which is over-represented by AF086, implied in plant defense mechanisms against biotic stress; iii) the Zn-ion binding protein, which is over-represented by DPI4913 implied in transcription regulation processes; and iv) CM 17, which is over-represented by both DPI4913 and AF086, implied in starch degradation inhibition, amino acid storage and plant defense mechanisms against biotic stress.

As for CM 17 and ADP/ATP carrier protein-1, their implication in biotic stress has provided a foundation for further studies. Moreover, characterizing the transcription regulation processes affected by the Zn-ion binding protein would also allow us to further understand and describe biostimulant action mechanisms.

Author Contributions

EAL and SV oversaw the greenhouse experiment. CP and AG oversaw proteomic analysis. AG, CP and EAL collected and analyzed the data. CP and EAL wrote the first draft of the manuscript. CD provided expertise on biostimulants and helped design the experiment. OBS, PG and TL supervised the research work, helped design the experiment, analyzed data and improved the manuscript content.

Funding

This work has been supported by the Pôle Agri-Sud-Ouest Innovation, and funded by the Région Occitanie, French FUI (Fond Unique Interministeriel), Bpifrance (Banque Publique d'Investissement), European funds (Fonds Européens de Développement Régional, FEDER), Toulouse Métropole, and by the French Ministry of Research with the program of the Investissement d'Avenir Infrastructures Nationales en Biologie et Santé (ProFI, Proteomics French Infrastructure project, ANR-10-INBS-08). ANRT supported the PhD grant (CIFRE).

Acknowledgments

The authors acknowledge Bernard Leguevaques, Michel Labarrère, Eric Lecloux, Sébastien Viudes, Bastien Dauphin, Diana Lezier and Maxime Chabeaudie for their technical assistance. The authors thank Gail Wagman for proof reading the English of the article.

5 REFERENCES

- Aguirrezábal, L., Martre, P., Pereyra-Irujo, G., Echarte, M. M., and Izquierdo, N. (2015). “Chapter 17 - Improving grain quality: ecophysiological and modeling tools to develop management and breeding strategies,” in *Crop Physiology (Second Edition)*, eds. V. O. Sadras and D. F. Calderini (San Diego: Academic Press), 423–465. doi:10.1016/B978-0-12-417104-6.00017-0.
- Altenbach, S. B., Kothari, K. M., Tanaka, C. K., and Hurkman, W. J. (2007). Genes encoding the PR-4 protein wheatwin are developmentally regulated in wheat grains and respond to high temperatures during grainfill. *Plant Sci.* 173, 135–143. doi:10.1016/j.plantsci.2007.04.007.
- Altenbach, S. B., Tanaka, C. K., Hurkman, W. J., Whitehand, L. C., Vensel, W. H., and Dupont, F. M. (2011a). Differential effects of a post-anthesis fertilizer regimen on the wheat flour proteome determined by quantitative 2-DE. *Proteome Sci.* 9, 46. doi:10.1186/1477-5956-9-46.
- Altenbach, S. B., Vensel, W. H., and Dupont, F. M. (2011b). The spectrum of low molecular weight alpha-amylase/protease inhibitor genes expressed in the US bread wheat cultivar Butte 86. *BMC Res. Notes* 4, 242. doi:10.1186/1756-0500-4-242.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., and Rosato, A. (2006). Zinc through the three domains of life. *J. Proteome Res.* 5, 3173–3178. doi:10.1021/pr0603699.
- Araus, J. L., Bort, J., Brown, R. H., Bassett, C. L., and Cortadellas, N. (1993). Immunocytochemical localization of phosphoenolpyruvate carboxylase and photosynthetic gas-exchange characteristics in ears of *Triticum durum* Desf. *Planta* 191, 507–514. doi:10.1007/BF00195752.

- Arena, S., D'Ambrosio, C., Vitale, M., Mazzeo, F., Mamone, G., Di Stasio, L., et al. (2017). Differential representation of albumins and globulins during grain development in durum wheat and its possible functional consequences. *J. Proteomics* 162, 86–98. doi:10.1016/j.jprot.2017.05.004.
- Asensi-Fabado, M.-A., Amtmann, A., and Perrella, G. (2017). Plant responses to abiotic stress: The chromatin context of transcriptional regulation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1860, 106–122. doi:10.1016/j.bbagr.2016.07.015.
- Baker, D. A., Young, D. L., Huggins, D. R., and Pan, W. L. (2004). Economically Optimal Nitrogen Fertilization for Yield and Protein in Hard Red Spring Wheat. *Agron. J.* 96, 116–123. doi:10.2134/agronj2004.1160.
- Barak, S., Mudgil, D., and Khatkar, B. S. (2015). Biochemical and functional properties of wheat gliadins: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55, 357–368. doi:10.1080/10408398.2012.654863.
- Barro, F., Rooke, L., Békés, F., Gras, P., Tatham, A. S., Fido, R., et al. (1997). Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. *Nat. Biotechnol.* 15, 1295–1299. doi:10.1038/nbt1197-1295.
- Bonnot, T., Bancel, E., Alvarez, D., Davanture, M., Boudet, J., Pailloux, M., et al. (2017). Grain subproteome responses to nitrogen and sulfur supply in diploid wheat *Triticum monococcum* ssp. *monococcum*. *Plant J.* 91, 894–910. doi:10.1111/tpj.13615.
- Boston, R. S., Viitanen, P. V., and Vierling, E. (1996). Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* 32, 191–222. doi:10.1007/BF00039383.
- Brinton, J., Simmonds, J., and Uauy, C. (2017). Ubiquitin-related genes are differentially expressed in isogenic lines contrasting for pericarp cell size and grain weight in hexaploid wheat. *bioRxiv*, 175471. doi:10.1101/175471.
- Bulleid, N. J., and Freedman, R. B. (1988). Defective co-translational formation of disulphide bonds in protein disulphide-isomerase-deficient microsomes. *Nature* 335, 649–651. doi:10.1038/335649a0.
- Cakmak, I., Pfeiffer, W. H., and McClafferty, B. (2010). REVIEW: Biofortification of Durum Wheat with Zinc and Iron. *Cereal Chem. J.* 87, 10–20. doi:10.1094/CCHEM-87-1-0010.
- Campbell, S. A., and Close, T. J. (1997). Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytol.* 137, 61–74. doi:10.1046/j.1469-8137.1997.00831.x.
- Capocchi, A., Cinollo, M., Galleschi, L., Saviozzi, F., Calucci, L., Pinzino, C., et al. (2000). Degradation of gluten by proteases from dry and germinating wheat (*Triticum durum*) seeds: An in vitro approach to storage protein mobilization. *J. Agric. Food Chem.* 48, 6271–6279.

- Caruso, C., Chilosi, G., Leonardi, L., Bertini, L., Magro, P., Buonocore, V., et al. (2001). A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. *Phytochemistry* 58, 743–750. doi:10.1016/S0031-9422(01)00226-6.
- Chaoying Ma, Jianwen Zhou, Guanxing Chen, Yanwei Bian, Dongwen Lv, Xiaohui Li, et al. (2014). iTRAQ-based quantitative proteome and phosphoprotein characterization reveals the central metabolism changes involved in wheat grain development. *BMC Genomics* 15, 1–38. doi:10.1186/1471-2164-15-1029.
- Colla, G., Cardarelli, M., Bonini, P., and Rouphael, Y. (2017). Foliar Applications of Protein Hydrolysate, Plant and Seaweed Extracts Increase Yield but Differentially Modulate Fruit Quality of Greenhouse Tomato. *HortScience* 52, 1214–1220. doi:10.21273/HORTSCI12200-17.
- Colla, G., Rouphael, Y., Bonini, P., and Cardarelli, M. (2015). Coating seeds with endophytic fungi enhances growth, nutrient uptake, yield and grain quality of winter wheat. 171–189.
- Correia, S., Oliveira, I., Queirós, F., Ribeiro, C., Ferreira, L., Luzio, A., et al. (2015). Preharvest Application of Seaweed Based Biostimulant Reduced Cherry (Prunus Avium L.) Cracking. *Procedia Environ. Sci.* 29, 251–252. doi:10.1016/j.proenv.2015.07.187.
- Costa, M. S., Scholz, M. B. dos S., and Franco, C. M. L. (2013). Effect of high and low molecular weight glutenin subunits, and subunits of gliadin on physicochemical parameters of different wheat genotypes. *Food Sci. Technol.* 33, 163–170. doi:10.1590/S0101-20612013000500024.
- Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *J. Appl. Phycol.* 23, 371.
- Daaloul Bouacha, O., Rhazi, L., Aussenac, T., Rezgui, S., and Nouaigui, S. (2015). Molecular characterization of storage proteins for selected durum wheat varieties grown in different environments. *J. Cereal Sci.* 61, 97–104. doi:10.1016/j.jcs.2014.09.005.
- Daniel, C., and Triboni, E. (2000). Effects of Temperature and Nitrogen Nutrition on the Grain Composition of Winter Wheat: Effects on Gliadin Content and Composition. *J. Cereal Sci.* 32, 45–56. doi:10.1006/jcers.2000.0313.
- Darabi, M., and Seddigh, S. (2015). Bioinformatic characterization of aspartic protease (AP) enzyme in seed plants. *Plant Syst. Evol.* 301, 2399–2417. doi:10.1007/s00606-015-1236-8.
- Davies, D. R. (1990). The Structure and Function of the Aspartic Proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 19, 189–215. doi:10.1146/annurev.bb.19.060190.001201.
- Du Cheyron, P., Lesouder, C., and Lorgeou, J. (2014). Obtenir un taux de protéines élevé des grains à la récolte. Available at: <https://www.arvalis-infos.fr/proteines-tenir-compte-de-l-effet-variete-@/view-16063-arvarticle.html> [Accessed April 19, 2018].

- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* 196, 3–14. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.021.
- Dupont, F. M., and Altenbach, S. B. (2003). Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *J. Cereal Sci.* 38, 133–146. doi:10.1016/S0733-5210(03)00030-4.
- El-Boray, M., Mostafa, M., Salem, E., and El - Sawwah, O. A. O. (2015). Improving yield and fruit quality of washington navel orange using foliar applications of some natural biostimulants. *J Plant Prod. Mansoura Univ* 6, 1317–1332.
- European Biostimulants Industry Council (2012). EBIC and biostimulants in brief. Available at: <http://www.biostimulants.eu/> [Accessed October 23, 2017].
- Faessel, L., Gomy, C., Nassr, N., Tostivint, C., Hipper, C., and Dechanteloup, A. (2014). *Produits de stimulation en agriculture visant à améliorer les fonctionnalités biologiques des sols et des plantes - Etude des connaissances disponibles et recommandations stratégiques*. Étude commanditée par le Centre d'Études et de Prospective du Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (MAAF) et financée par le MAAF dans le cadre du programme 215 (Marché n° SSP-2013-094).
- Ferrise, R., Bindi, M., and Martre, P. (2015). Grain filling duration and glutenin polymerization under variable nitrogen supply and environmental conditions for durum wheat. *Field Crops Res.* 171, 23–31. doi:10.1016/j.fcr.2014.10.016.
- Flagella, Z., Giuliani, M. M., Giuzio, L., Volpi, C., and Masci, S. (2010). Influence of water deficit on durum wheat storage protein composition and technological quality. *Eur. J. Agron.* 33, 197–207. doi:10.1016/j.eja.2010.05.006.
- FranceAgriMer (2018). “Marché du blé dur - Récolte 2017,” in *Les Etudes de FranceAgriMer - Céréales* (FranceAgriMer).
- Frioni, T., Sabbatini, P., Tombesi, S., Norrie, J., Poni, S., Gatti, M., et al. (2018). Effects of a biostimulant derived from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* on ripening dynamics and fruit quality of grapevines. *Sci. Hortic.* 232, 97–106. doi:10.1016/j.scienta.2017.12.054.
- Fujihara, S., Sasaki, H., Aoyagi, Y., and Sugahara, T. (2008). Nitrogen-to-protein conversion factors for some cereal products in Japan. *J. Food Sci.* 73, C204-209. doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00665.x.
- Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., and Bak, S. (2013). Plant Defense against Insect Herbivores. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 10242–10297. doi:10.3390/ijms140510242.
- Ge, X., Dietrich, C., Matsuno, M., Li, G., Berg, H., and Xia, Y. (2005). An Arabidopsis aspartic protease functions as an anti-cell-death component in reproduction and embryogenesis. *EMBO Rep.* 6, 282–288. doi:10.1038/sj.embor.7400357.

- Giuliani, M. M., Palermo, C., De Santis, M. A., Mentana, A., Pompa, M., Giuzio, L., et al. (2015). Differential Expression of Durum Wheat Gluten Proteome under Water Stress during Grain Filling. *J. Agric. Food Chem.* 63, 6501–6512. doi:10.1021/acs.jafc.5b01635.
- González, M.-C., Osuna, L., Echevarría, C., Vidal, J., and Cejudo, F. J. (1998). Expression and Localization of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Developing and Germinating Wheat Grains. *Plant Physiol.* 116, 1249–1258. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC35031/> [Accessed January 17, 2018].
- Grover, A., Kapoor, A., Lakshmi, O. S., Agarwal, S., Sahi, C., Katiyar-Agarwal, S., et al. (2001). Understanding molecular alphabets of the plant abiotic stress responses. *Curr. Sci.* 80, 206–216. Available at: <http://www.jstor.org/stable/24104280> [Accessed April 11, 2018].
- Guevara, M. G., Veríssimo, P., Pires, E., Faro, C., and Daleo, G. R. (2004). Potato aspartic proteases: induction, antimicrobial activity and substrate specificity. *J. Plant Pathol.* 86, 233–238. doi:10.4454/jpp.v86i3.993.
- Harrak, H., Azelmat, S., Baker, E. N., and Tabaeizadeh, Z. (2001). Isolation and characterization of a gene encoding a drought-induced cysteine protease in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Genome* 44, 368–374.
- Heinze, K., Kiszonas, A. M., Murray, J. C., Morris, C. F., and Lullien-Pellerin, V. (2016). Puroindoline genes introduced into durum wheat reduce milling energy and change milling behavior similar to soft common wheats. *J. Cereal Sci.* 71, 183–189. doi:10.1016/j.jcs.2016.08.016.
- Huda, K. M. K., Banu, M. S. A., Tuteja, R., and Tuteja, N. (2013). Global calcium transducer P-type Ca²⁺-ATPases open new avenues for agriculture by regulating stress signalling. *J. Exp. Bot.* 64, 3099–3109. doi:10.1093/jxb/ert182.
- Hurkman, W. J., DuPont, F. M., Altenbach, S. B., Combs, A., Chan, R., Tanaka, C. K., et al. (1998). BiP, HSP70, NDK and PDI in wheat endosperm. II. Effects of high temperature on protein and mRNA accumulation. *Physiol. Plant.* 103, 80–90. doi:10.1034/j.1399-3054.1998.1030110.x.
- Kim, W. T., Franceschi, V. R., Krishnan, H. B., and Okita, T. W. (1988). Formation of wheat protein bodies: Involvement of the Golgi apparatus in gliadin transport. *Planta* 176, 173–182. doi:10.1007/BF00392442.
- Koizumi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tsuji, H., and Shinozaki, K. (1993). Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 129, 175–182.
- Kurek, I., Aviezer, K., Erel, N., Herman, E., and Breiman, A. (1999). The wheat peptidyl prolyl cis-trans-isomerase FKBP77 is heat induced and developmentally regulated. *Plant Physiol.* 119, 693–704.

- Latique, S., Aymen Elouaer, M., Chernane, H., Hannachi, C., and Elkaoua, M. (2014). Effet of Seaweed Liquid Extract of *Sargassum vulgare* on Growth of Durum Wheat Seedlings (*Triticum durum* L) under salt stress. *Int. J. Innov. Appl. Stud.*, 1430–1435.
- Lee, G. J., and Vierling, E. (2000). A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol.* 122, 189–198.
- Li, N., Zhang, S., Liang, Y., Qi, Y., Chen, J., Zhu, W., et al. (2018). Label-free quantitative proteomic analysis of drought stress-responsive late embryogenesis abundant proteins in the seedling leaves of two wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *J. Proteomics* 172, 122–142. doi:10.1016/j.jprot.2017.09.016.
- Li, X., Wu, Y., Zhang, D. Z., Gillikin, J. W., Boston, R. S., Franceschi, V. R., et al. (1993). Rice prolamine protein body biogenesis: a BiP-mediated process. *Science* 262, 1054–1056.
- Linthorst, H. J., van der Does, C., Brederode, F. T., and Bol, J. F. (1993). Circadian expression and induction by wounding of tobacco genes for cysteine proteinase. *Plant Mol. Biol.* 21, 685–694.
- Liu, W., Zhang, Y., Gao, X., Wang, K., Wang, S., Zhang, Y., et al. (2011). Comparative proteome analysis of glutenin synthesis and accumulation in developing grains between superior and poor quality bread wheat cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 92, 106–115. doi:10.1002/jsfa.4548.
- Majoul, T., Bancel, E., Triboï, E., Ben Hamida, J., and Branlard, G. (2004). Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: Characterization of heat-responsive proteins from non-prolamins fraction. *PROTEOMICS* 4, 505–513. doi:10.1002/pmic.200300570.
- Masci, S., D’Ovidio, R., Lafiandra, D., and Kasarda, D. D. (2000). A 1B-coded low-molecular-weight glutenin subunit associated with quality in durum wheats shows strong similarity to a subunit present in some bread wheat cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 100, 396–400. doi:10.1007/s001220050052.
- Mauch, F., and Dudler, R. (1993). Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.* 102, 1193–1201. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC158905/> [Accessed January 9, 2018].
- Mazzeo, M. F., Di Stasio, L., D’Ambrosio, C., Arena, S., Scaloni, A., Corneti, S., et al. (2017). Identification of Early Represented Gluten Proteins during Durum Wheat Grain Development. *J. Agric. Food Chem.* 65, 3242–3250. doi:10.1021/acs.jafc.7b00571.
- McAinsh, M. R., and Pittman, J. K. (2009). Shaping the calcium signature. *New Phytol.* 181, 275–294. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02682.x.

- Muramatsu, M., and Fukazawa, C. (1993). A high-order structure of plant storage proprotein allows its second conversion by an asparagine-specific cysteine protease, a novel proteolytic enzyme. *Eur. J. Biochem.* 215, 123–132.
- Mutlu, A., and Gal, S. (1999). Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. *Physiol. Plant.* 105, 569–576. doi:10.1034/j.1399-3054.1999.105324.x.
- Nair, P., Kandasamy, S., Zhang, J., Ji, X., Kirby, C., Benkel, B., et al. (2012). Transcriptional and metabolomic analysis of *Ascophyllum nodosum* mediated freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 13, 643. doi:10.1186/1471-2164-13-643.
- Nezhadahmadi, A., Prodhan, Z. H., and Faruq, G. (2013). Drought Tolerance in Wheat. *Sci. World J.* 2013. doi:10.1155/2013/610721.
- Osborne, T. B. (1907). *The proteins of the wheat kernel*. Washington, D.C.: Carnegie Institution of Washington, Available at: <https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/22763>.
- Pastore, D., Trono, D., Laus, M. N., Di Fonzo, N., and Flagella, Z. (2007). Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress: durum wheat mitochondria. *J. Exp. Bot.* 58, 195–210. doi:10.1093/jxb/erl273.
- Pechanek, U., Karger, A., Gröger, S., Charvat, B., Schöggel, G., and Lelley, T. (1997). Effect of nitrogen fertilization on quantity of flour protein components, dough properties, and breadmaking quality of wheat (English). *Cereal Chem* 74, 800–805.
- Pompa, M., Giuliani, M. M., Palermo, C., Agriesti, F., Centonze, D., and Flagella, Z. (2013). Comparative analysis of gluten proteins in three durum wheat cultivars by a proteomic approach. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2606–2617. doi:10.1021/jf304566d.
- Popko, M., Michalak, I., Wilk, R., Gramza, M., Chojnacka, K., and Górecki, H. (2018). Effect of the New Plant Growth Biostimulants Based on Amino Acids on Yield and Grain Quality of Winter Wheat. *Molecules* 23, 470. doi:10.3390/molecules23020470.
- Pu, Z., Chen, G., Wang, J., Liu, Y., Jiang, Q., Li, W., et al. (2014). Characterization and chromosome location of ADP-ribosylation factors (ARFs) in wheat. *Pak. J. Biol. Sci. PJBS* 17, 792–801. doi:10.3923/pjbs.2014.792.801.
- Rawlings, N. D., and Barrett, A. J. (1995). Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. *Methods Enzymol.* 248, 105–120.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P., and Barrett, A. J. (2004). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 32, D160-164. doi:10.1093/nar/gkh071.
- Romeuf, I., Tessier, D., Dardevet, M., Branlard, G., Charmet, G., and Ravel, C. (2010). wDBTF: an integrated database resource for studying wheat transcription factor families. *BMC Genomics* 11, 185. doi:10.1186/1471-2164-11-185.

- Rouphael, Y., Colla, G., Giordano, M., El-Nakhel, C., Kyriacou, M. C., and De Pascale, S. (2017). Foliar applications of a legume-derived protein hydrolysate elicit dose-dependent increases of growth, leaf mineral composition, yield and fruit quality in two greenhouse tomato cultivars. *Sci. Hortic.* 226, 353–360. doi:10.1016/j.scienta.2017.09.007.
- Samson, M.-F., André, C., Audigeos, D., Besombes, C., Braun, P., Cassan, D., et al. (2016). *Durum Wheat Pasta with a Good Quality and a Reduced Nitrogen Fertilization: Is it Possible?*. Available at: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01606910> [Accessed April 18, 2018].
- Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Pardo, F., Alonso, G. L., and Salinas, M. R. (2017). Moscatel vine-shoot extracts as a grapevine biostimulant to enhance wine quality. *Food Res. Int.* 98, 40–49. doi:10.1016/j.foodres.2017.01.004.
- Savill, G. P., Michalski, A., Powers, S. J., Wan, Y., Tosi, P., Buchner, P., et al. (2018). Temperature and nitrogen supply interact to determine protein distribution gradients in the wheat grain endosperm. *J. Exp. Bot.* doi:10.1093/jxb/ery127.
- Shewry, P. R., and Tatham, A. S. (1997). Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins. *J. Cereal Sci.* 25, 207–227. doi:10.1006/jcrs.1996.0100.
- Simmonds Norman W (2006). The relation between yield and protein in cereal grain. *J. Sci. Food Agric.* 67, 309–315. doi:10.1002/jsfa.2740670306.
- Simões, I., and Faro, C. (2004). Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur. J. Biochem.* 271, 2067–2075. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04136.x.
- Simoes Larraz Ferreira, M. (2011). *Dynamique d'assemblage des protéines de réserve et du remplissage du grain de blé dur*. Montpellier, SupAgro Available at: <http://www.theses.fr/2011NSAM0009> [Accessed June 26, 2017].
- Skylas, D. J., Mackintosh, J. A., Cordwell, S. J., Basseal, D. J., Walsh, B. J., Harry, J., et al. (2000). Proteome Approach to the Characterisation of Protein Composition in the Developing and Mature Wheat-grain Endosperm. *J. Cereal Sci.* 32, 169–188. doi:10.1006/jcrs.2000.0321.
- Song, Y., and Zheng, Q. (2008). Influence of gliadin removal on strain hardening of hydrated wheat gluten during equibiaxial extensional deformation. *J. Cereal Sci.* 48, 58–67. doi:10.1016/j.jcs.2007.08.001.
- Stevens, C., Titarenko, E., Hargreaves, J. A., and Gurr, S. J. (1996). Defence-related gene activation during an incompatible interaction between *Stagonospora* (*Septoria*) *nodorum* and barley (*Hordeum vulgare* L.) coleoptile cells. *Plant Mol. Biol.* 31, 741–749.
- Sun, W., Van Montagu, M., and Verbruggen, N. (2002). Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* 1577, 1–9. doi:10.1016/S0167-4781(02)00417-7.

- Szczepanek, M., Wilczewski, E., Poberezny, J., Wszelaczynska, E., Keutgen, A., and Ochmian, I. (2015). Effect of Biostimulants and Storage on the Content of Macroelements in Storage Roots of Carrot. *J. Elem.* 20, 1021–1031. doi:10.5601/jelem.2015.20.1.768.
- Triboï, E., Martre, P., and Triboï-Blondel, A.-M. (2003). Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *J. Exp. Bot.*, 1731.
- Trocconi, A., Borrelli, G. M., De Vita, P., Fares, C., and Di Fonzo, N. (2000). Mini Review: Durum Wheat Quality: A Multidisciplinary Concept. *J. Cereal Sci.* 32, 99–113. doi:10.1006/jcrs.2000.0322.
- Victorio, V. C. M., Souza, G. H. M. F., Santos, M. C. B., Vega, A. R., Cameron, L. C., and Ferreira, M. S. L. (2018). Differential expression of albumins and globulins of wheat flours of different technological qualities revealed by nanoUPLC-UDMSE. *Food Chem.* 239, 1027–1036. doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.049.
- Vinje, M. A., Willis, D. K., Duke, S. H., and Henson, C. A. (2011). Differential expression of two β -amylase genes (Bmy1 and Bmy2) in developing and mature barley grain. *Planta* 233, 1001–1010. doi:10.1007/s00425-011-1348-5.
- Visioli, G., Galieni, A., Stagnari, F., Bonas, U., Specca, S., Faccini, A., et al. (2016). Proteomics of Durum Wheat Grain during Transition to Conservation Agriculture. *PLoS One* 11, e0156007. doi:10.1371/journal.pone.0156007.
- Yang, M., Dong, J., Zhao, W., and Gao, X. (2016). Characterization of proteins involved in early stage of wheat grain development by iTRAQ. *J. Proteomics* 136, 157–166. doi:10.1016/j.jprot.2016.01.002.
- Zhang, X., and Schmidt, R. (1997). The impact of growth regulators on the α -tocopherol status in water-stressed *Poa pratensis*. *Int. Turfgrass Soc.*, 1364–1371.
- Zhang, Y., Pan, J., Huang, X., Guo, D., Lou, H., Hou, Z., et al. (2017). Differential effects of a post-anthesis heat stress on wheat (*Triticum aestivum* L.) grain proteome determined by iTRAQ. *Sci. Rep.* 7, 3468. doi:10.1038/s41598-017-03860-0.
- Zhen, S., Deng, X., Zhang, M., Zhu, G., Lv, D., Wang, Y., et al. (2017). Comparative Phosphoproteomic Analysis under High-Nitrogen Fertilizer Reveals Central Phosphoproteins Promoting Wheat Grain Starch and Protein Synthesis. *Front. Plant Sci.* 8. doi:10.3389/fpls.2017.00067.
- Zhou, W., Zhu, Y., Dong, A., and Shen, W.-H. (2015). Histone H2A/H2B chaperones: from molecules to chromatin-based functions in plant growth and development. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 83, 78–95. doi:10.1111/tpj.12830.

Chapitre VI

Conclusion et Discussion générale

CHAPITRE VI : *Conclusion et Discussion générale*

L'optimisation de la nutrition azotée du blé dur constitue un enjeu considérable face aux exigences de l'industrie de transformation en terme de contenu protéique du grain et aux pressions réglementaires et sociétales pour limiter les apports en engrais azotés et les problèmes de pollution associés. Dans ce contexte, les stratégies visant à optimiser le prélèvement d'azote minéral du sol et son efficacité d'utilisation par la plante sont en pleine expansion. A ce titre, de nouvelles stratégies comme l'usage de biostimulants sont proposées. Les biostimulants sont définis comme des produits "contenant des substances et/ou des micro-organismes dont la fonction, pour une application foliaire ou rhizosphérique, est de stimuler les processus naturels afin d'améliorer le prélèvement de nutriments, leur efficacité d'utilisation, et la tolérance aux stress abiotiques, ainsi que la qualité des cultures" (EBIC, 2013), et ce indépendamment de leur valeur nutritive. Dans leur revue de synthèse sur les biostimulants, Yakhin et al., (2017a) précisent également qu'au vu des difficultés à déterminer leurs modes d'action, la recherche doit porter principalement sur la détermination d'un champ d'action large plutôt que sur la détermination d'un mode d'action spécifique. C'est ce que nous nous sommes proposés de faire dans ce travail de recherche, en étudiant les effets de deux biostimulants à base d'extrait d'algues et d'acides aminés (DPI4913, algue : *Ascophyllum nodosum*) et à base d'un complexe protéique d'origine fongique (AF086, champignon : *Trichoderma*), l'objectif étant de déterminer leur effet sur l'efficacité d'utilisation de l'azote par le blé dur à l'échelle de la plante, en condition de contrainte hydrique ou azotée.

Les études menées sur les biostimulants à base d'algues, et notamment *Ascophyllum nodosum*, montrent des effets sur la croissance et le rendement en grains du blé tendre et du blé dur (Sen et al., 2015; Shah et al., 2013), sur l'absorption de nutriments comme le potassium par le blé dur (Stamatiadis et al., 2015) et sur la teneur en azote et en protéines des grains (Sen et al., 2015). Concernant les biostimulants à base d'acides aminés, des effets ont été montrés sur la résistance au stress hydrique du blé (Hammad and Ali, 2014). En revanche, les effets de biostimulants à base de protéines extraites de *Trichoderma* sont très peu documentés car la plupart des formulations contiennent des extraits de champignons sous forme viable. Les seules études portent sur l'utilisation de protéines extraites de *Trichoderma*

sur d'autres cultures que le blé et montrent des effets principalement sur la résistance aux stress biotiques (Martinez et al., 2001; Morán-Diez et al., 2009), sur la croissance (Salas-Marina et al., 2015) et sur le développement du système racinaire (Ruocco et al., 2015).

De manière générale, de nombreux travaux rapportent les effets bénéfiques de biostimulants d'origine algale, fongique ou à base d'acides aminés sur le rendement et la qualité des fruits, la croissance, le prélèvement d'éléments minéraux, le développement du système racinaire et la résistance aux stress abiotiques de diverses cultures. En revanche, la plupart de ces travaux sont conduits en conditions contrôlées, peu d'études sont menées sur le blé dur, et encore moins sur les flux d'azote à l'échelle de la plante.

Ainsi, ce travail de thèse s'appuie sur trois objectifs principaux : étudier l'impact des biostimulants DPI4913 et AF086 sous contrainte hydrique ou azotée sur i) le rendement en grains et la croissance du blé dur, ii) le prélèvement et la dynamique de l'azote dans la plante, et iii) la qualité du grain en terme de contenu protéique.

A cette fin, six essais au champ et deux essais en serre ont été menés au cours de trois années d'expérimentation. Dans leur revue sur le développement de biostimulants, Rouphael et al. (2018) rapportent que la combinaison d'essais en conditions naturelles et en conditions contrôlées permet d'étudier efficacement les biostimulants. Ils précisent également que l'activité des biostimulants est modulée par de nombreux facteurs interagissant entre eux, tels que les conditions de culture, la dose et le stade d'application, la présence de contraintes abiotiques difficilement contrôlables en conditions naturelles ou bien encore des conditions pédo-climatiques variables. Ainsi, les expérimentations en conditions naturelles permettent de déterminer les conditions de culture pour lesquelles les biostimulants ont un effet, tandis que les expérimentations en conditions contrôlées visent à comprendre les mécanismes mis en jeu à l'échelle de la plante. Dans ce travail de thèse, les essais au champ et en serre mis en place visaient à étudier les effets de DPI4913 et AF086 sur le rendement en grains et la croissance (objectif i). Les essais en serre étaient destinés à déterminer l'impact des biostimulants sur le prélèvement et la dynamique de l'azote dans la plante (marquages ^{15}N), et la qualité du grain en terme de contenu protéique (objectifs ii et iii). Nous avons choisi également de tester plusieurs conditions d'application en faisant varier le stade d'application et la présence ou non d'une contrainte abiotique (hydrique ou azotée), afin de caractériser les conditions d'efficacité optimales des produits. Au-delà des informations fournies par l'entreprise Agronutrition sur le

stade d'application des produits à Dernière Feuille étalée (DFE, maximum de surface foliaire), deux autres stades d'application ont été testés : le stade deux nœuds pour lequel l'absorption des nutriments par la plante est maximale (Delogu et al., 1998), et le stade floraison à partir duquel commence la remobilisation des réserves des organes en sénescence vers les grains (Kichey et al., 2007). Les facteurs et modalités de facteurs testés pour les différents essais au champ et en serre sont présentés dans la Figure 19.

ESSAI	Biostimulant			Stade d'application				Irrigation		Fertilisation		N foliaire		Marquage 15N sol		Marquage 15N foliaire	
	Contrôle	DPI4913	AF086	2 nœuds	DFE	2 nœuds + DFE	Floraison	Standard	Contrainte	Standard	Contrainte	Non	Oui	Non	Oui	Non	Oui
CHAMP	Carbone - 2015	X	X	X		X		X		X			X		X		X
	Mervilla 1 - 2016	X	X	X	X	X		X		X	X	X		X		X	
	Mervilla 2 - 2016	X	X	X	X	X		X		X	X	X		X		X	
	Rebigue 1 - 2017	X	X	X			X		X		X	X	X	X			X
	Rebigue 2 - 2017	X	X	X			X		X		X	X	X	X			X
	Saint-Sulpice - 2017	X	X		X	X	X		X		X		X		X		X
SERRE	Serre - 2016	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X	
	Serre - 2017	X	X	X		X		X		X		X		X		X	

N : nombre de répétitions par modalité, n : nombre de répétitions par biostimulant

Figure 19 : Facteurs étudiés et modalités de facteurs pour les différents essais menés en serre et au champ

Pour mener à bien ce travail, une analyse de variance multisite a été menée sur l'ensemble des essais au champ, afin de déterminer les effets de DPI4913 et AF086 sur le rendement en grains et en protéines du grain en conditions de fertilisation standard ou de contrainte azotée. Afin d'étudier plus finement l'effet de ces produits sur la croissance, pour différents stades d'application, le rendement en grains et la biomasse sèche des plantes ont été étudiés en serre, en condition d'irrigation ou de contrainte hydrique.

Les résultats obtenus ont permis de déterminer un stade d'application des biostimulants et des conditions de culture où DPI4913 et AF086 ont des effets positifs sur la dynamique de l'azote dans la plante. Nous nous sommes intéressés à la quantité d'azote dans la plante à maturité et à sa répartition entre l'épi, les tiges et les feuilles, et les racines. L'azote de la feuille drapeau d'une part et l'azote minéral du sol d'autre part ont été marqués au ¹⁵N de manière à suivre les flux d'azote liés à l'absorption d'azote foliaire et/ou racinaire, et à la remobilisation.

Des analyses protéomiques ont été réalisées sur les grains des plantes traitées dans les conditions optimales où l'application des biostimulants donnent les effets les plus marqués. La caractérisation des protéines du grain à maturité pour les plantes Contrôle ou les plantes

traitées par DPI4913 et AF086, suivie d'une analyse comparative globale, a notamment permis d'identifier certains types de protéines dont l'expression avait été amplifiée ou diminuée en réponse aux traitements biostimulants.

Nous rappellerons brièvement et de façon synthétique les résultats obtenus lors de mes travaux de thèse au sein de la Figure 20 et de la Figure 21. Des perspectives liées à ce travail de recherche seront ensuite présentées.

1. Conditions optimales d'application : augmentation du rendement en grains et de la croissance en conditions d'irrigation et de fertilisation standard pour une application au stade deux nœuds

L'étude multisite conduite sur l'ensemble des essais au champ montre qu'en conditions de contrainte azotée, DPI493 et AF086 n'ont pas d'effet sur le rendement en grains et en protéines, ni sur la teneur en protéines des grains. De la même manière pour l'essai en serre de 2016 en condition de contrainte hydrique, DPI4913 et AF086 n'ont pas affecté le rendement et la production de biomasse. Ces résultats contrastent avec l'idée selon laquelle les biostimulants, et notamment ceux à base d'extrait d'algue *Ascophyllum nodosum* comme c'est le cas pour DPI4913 ou de champignon *Trichoderma* comme c'est le cas pour AF086, amélioreraient la résistance des plantes aux stress abiotiques (Calvo et al., 2014; López-Bucio et al., 2015). Nous supposons que les effets des contraintes hydrique et azotée étaient tels qu'ils ont pu masquer les effets des biostimulants. De plus, les conditions dites "standard" de fertilisation ou d'irrigation pouvaient en fait correspondre à des conditions non optimales et présenter des contraintes ponctuelles difficiles à estimer. Notre compréhension des effets de DPI4913 et AF086 ne nous permet pas de définir un seuil de contrainte à partir duquel les biostimulants pourraient avoir un impact positif sur la production quantitative et qualitative du blé dur. En effet, dans leur revue sur les biostimulants, Brown and Saa (2015) expliquent que les réponses à l'application de biostimulants varient en fonction de nombreux facteurs comme les conditions environnementales.

En condition de fertilisation standard pour tous les essais au champ, l'application de DPI4913 a conduit à une augmentation du rendement en grains (+ 2.3 %) et du rendement en protéines (+ 2.4 %), tandis que l'application d'AF086 ne montre pas d'effet sur ces deux variables. Pour des raisons opérationnelles, tous les stades d'applications n'ont pas pu être

testés sur l'ensemble des essais au champ, si bien que nous ne pouvons déterminer le stade d'application optimal. En serre, en condition d'irrigation standard et principalement pour une application au stade deux nœuds, nous avons montré des effets positifs significatifs de DPI4913 et AF086 sur le rendement en grains (respectivement + 23.9 % et + 20.4 %), la biomasse sèche totale (respectivement + 19.7 % et + 19.3 %) et le rendement en protéines (respectivement + 24.8 % et + 25.9 %), sans modification de la teneur en protéines.

Les augmentations de rendement en grains et en protéines constatées en serre en conditions standards pour une application au stade deux nœuds sont i) 10 à 23 fois supérieures à celles constatées sur l'ensemble des essais au champ (conditions standards et tous stades d'applications confondus) et ii) 5 à 10 fois supérieures à celles constatées au champ en conditions standards et pour une application au stade deux nœuds (Figure 20). Ces écarts d'augmentation seraient donc dus en partie au fait que l'étude multisite menée sur les essais au champ regroupe plusieurs stades d'application des biostimulants et ne se limite pas au stade deux nœuds. Toutefois, une étude ciblée uniquement sur les essais au champ au stade deux nœuds ne permet pas de mettre en évidence d'effet significatif des biostimulants, le nombre de répétitions et la puissance de test étant trop faible. En conditions naturelles, les contraintes biotiques et abiotiques ont pu impacter l'effet des biostimulants de manière plus forte qu'en serre, et ceci même en conditions dites "standards". De manière générale, peu d'études sur les biostimulants ont été menées en conditions naturelles, et encore moins sur le blé. La variabilité liée aux conditions pédo-climatiques et aux contraintes biotiques et abiotiques limite la mise en évidence d'effets des biostimulants. D'ailleurs, dans son étude sur l'effet de quatre biostimulants sur la production de blé, Al Majathoub (2004) ne montre pas d'effets significatifs au champ mais précise tout de même que ceux-ci conduisent à une amélioration de la croissance et à une augmentation du rendement, puisque ces tendances sont constatées pour différents niveaux de fertilisation, de localisation et pour plusieurs années d'expérimentations.

Nous avons donc montré que pour une application au stade deux nœuds en conditions de fertilisation et d'irrigation standards, les deux biostimulants DPI4913 et AF086 ont un effet sur le rendement en grains et en protéines. Les effets des biostimulants sur la physiologie de la plante ont été peu étudiés (Bulgari et al., 2015). Nous avons donc cherché à comprendre comment les deux biostimulants de composition différente affectaient la production du blé

dur. La production du blé dépend en grande partie de sa capacité à valoriser les apports d'azote (Gaju et al., 2016). Nous nous sommes donc intéressés aux effets de DPI4913 et AF086 sur la dynamique de l'azote dans la plante et sa distribution au sein de la plante.

2. Augmentation de la quantité d'azote du sol prélevée et de son allocation vers les grains

Nous avons montré en serre une augmentation de la quantité d'azote prélevée dans la plante à maturité de 28.9 % pour DPI4913 et de 23.3 % pour AF086. L'augmentation de la quantité d'azote dans la plante montre une augmentation du prélèvement net d'azote par la plante sur le sol. Les biostimulants n'affectent pas la teneur en azote des grains mais le rendement en azote des grains (+ 24.8 % pour DPI4913, + 22.3 % pour AF086). En effet, les biostimulants augmentent de façon similaire le rendement en grains et le rendement en azote des grains. Cette amélioration de l'absorption de l'azote par la plante est à relier à l'augmentation de biomasse constatée suite à l'application des biostimulants. Elle pourrait être due à une meilleure exploration du sol par le système racinaire via des modifications d'architecture racinaire (Linkohr et al., 2002). Au niveau moléculaire, l'entrée d'azote dans la plante se fait via des transporteurs dont l'activité pourrait être modulée par l'application de biostimulants. En outre, les travaux de Durand et al. (2003) montrent les effets d'un biostimulant à base d'extrait d'algues sur l'activité de la nitrate réductase, enzyme impliquée dans l'assimilation de l'azote nitrique par la plante. Une meilleure assimilation de l'azote pouvant impacter l'absorption d'azote puisque le fonctionnement des systèmes d'absorption ou de transport du nitrate est modulé par la disponibilité du substrat azoté et par le statut nutritionnel de la plante (Morot-Gaudry et al., 2006).

Au-delà de la quantification de l'effet positif des biostimulants sur la quantité d'azote dans la plante, nous nous sommes également intéressés à leurs effets sur l'allocation de l'azote dans la plante. En serre, la proportion d'azote allouée à l'épi est augmentée de 12.3 % par DPI4913 et de 8.0 % par AF086. Ceci est soutenu par les résultats du marquage de l'azote du sol au champ ($^{15}\text{NH}_4^+$, $^{15}\text{NO}_3^-$) qui montrent une augmentation de l'azote marqué injecté dans le sol retrouvé dans l'épi par DPI4913 (+ 24.7 %) et par AF086 (+ 18.7 %), bien que non significatif. En serre, le marquage de l'azote interne de la feuille drapeau montre une augmentation du recyclage de cet azote de cette feuille vers l'épi par DPI4913 (+ 24.7 %) et par AF086 (+ 18.7 %). Les biostimulants augmentent donc l'absorption et la remobilisation

d'azote vers les grains. Dans leurs travaux sur l'absorption et la remobilisation d'azote vers les grains post-floraison, Kichey et al. (2007) montrent que les activités de la glutamine synthétase, et dans une moindre mesure de la nitrate réductase, sont corrélées à la quantité d'azote remobilisée vers le grain. Ces deux enzymes sont des enzymes clés du processus d'assimilation de l'azote par la plante. Nous émettons donc l'hypothèse que l'augmentation de l'allocation d'azote vers les grains par DPI4913 et AF086 pourrait être associée à des modifications d'activités des enzymes clés du processus d'assimilation de l'azote.

Plusieurs études ont montré que le contrôle génétique de la remobilisation serait en lien avec la régulation de la sénescence foliaire (Masclaux et al., 2001; Uauy et al., 2006). En effet, dans leurs travaux sur la compartimentation et la remobilisation de l'azote en lien avec la sénescence de la feuille drapeau, Gaju et al. (2014) ont mis en évidence l'existence d'une relation négative entre la quantité d'azote de la feuille drapeau remobilisée et la durée de la sénescence. Dans notre étude en serre, nous avons montré que DPI4913 et AF086 accélèrent la sénescence de la feuille drapeau. Ce résultat va dans le sens de l'augmentation de la remobilisation observée.

La quantité d'azote perdue par la feuille drapeau entre les stades DFE et maturité ne représente qu'environ 20 % de la quantité d'azote supplémentaire contenue dans les grains suite à l'application des biostimulants. Une augmentation de la remobilisation de la feuille drapeau vers le grain ne peut pas expliquer l'augmentation de la quantité d'azote dans les grains suite à l'application de biostimulants. Une augmentation du prélèvement net par les racines est donc responsable de l'augmentation de la quantité d'azote dans les grains. Les biostimulants augmentent très fortement le transfert et le turn-over de l'azote de la feuille drapeau vers le grain. Nous supposons donc que plus qu'un rôle de stockage, la feuille drapeau joue un rôle central dans le métabolisme azoté de la plante.

Nous nous sommes intéressés à l'impact de DPI4913 et AF086 sur la composition en protéines des grains. Il apparaît que l'augmentation de la quantité d'azote dans les grains est associée à une variation de la composition en protéines des grains (Ferrise et al., 2015).

3. Modification de la composition en protéines des grains

La teneur en protéines des grains de blé dur est liée à leur teneur en azote (Fujihara et al., 2008). Les biostimulants n'affectant pas la teneur en azote des grains, ils n'affectent pas

non plus leur teneur en protéines. En revanche, DPI4913 et AF086 ont un impact sur la composition en protéines des grains. Ainsi, sur un total de 1391 protéines identifiées par des analyses protéomiques, 26 sont exprimées différemment suite à l'application de DPI4913 et 38 de AF086, 14 protéines étant communes à DPI4913 et AF086. Les plus fortes variations d'expression de protéines concernent des protéines impliquées dans les propriétés technologiques comme la dureté du grain, dans les propriétés de stockage avec la surexpression de protéines du gluten comme la gamma-gliadine, dans les processus de régulation avec la surexpression de protéines impliquées dans la régulation de la transcription, ou dans la réponse aux stress avec la surexpression de protéines de défense aux stress biotiques et abiotiques.

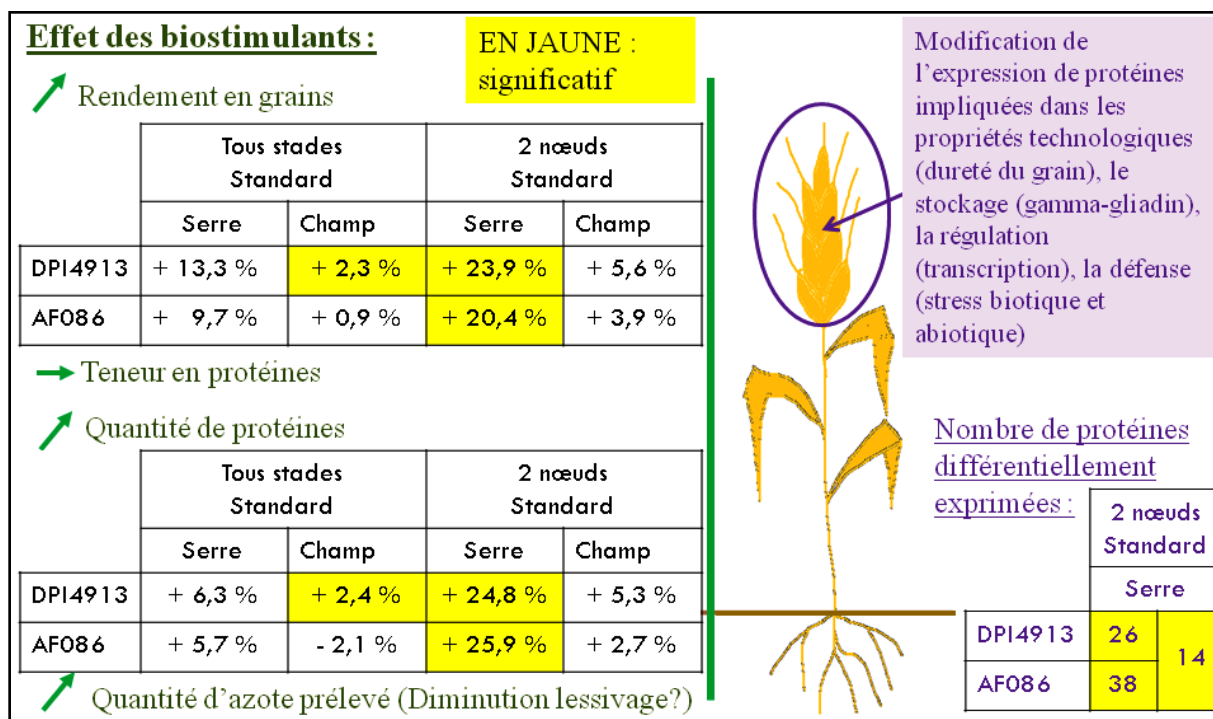


Figure 20 : Schéma récapitulatif des effets des biostimulants DPI4913 et AF086 sur la croissance, l'absorption d'azote et le contenu protéique des grains, en conditions d'irrigation et de fertilisation standards

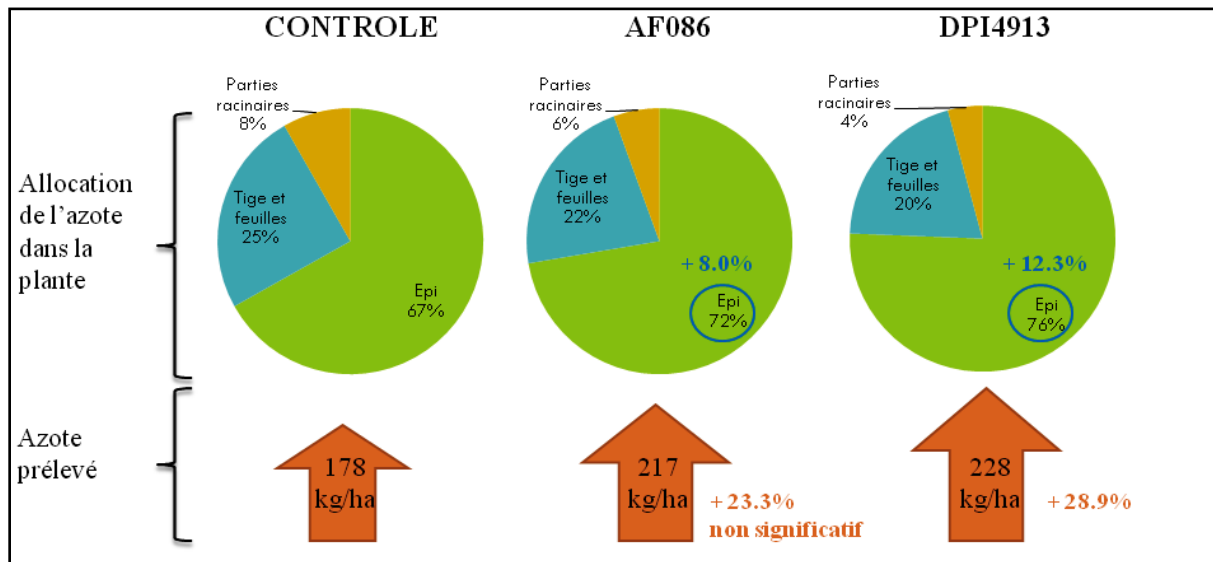


Figure 21 : Schéma récapitulatif des effets des biostimulants DPI4913 et AF086 sur le prélèvement d'azote et son allocation au sein de la plante entre différents compartiments (Epi, Tige et feuilles, Parties racinaires)

Chapitre VII

Perspectives

CHAPITRE VII : *Perspectives*

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de cette thèse nous ont permis de sélectionner des conditions d'application de DPI4913 et AF086 qui impactent le plus positivement la production de blé dur : application foliaire au stade deux nœuds en conditions de fertilisation et d'irrigation non limitantes, aux doses prescrites par l'entreprise Agronutrition. Dans ces conditions, les biostimulants améliorent le plus le rendement en grains et en protéines dans les grains au champ, et la biomasse et le rendement en grains en serre. Nous avons ensuite abordé les effets des biostimulants sur le prélèvement d'azote minéral du sol par les racines et le prélèvement d'azote par les feuilles, sur l'allocation de l'azote au sein de la plante et sur la remobilisation de l'azote vers le grain. Nous avons également étudié l'impact de DPI4913 et AF086 sur la composition protéique du grain. L'approche agronomique et physiologique large que nous avons utilisée ouvre d'autres pistes de recherche. De nombreuses perspectives peuvent être envisagées, tant sur le plan appliqué avec l'utilisation de ces produits en agriculture, que sur un plan fondamental avec la caractérisation des mécanismes mis en jeu au niveau physiologique et moléculaire.

Sur le plan appliqué

- Si le caractère biostimulant de ces produits a été mis en évidence en serre, la caractérisation de leur effet au champ nécessite d'augmenter la puissance statistique en combinant plusieurs essais au champ. La poursuite d'une analyse multisite pourrait être envisagée, en prenant en compte uniquement les conditions optimales identifiées dans le cadre de ma thèse, et ce afin de déterminer le gain de rendement réellement attendu pour l'agriculteur.

- La modification de la composition en protéines du grain observée, notamment des protéines du gluten, incite à étudier l'effet de AF086 et DPI4913 sur les propriétés technologiques des semoules. De telles analyses, couplées aux analyses protéomiques, avaient d'ailleurs été envisagées en partenariat avec l'école des Mines d'Albi lors du montage du projet INNOPERF-BLE. Elles n'ont pas pu être réalisées en raison de la taille des échantillons. En effet, les analyses protéomiques ont pu être réalisées sur des échantillons de faible taille provenant de l'essai en serre pour lequel les effets des biostimulants étaient les plus marqués.

La distribution granulométrique des semoules ainsi que leurs propriétés rhéologiques et d'hydratation pourraient être étudiées sur des échantillons provenant d'essais au champ réalisés dans les conditions optimales d'application des biostimulants déterminées dans ce travail de thèse.

- Il serait pertinent d'étudier l'application des biostimulants à d'autres cultures afin d'étudier plus largement leur action biostimulante.

Sur le plan fondamental, il serait nécessaire de :

- Caractériser comment les biostimulants stimulent l'absorption d'azote minéral du sol. Pour cela, des marquages isotopiques ^{15}N au niveau du sol ont été effectués dans un essai en serre mené en 2018. Cet essai a été mené au cours de la dernière année de thèse, en parallèle à la rédaction. Je réaliserai ces analyses à l'automne 2018 et valoriserai les résultats dans le cadre du projet INNOPERF-BLE. Aussi, je prévois l'analyse des résultats d'une expérience où l'absorption de NO_3^- et NH_4^+ (influx et efflux) a été mesurée en chambre de culture sur des plantes juvéniles. Les racines des plants de blé intacts avaient été exposées à une solution de $^{15}\text{NO}_3^-$ ou de $^{15}\text{NH}_4^+$ (teneur isotopique de 99 %) à différentes concentrations. Après un temps de marquage court pour les mesures d'influx et un marquage plus long pour les mesures de flux net, les parties racinaires et les parties aériennes des plantes avaient été pesées, séchées et broyées pour détermination de la vitesse d'absorption du $^{15}\text{NO}_3^-$ ou du $^{15}\text{NH}_4^+$.

- Approfondir l'étude de l'impact des biostimulants sur l'absorption et la valorisation d'une application d'engrais azoté foliaire. Les résultats de l'apport foliaire de 15 urée au champ en 2017 ont montré un effet de AF086 sur la distribution d'azote au sein de l'épi, en favorisant le flux d'azote vers les grains. Une tendance similaire, non significative, a été observée pour DPI4913. Il conviendrait de compléter cette étude en conditions contrôlées afin de se dédouaner de la forte variabilité inhérente aux conditions naturelles. Dans cette optique, des apports foliaires de 15 urée ont été effectués dans l'essai en serre de 2018.

- Etudier l'impact des biostimulants sur l'assimilation de l'azote par la plante. La quantification des activités enzymatiques clés du métabolisme azoté pourrait être envisagée. En effet, l'assimilation de l'azote par la plante se fait en plusieurs étapes dépendantes de l'actions d'enzymes : la Nitrate Réductase (NR) catalysant la réduction du NO_3^- en NO_2^- , la Nitrite Réductase (NiR) catalysant la réduction du NO_2^- en NH_3 , ainsi que la glutamine-synthétase

(GS) et la glutamate synthase (GOGAT) catalysant l'incorporation de NH_3 à un squelette carboné pour former les acides aminés glutamine (Gln) et glutamate (Glu), précurseurs d'autres acides aminés et de protéines.

- Approfondir l'étude des effets des biostimulants sur la croissance en réalisant des mesures de l'activité photosynthétique. La croissance est en lien direct avec les métabolismes azoté et carboné, qui sont étroitement connectés. L'absorption et l'assimilation d'azote nécessitent de l'énergie et des squelettes carbonés fournis par le métabolisme carboné. Des mesures de photosynthèse (assimilation nette de CO_2), de conductance stomatique et de transpiration ont été réalisées en serre en 2018. Les résultats devraient permettre la publication d'un nouvel article scientifique.

Références bibliographiques

- Al Majathoub, M. (2004). Effect of biostimulants on production of wheat (*Triticum aestivum* L.). in *Options méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens* (Zaragoza, CIHEAM: Cantero-Martinez C., Gabiña D.), 147–150.
- Alam, M. Z., Braun, G., Norrie, J., and Mark Hodges, D. (2013). Ascophyllum extract application can promote plant growth and root yield in carrot associated with increased root-zone soil microbial activity. *Can. J. Plant Sci.* 94, 337–348. doi:10.4141/cjps2013-135.
- Altenbach, S. B., DuPont, F. M., Kothari, K. M., Chan, R., Johnson, E. L., and Lieu, D. (2003). Temperature, Water and Fertilizer Influence the Timing of Key Events During Grain Development in a US Spring Wheat. *J. Cereal Sci.* 37, 9–20. doi:10.1006/jcrs.2002.0483.
- Altenbach, S. B., Kothari, K. M., Tanaka, C. K., and Hurkman, W. J. (2007). Genes encoding the PR-4 protein wheatwin are developmentally regulated in wheat grains and respond to high temperatures during grainfill. *Plant Sci.* 173, 135–143. doi:10.1016/j.plantsci.2007.04.007.
- Altenbach, S. B., Tanaka, C. K., Hurkman, W. J., Whitehand, L. C., Vensel, W. H., and Dupont, F. M. (2011a). Differential effects of a post-anthesis fertilizer regimen on the wheat flour proteome determined by quantitative 2-DE. *Proteome Sci.* 9, 46. doi:10.1186/1477-5956-9-46.
- Altenbach, S. B., Vensel, W. H., and Dupont, F. M. (2011b). The spectrum of low molecular weight alpha-amylase/protease inhibitor genes expressed in the US bread wheat cultivar Butte 86. *BMC Res. Notes* 4, 242. doi:10.1186/1756-0500-4-242.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., and Rosato, A. (2006). Zinc through the three domains of life. *J. Proteome Res.* 5, 3173–3178. doi:10.1021/pr0603699.
- Araus, J. L., Bort, J., Brown, R. H., Bassett, C. L., and Cortadellas, N. (1993). Immunocytochemical localization of phosphoenolpyruvate carboxylase and photosynthetic gas-exchange characteristics in ears of *Triticum durum* Desf. *Planta* 191, 507–514. doi:10.1007/BF00195752.
- Arena, S., D’Ambrosio, C., Vitale, M., Mazzeo, F., Mamone, G., Di Stasio, L., et al. (2017). Differential representation of albumins and globulins during grain development in durum wheat and its possible functional consequences. *J. Proteomics* 162, 86–98. doi:10.1016/j.jprot.2017.05.004.
- Arvalis Institut du végétal (2013a). Gérer la fertilisation azotée des céréales à pailles - Région Midi-Pyrénées, Aude.
- Arvalis Institut du végétal (2013b). Teneur en protéines des blés : relever le double défi agronomique et économique.

- Arvalis Institut du végétal (2014). Fractionner la dose d'azote apportée sur blé tendre. Available at: <https://www.arvalis-infos.fr/fertilisation-du-ble-tendre-optimiser-l-alimentation-de-la-plante-en-fracionnant-l-azote-@/view-14759-arvarticle.html> [Accessed May 17, 2018].
- Arvalis Institut du végétal (2018a). Les Fiches Variétés. *Fiches Accid.* - ARVALIS-Infosfr. Available at: <http://www.fiches.arvalis-infos.fr> [Accessed August 30, 2018].
- Arvalis Institut du végétal (2018b). Prévoir l'apport d'azote à épi 1 cm du blé dur en 2018 en Occitanie. Available at: <https://www.arvalis-infos.fr/fertilisation-du-ble-dur-preparer-les-prochains-apports-d-azote-@/view-26685-arvarticle.html> [Accessed July 9, 2018].
- Asensi-Fabado, M.-A., Amtmann, A., and Perrella, G. (2017). Plant responses to abiotic stress: The chromatin context of transcriptional regulation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1860, 106–122. doi:10.1016/j.bbagr.2016.07.015.
- Asli, S., and M. Neumann, P. (2010). Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development. *Plant Soil* 336, 313–322. doi:10.1007/s11104-010-0483-2.
- Atanasova, L., Crom, S. L., Gruber, S., Couplier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C. P., et al. (2013). Comparative transcriptomics reveals different strategies of Trichodermamycoparasitism. *BMC Genomics* 14, 121. doi:10.1186/1471-2164-14-121.
- Baethgen, W. E., and Alley, M. M. (1989). Optimizing Soil and Fertilizer Nitrogen Use by Intensively Managed Winter Wheat. I. Crop Nitrogen Uptake. *Agron. J.* 81, 116–120. doi:10.2134/agronj1989.00021962008100010021x.
- Baker, D. A., Young, D. L., Huggins, D. R., and Pan, W. L. (2004). Economically Optimal Nitrogen Fertilization for Yield and Protein in Hard Red Spring Wheat. *Agron. J.* 96, 116–123. doi:10.2134/agronj2004.1160.
- Barak, S., Mudgil, D., and Khatkar, B. S. (2015). Biochemical and functional properties of wheat gliadins: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55, 357–368. doi:10.1080/10408398.2012.654863.
- Barro, F., Rooke, L., Békés, F., Gras, P., Tatham, A. S., Fido, R., et al. (1997). Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. *Nat. Biotechnol.* 15, 1295–1299. doi:10.1038/nbt1197-1295.
- Behie, S. W., and Bidochka, M. J. (2014). Nutrient transfer in plant–fungal symbioses. *Trends Plant Sci.* 19, 734–740. doi:10.1016/j.tplants.2014.06.007.
- Bertheloot, J. (2009). *Distribution de l'azote chez le blé (Triticum aestivum L.) après la floraison : un modèle dynamique fondé sur une approche structure-fonction*. Paris, AgroParisTech Available at: <http://www.theses.fr/2009AGPT0007> [Accessed June 26, 2017].

- Billard, V., Etienne, P., Jannin, L., Garnica, M., Cruz, F., Garcia-Mina, J.-M., et al. (2014). Two Biostimulants Derived from Algae or Humic Acid Induce Similar Responses in the Mineral Content and Gene Expression of Winter Oilseed Rape. *J. Plant Growth Regul.* 33, 305–316. doi:10.1007/s00344-013-9372-2.
- Biostimulant Market (2017). Biostimulants Market by Active Ingredient, Application Method, Crop Type, Formulation, Region - 2022 | MarketsandMarkets. Available at: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biostimulant-market-1081.html> [Accessed June 5, 2018].
- Bly, A. G., and Woodard, H. J. (2003). Foliar Nitrogen Application Timing Influence on Grain Yield and Protein Concentration of Hard Red Winter and Spring Wheat. *Agron. J.* 95, 335–338. doi:10.2134/agronj2003.3350.
- Bonnot, T., Bancel, E., Alvarez, D., Davanture, M., Boudet, J., Pailloux, M., et al. (2017). Grain subproteome responses to nitrogen and sulfur supply in diploid wheat *Triticum monococcum* ssp. *monococcum*. *Plant J.* 91, 894–910. doi:10.1111/tpj.13615.
- Boston, R. S., Viitanen, P. V., and Vierling, E. (1996). Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* 32, 191–222. doi:10.1007/BF00039383.
- Bousquet, N. (2018). Du blé dur aux pâtes : une histoire très récente en France. *Arvalis Info*. Available at: <https://www.arvalis-infos.fr/du-ble-dur-aux-p-tes-une-histoire-tres-recente-en-france-@/view-26765-arvarticle.html>.
- Brinton, J., Simmonds, J., and Uauy, C. (2017). Ubiquitin-related genes are differentially expressed in isogenic lines contrasting for pericarp cell size and grain weight in hexaploid wheat. *bioRxiv*, 175471. doi:10.1101/175471.
- Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A., and Chet, I. (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol.* 147, 779–789. doi:10.1104/pp.108.116293.
- Brown, P., and Saa, S. (2015). Biostimulants in agriculture. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00671.
- Bulgari, R., Cocetta, G., Trivellini, A., Vernieri, P., and Ferrante, A. (2015). Biostimulants and crop responses: A review. *ResearchGate* 31, 1–17. doi:10.1080/01448765.2014.964649.
- Bulleid, N. J., and Freedman, R. B. (1988). Defective co-translational formation of disulphide bonds in protein disulphide-isomerase-deficient microsomes. *Nature* 335, 649–651. doi:10.1038/335649a0.
- Bushuk, W. (1997). “Wheat breeding for end-product use,” in *Wheat: Prospects for Global Improvement* Developments in Plant Breeding. (Springer, Dordrecht), 203–211. doi:10.1007/978-94-011-4896-2_27.

- Cakmak, I., Pfeiffer, W. H., and McClafferty, B. (2010). REVIEW: Biofortification of Durum Wheat with Zinc and Iron. *Cereal Chem. J.* 87, 10–20. doi:10.1094/CCHEM-87-1-0010.
- Calvo, P., Nelson, L., and Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* 383, 3–41.
- Campbell, S. A., and Close, T. J. (1997). Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytol.* 137, 61–74. doi:10.1046/j.1469-8137.1997.00831.x.
- Capocchi, A., Cinollo, M., Galleschi, L., Saviozzi, F., Calucci, L., Pinzino, C., et al. (2000). Degradation of gluten by proteases from dry and germinating wheat (*Triticum durum*) seeds: An in vitro approach to storage protein mobilization. *J. Agric. Food Chem.* 48, 6271–6279.
- Carel, Y. (2017). Le blé dur français a des places à prendre. *Perspect. Agric.*, 40–41.
- Caruso, C., Chilosi, G., Leonardi, L., Bertini, L., Magro, P., Buonocore, V., et al. (2001). A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. *Phytochemistry* 58, 743–750. doi:10.1016/S0031-9422(01)00226-6.
- Cassan, L. [b1] (analytic), Jeannin, I. [b2] (analytic), Lamaze, T. [b1] (analytic), and Morot-Gaudry, J.-F. [b1] (analytic) (1992). The effect of the *Ascophyllum nodosum* extract Goëmar GBA 14 on the growth of Spinach (English). *Bot Mar* 35, 437–439.
- Chaillou, S. (2015). Nutrition azotée de la plante. Available at: https://tice.agroparistech.fr/coursenligne/courses/MENTIONBIPBIOLOGIEIN/document/TRONC_COMMUN_MENTION/EN3586_Biodiversite_et_Physiologie/cours_Master_Vegetal_2015.pdf?cidReq=MENTIONBIPBIOLOGIEIN.
- Chaillou, S., and Lamaze, T. (2001). “Amoniacal Nutrition of Plants,” in *Nitrogen assimilation by plants - Physiological, Biochemical and Molecular Aspects* (INRA, Jean-François Morot-Gaudry).
- Chaoying Ma, Jianwen Zhou, Guanxing Chen, Yanwei Bian, Dongwen Lv, Xiaohui Li, et al. (2014). iTRAQ-based quantitative proteome and phosphoprotein characterization reveals the central metabolism changes involved in wheat grain development. *BMC Genomics* 15, 1–38. doi:10.1186/1471-2164-15-1029.
- Colla, G., Cardarelli, M., Bonini, P., and Rouphael, Y. (2017a). Foliar Applications of Protein Hydrolysate, Plant and Seaweed Extracts Increase Yield but Differentially Modulate Fruit Quality of Greenhouse Tomato. *HortScience* 52, 1214–1220. doi:10.21273/HORTSCI12200-17.
- Colla, G., Hoagland, L., Ruzzi, M., Cardarelli, M., Bonini, P., Canaguier, R., et al. (2017b). Biostimulant Action of Protein Hydrolysates: Unraveling Their Effects on Plant Physiology and Microbiome. *Front. Plant Sci.* 8. doi:10.3389/fpls.2017.02202.

- Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., et al. (2015a). Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196, 28–38. doi:10.1016/j.scienta.2015.08.037.
- Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., et al. (2015b). Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196, 28–38. doi:10.1016/j.scienta.2015.08.037.
- Colla, G., Rouphael, Y., Bonini, P., and Cardarelli, M. (2015c). Coating seeds with endophytic fungi enhances growth, nutrient uptake, yield and grain quality of winter wheat. 171–189.
- Colla, G., Rouphael, Y., Cardarelli, M., Svecova, E., Rea, E., and Planques, B. (2012). L'efficacité d'un engrais à base d'acides amines végétaux pour améliorer les performances des cultures. in.
- Colla, G., Rouphael, Y., Di Mattia, E., El-Nakhel, C., and Cardarelli, M. (2015d). Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. *J. Sci. Food Agric.* 95, 1706–1715. doi:10.1002/jsfa.6875.
- Contreras-Cornejo, H. A., López-Bucio, J. S., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ramos-Vega, M., Guevara-García, Á. A., et al. (2015). Mitogen-Activated Protein Kinase 6 and Ethylene and Auxin Signaling Pathways Are Involved in Arabidopsis Root-System Architecture Alterations by *Trichoderma atroviride*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 28, 701–710. doi:10.1094/MPMI-01-15-0005-R.
- Correia, S., Oliveira, I., Queirós, F., Ribeiro, C., Ferreira, L., Luzio, A., et al. (2015). Preharvest Application of Seaweed Based Biostimulant Reduced Cherry (*Prunus Avium* L.) Cracking. *Procedia Environ. Sci.* 29, 251–252. doi:10.1016/j.proenv.2015.07.187.
- Costa, M. S., Scholz, M. B. dos S., and Franco, C. M. L. (2013). Effect of high and low molecular weight glutenin subunits, and subunits of gliadin on physicochemical parameters of different wheat genotypes. *Food Sci. Technol.* 33, 163–170. doi:10.1590/S0101-20612013000500024.
- Craigie, J., Mackinnon, S., and A. Walter, J. (2008). Liquid seaweed extracts identified using ¹H NMR profiles. *J. Appl. Phycol. - J APPL PHYCOL* 20, 665–671. doi:10.1007/s10811-007-9232-1.
- Craigie, J. S. (2011a). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *J. Appl. Phycol.* 23, 371–393. doi:10.1007/s10811-010-9560-4.
- Craigie, J. S. (2011b). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *J. Appl. Phycol.* 23, 371.
- Crouch, I. J., Beckett, R. P., and Staden, J. van (1990). Effect of seaweed concentrate on the growth and mineral nutrition of nutrient-stressed lettuce. *J. Appl. Phycol.* 2, 269–272. doi:10.1007/BF02179784.

- Crouch, I. J., and Staden, J. V. (1992). Effect of seaweed concentrate on the establishment and yield of greenhouse tomato plants. *J. Appl. Phycol.* 4, 291–296. doi:10.1007/BF02185785.
- Daaloul Bouacha, O., Rhazi, L., Aussenac, T., Rezgui, S., and Nouaigui, S. (2015). Molecular characterization of storage proteins for selected durum wheat varieties grown in different environments. *J. Cereal Sci.* 61, 97–104. doi:10.1016/j.jcs.2014.09.005.
- Daniel, C., and Triboi, E. (2000). Effects of Temperature and Nitrogen Nutrition on the Grain Composition of Winter Wheat: Effects on Gliadin Content and Composition. *J. Cereal Sci.* 32, 45–56. doi:10.1006/jcers.2000.0313.
- Darabi, M., and Seddigh, S. (2015). Bioinformatic characterization of aspartic protease (AP) enzyme in seed plants. *Plant Syst. Evol.* 301, 2399–2417. doi:10.1007/s00606-015-1236-8.
- Davies, D. R. (1990). The Structure and Function of the Aspartic Proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19, 189–215. doi:10.1146/annurev.bb.19.060190.001201.
- Delogu, G., Cattivelli, L., Pecchioni, N., De Falcis, D., Maggiore, T., and Stanca, A. M. (1998). Uptake and agronomic efficiency of nitrogen in winter barley and winter wheat. *Eur. J. Agron.* 9, 11–20. doi:10.1016/S1161-0301(98)00019-7.
- Deswarte, J.-C. (2017). Comment s'élabore le rendement des céréales à paille? *Arvalis Info.* Available at: <https://www.arvalis-infos.fr/comment-s-elabore-le-rendement--@/view-16191-arvarticle.html> [Accessed May 16, 2018].
- Djonović, S., Pozo, M. J., Dangott, L. J., Howell, C. R., and Kenerley, C. M. (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 19, 838–853. doi:10.1094/MPMI-19-0838.
- Djonovic, S., Vargas, W. A., Kolomiets, M. V., Horndeski, M., Wiest, A., and Kenerley, C. M. (2007). A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiol.* 145, 875–889. doi:10.1104/pp.107.103689.
- Donovan, G. R., and Lee, J. W. (1978). Effect of Nitrogen Source on Grain Development in Detached Wheat Heads in Liquid Culture. *Funct. Plant Biol.* 5, 81–87. doi:10.1071/pp9780081.
- Du Cheyron, P., Lesouder, C., and Lorgeou, J. (2014). Obtenir un taux de protéines élevé des grains à la récolte. Available at: <https://www.arvalis-infos.fr/proteines-tenir-compte-de-l-effet-variete-@/view-16063-arvarticle.html> [Accessed April 19, 2018].
- du Jardin, P. (2012). The Science of Plant Biostimulants – A bibliographic analysis, Ad hoc study report. European Commission Available at: <https://orbi.uliege.be/handle/2268/169257> [Accessed May 25, 2018].

- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* 196, 3–14. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.021.
- Dupont, F. M., and Altenbach, S. B. (2003). Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *J. Cereal Sci.* 38, 133–146. doi:10.1016/S0733-5210(03)00030-4.
- Durand, N., Briand, X., and Meyer, C. (2003). The effect of marine bioactive substances (N PRO) and exogenous cytokinins on nitrate reductase activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 119, 489–493. doi:10.1046/j.1399-3054.2003.00207.x.
- EBIC (2013). European Biostimulants Industry Council | Promoting the biostimulant industry and the role of plant biostimulants in making agriculture more sustainable. Available at: <http://www.biostimulants.eu/> [Accessed May 25, 2018].
- El-Boray, M., Mostafa, M., Salem, E., and El - Sawwah, O. A. O. (2015). Improving yield and fruit quality of washington navel orange using foliar applications of some natural biostimulants. *J Plant Prod. Mansoura Univ* 6, 1317–1332.
- Ertani, A., Cavani, L., Pizzeghello, D., Brandellero, E., Altissimo, A., Ciavatta, C., et al. (2009). Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172, 237–244. doi:10.1002/jpln.200800174.
- Ertani, A., Pizzeghello, D., Francioso, O., Sambo, P., Sanchez-Cortes, S., and Nardi, S. (2014). *Capsicum chinensis* L. growth and nutraceutical properties are enhanced by biostimulants in a long-term period: chemical and metabolomic approaches. *Front. Plant Sci.* 5, 375. doi:10.3389/fpls.2014.00375.
- European Biostimulants Industry Council (2012). EBIC and biostimulants in brief. Available at: <http://www.biostimulants.eu/> [Accessed October 23, 2017].
- Faessel, L., Gomy, C., Nassr, N., Tostivint, C., Hipper, C., and Dechanteloup, A. (2014). *Produits de stimulation en agriculture visant à améliorer les fonctionnalités biologiques des sols et des plantes - Etude des connaissances disponibles et recommandations stratégiques*. Étude commanditée par le Centre d'Études et de Prospective du Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (MAAF) et financée par le MAAF dans le cadre du programme 215 (Marché n° SSP-2013-094).
- Fageria, N. K., Filho, M. P. B., Moreira, A., and Guimarães, C. M. (2009). Foliar Fertilization of Crop Plants. *J. Plant Nutr.* 32, 1044–1064. doi:10.1080/01904160902872826.
- Ferrise, R., Bindi, M., and Martre, P. (2015). Grain filling duration and glutenin polymerization under variable nitrogen supply and environmental conditions for durum wheat. *Field Crops Res.* 171, 23–31. doi:10.1016/j.fcr.2014.10.016.
- Flagella, Z., Giuliani, M. M., Giuzio, L., Volpi, C., and Masci, S. (2010). Influence of water deficit on durum wheat storage protein composition and technological quality. *Eur. J. Agron.* 33, 197–207. doi:10.1016/j.eja.2010.05.006.

- Forget, F., Charmet, G., Bonny, S., Abécassis, J., Fardet, A., and Lullien-Pellerin, V. (2017). in *Agriculture et alimentation durables: Trois enjeux dans la filière céréales* (Quae), 35.
- FranceAgriMer (2018a). Bilan de marché - Blé dur. *FranceAgriMer*. Available at: http://www.franceagrimer.fr/content/download/54925/531200/file/Bilans1718_FR180_110_ENVOI.pdf [Accessed February 9, 2018].
- FranceAgriMer (2018b). “Marché du blé dur - Récolte 2017,” in *Les Etudes de FranceAgriMer - Céréales* (FranceAgriMer).
- Frioni, T., Sabbatini, P., Tombesi, S., Norrie, J., Poni, S., Gatti, M., et al. (2018). Effects of a biostimulant derived from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* on ripening dynamics and fruit quality of grapevines. *Sci. Hortic.* 232, 97–106. doi:10.1016/j.scienta.2017.12.054.
- Fujihara, S., Sasaki, H., Aoyagi, Y., and Sugahara, T. (2008). Nitrogen-to-protein conversion factors for some cereal products in Japan. *J. Food Sci.* 73, C204-209. doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00665.x.
- Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., and Bak, S. (2013). Plant Defense against Insect Herbivores. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 10242–10297. doi:10.3390/ijms140510242.
- Gaju, O., Allard, V., Martre, P., Le Gouis, J., Moreau, D., Bogard, M., et al. (2014). Nitrogen partitioning and remobilization in relation to leaf senescence, grain yield and grain nitrogen concentration in wheat cultivars. *Field Crops Res.* 155, 213–223. doi:10.1016/j.fcr.2013.09.003.
- Gaju, O., DeSilva, J., Carvalho, P., Hawkesford, M. J., Griffiths, S., Greenland, A., et al. (2016). Leaf photosynthesis and associations with grain yield, biomass and nitrogen-use efficiency in landraces, synthetic-derived lines and cultivars in wheat. *Field Crops Res.* 193, 1–15. doi:10.1016/j.fcr.2016.04.018.
- Gallais, A., Coque, M., Quilléré, I., Prioul, J.-L., and Hirel, B. (2006). Modelling postsilking nitrogen fluxes in maize (*Zea mays*) using ¹⁵N-labelling field experiments. *New Phytol.* 172, 696–707. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01890.x.
- García-Martínez, A. M., Díaz, A., Tejada, M., Bautista, J., Rodríguez, B., Santa María, C., et al. (2010). Enzymatic production of an organic soil biostimulant from wheat-condensed distiller solubles: effects on soil biochemistry and biodiversity. *Process Biochem.* 45, 1127–1133. Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103253594> [Accessed June 4, 2018].
- Gate, P. (1995). “Elaboration de la teneur en protéines du grain et influence de la nutrition azotée,” in *Ecophysiologie du blé* (Tec & Doc Lavoisier), 301–308.
- Ge, X., Dietrich, C., Matsuno, M., Li, G., Berg, H., and Xia, Y. (2005). An Arabidopsis aspartic protease functions as an anti-cell-death component in reproduction and embryogenesis. *EMBO Rep.* 6, 282–288. doi:10.1038/sj.embor.7400357.

- Giuliani, M. M., Palermo, C., De Santis, M. A., Mentana, A., Pompa, M., Giuzio, L., et al. (2015). Differential Expression of Durum Wheat Gluten Proteome under Water Stress during Grain Filling. *J. Agric. Food Chem.* 63, 6501–6512. doi:10.1021/acs.jafc.5b01635.
- González, M.-C., Osuna, L., Echevarría, C., Vidal, J., and Cejudo, F. J. (1998). Expression and Localization of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Developing and Germinating Wheat Grains. *Plant Physiol.* 116, 1249–1258. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC35031/> [Accessed January 17, 2018].
- Gooding, M. J., and Davies, W. P. (1992). Foliar urea fertilization of cereals: A review. *Fertil. Res.* 32, 209–222. doi:10.1007/BF01048783.
- Gregersen, P. L., Holm, P. B., and Krupinska, K. (2008). Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biol.* 10, 37–49. doi:10.1111/j.1438-8677.2008.00114.x.
- Grignon, C., Thibaud, J., and Lamaze, T. (2001). “Transport of nitrate by roots,” in *Nitrogen assimilation by plants - Physiological, Biochemical and Molecular Aspects* (INRA, Jean-François Morot-Gaudry).
- Grover, A., Kapoor, A., Lakshmi, O. S., Agarwal, S., Sahi, C., Katiyar-Agarwal, S., et al. (2001). Understanding molecular alphabets of the plant abiotic stress responses. *Curr. Sci.* 80, 206–216. Available at: <http://www.jstor.org/stable/24104280> [Accessed April 11, 2018].
- Guevara, M. G., Veríssimo, P., Pires, E., Faro, C., and Daleo, G. R. (2004). Potato aspartic proteases: induction, antimicrobial activity and substrate specificity. *J. Plant Pathol.* 86, 233–238. doi:10.4454/jpp.v86i3.993.
- Halpern, M., Bar-Tal, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T., and Yermiyahu, U. (2015). “Chapter Two - The Use of Biostimulants for Enhancing Nutrient Uptake,” in *Advances in Agronomy*, ed. D. L. Sparks (Academic Press), 141–174. doi:10.1016/bs.agron.2014.10.001.
- Hammad, S. A. R., and Ali, O. A. M. (2014). Physiological and biochemical studies on drought tolerance of wheat plants by application of amino acids and yeast extract. *Ann. Agric. Sci.* 59, 133–145. doi:10.1016/j.aosas.2014.06.018.
- Harman, G. E. (2000). Myths and Dogmas of Biocontrol Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzinum* T-22. *Plant Dis.* 84, 377–393. doi:10.1094/PDIS.2000.84.4.377.
- Harper, L. A., Sharpe, R. R., Langdale, G. W., and Giddens, J. E. (1987). Nitrogen Cycling in a Wheat Crop: Soil, Plant, and Aerial Nitrogen Transport 1. *Agron. J.* 79, 965–973. doi:10.2134/agronj1987.00021962007900060004x.
- Harrak, H., Azelmat, S., Baker, E. N., and Tabaeizadeh, Z. (2001). Isolation and characterization of a gene encoding a drought-induced cysteine protease in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Genome* 44, 368–374.

- Heinze, K., Kiszonas, A. M., Murray, J. C., Morris, C. F., and Lullien-Pellerin, V. (2016). Puroindoline genes introduced into durum wheat reduce milling energy and change milling behavior similar to soft common wheats. *J. Cereal Sci.* 71, 183–189. doi:10.1016/j.jcs.2016.08.016.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., and Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158, 17–25. doi:10.1099/mic.0.052274-0.
- Hernández-Herrera, R. M., Santacruz-Ruvalcaba, F., Ruiz-López, M. A., Norrie, J., and Hernández-Carmona, G. (2014). Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (<Emphasis Type="Italic">*Solanum lycopersicum*</Emphasis> L.). *J. Appl. Phycol.* 26, 619–628. doi:10.1007/s10811-013-0078-4.
- Huda, K. M. K., Banu, M. S. A., Tuteja, R., and Tuteja, N. (2013). Global calcium transducer P-type Ca²⁺-ATPases open new avenues for agriculture by regulating stress signalling. *J. Exp. Bot.* 64, 3099–3109. doi:10.1093/jxb/ert182.
- Hurkman, W. J., DuPont, F. M., Altenbach, S. B., Combs, A., Chan, R., Tanaka, C. K., et al. (1998). BiP, HSP70, NDK and PDI in wheat endosperm. II. Effects of high temperature on protein and mRNA accumulation. *Physiol. Plant.* 103, 80–90. doi:10.1034/j.1399-3054.1998.1030110.x.
- Jaklitsch, W. M. (2011). European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. *Fungal Divers.* 48, 1–250. doi:10.1007/s13225-011-0088-y.
- Jannin, L. (2012). Caractérisation des modifications physiologiques et métaboliques induites chez *Brassica napus* L. par l'apport d'extraits algaux ou d'acides humiques.
- Jannin, L., Arkoun, M., Etienne, P., Laîné, P., Goux, D., Garnica, M., et al. (2013). *Brassica napus* Growth is Promoted by *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. Seaweed Extract: Microarray Analysis and Physiological Characterization of N, C, and S Metabolisms. *J. Plant Growth Regul.* 32, 31–52. doi:10.1007/s00344-012-9273-9.
- Kauffman, G. L., Kneivel, D. P., and Watschke, T. L. (2007). Effects of a Biostimulant on the Heat Tolerance Associated with Photosynthetic Capacity, Membrane Thermostability, and Polyphenol Production of Perennial Ryegrass. *Crop Sci.* 47, 261–267. doi:10.2135/cropsci2006.03.0171.
- Kent, N. L. (1994). *Kent's Technology of Cereals: An Introduction for Students of Food Science and Agriculture*. Elsevier.
- Khan, W., Hiltz, D., Critchley, A. T., and Prithiviraj, B. (2011). Bioassay to detect *Ascophyllum nodosum* extract-induced cytokinin-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *J. Appl. Phycol.* 23, 409–414. doi:10.1007/s10811-010-9583-x.
- Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., et al. (2009). Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. *J. Plant Growth Regul.* 28, 386–399. doi:10.1007/s00344-009-9103-x.

- Kibite, S., and Evans, L. E. (1984). Causes of negative correlations between grain yield and grain protein concentration in common wheat. *Euphytica* 33, 801–810. doi:10.1007/BF00021906.
- Kichey, T., Hirel, B., Heumez, E., Dubois, F., and Le Gouis, J. (2007). In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crops Res.* 102, 22–32. doi:10.1016/j.fcr.2007.01.002.
- Killmayer, M. (2017). La Filière Blé Dur Française - Contexte, sélection et programme de recherche.
- Killmayer, M., and Verdier, J.-L. (2017). Blé dur : les dates et densités de semis préconisées. Available at: <https://www.arvalis-infos.fr/ble-dur-la-bonne-combinaison-date-x-densite-de-semis-@/view-25821-arvarticle.html> [Accessed September 1, 2018].
- Kim, W. T., Franceschi, V. R., Krishnan, H. B., and Okita, T. W. (1988). Formation of wheat protein bodies: Involvement of the Golgi apparatus in gliadin transport. *Planta* 176, 173–182. doi:10.1007/BF00392442.
- Kirn, A. (University of A., Kashif, S. R. (University of A., and Yaseen, M. (University of A. (2010). Using indigenous humic acid from lignite to increase growth and yield of okra (*Abelmoschus esculentus* L.). *Soil Environ. Pak.* Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PK2011000550> [Accessed June 4, 2018].
- Koizumi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tsuji, H., and Shinozaki, K. (1993). Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 129, 175–182.
- Koukounaras, A., Tsouvaltzis, P., and Siomos, A. (2013). Effect of root and foliar application of amino acids on the growth and yield of greenhouse tomato in different fertilization levels. *J. Food Agric. Environ.* 11, 644–648.
- Kurek, I., Aviezer, K., Erel, N., Herman, E., and Breiman, A. (1999). The wheat peptidyl prolyl cis-trans-isomerase FKBP77 is heat induced and developmentally regulated. *Plant Physiol.* 119, 693–704.
- Latique, S., Aymen Elouaer, M., Chernane, H., Hannachi, C., and Elkaoua, M. (2014). Effet of Seaweed Liquid Extract of *Sargassum vulgare* on Growth of Durum Wheat Seedlings (*Triticum durum* L) under salt stress. *Int. J. Innov. Appl. Stud.*, 1430–1435.
- Lea, P. J., and Morot-Gaudry, J.-F. (2001). *Plant Nitrogen*. Springer Science & Business Media.
- Lee, G. J., and Vierling, E. (2000). A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol.* 122, 189–198.

- Li, N., Zhang, S., Liang, Y., Qi, Y., Chen, J., Zhu, W., et al. (2018). Label-free quantitative proteomic analysis of drought stress-responsive late embryogenesis abundant proteins in the seedling leaves of two wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *J. Proteomics* 172, 122–142. doi:10.1016/j.jprot.2017.09.016.
- Li, X., Wu, Y., Zhang, D. Z., Gillikin, J. W., Boston, R. S., Franceschi, V. R., et al. (1993). Rice prolamine protein body biogenesis: a BiP-mediated process. *Science* 262, 1054–1056.
- Linkohr, B. I., Williamson, L. C., Fitter, A. H., and Leyser, H. M. O. (2002). Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant J.* 29, 751–760. doi:10.1046/j.1365-313X.2002.01251.x.
- Linthorst, H. J., van der Does, C., Brederode, F. T., and Bol, J. F. (1993). Circadian expression and induction by wounding of tobacco genes for cysteine proteinase. *Plant Mol. Biol.* 21, 685–694.
- Liu, H., Wang, Z., Yu, R., Li, F., Li, K., Cao, H., et al. (2016). Optimal nitrogen input for higher efficiency and lower environmental impacts of winter wheat production in China. *Agric. Ecosyst. Environ.* 224, 1–11. doi:10.1016/j.agee.2016.03.022.
- Liu, W., Zhang, Y., Gao, X., Wang, K., Wang, S., Zhang, Y., et al. (2011). Comparative proteome analysis of glutenin synthesis and accumulation in developing grains between superior and poor quality bread wheat cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 92, 106–115. doi:10.1002/jsfa.4548.
- López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., and Herrera-Estrella, A. (2015). Trichoderma as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Sci. Hortic.* 196, 109–123. doi:10.1016/j.scienta.2015.08.043.
- Majoul, T., Bancel, E., Triboï, E., Ben Hamida, J., and Branlard, G. (2004). Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: Characterization of heat-responsive proteins from non-prolamins fraction. *PROTEOMICS* 4, 505–513. doi:10.1002/pmic.200300570.
- Mancuso, S., Azzarello, E., Mugnai, S., and Briand, X. (2006). Marine bioactive substances (IPA extract) improve foliar ion uptake and water stress tolerance in potted *Vitis vinifera* plants. *Adv. Hortic. Sci.* 20, 156–161.
- Martinez, C., Blanc, F., Le Claire, E., Besnard, O., Nicole, M., and Baccou, J. C. (2001). Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiol.* 127, 334–344.
- Masci, S., D'Ovidio, R., Lafiandra, D., and Kasarda, D. D. (2000). A 1B-coded low-molecular-weight glutenin subunit associated with quality in durum wheats shows strong similarity to a subunit present in some bread wheat cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 100, 396–400. doi:10.1007/s001220050052.

- Masclaux, C., Quilleré, I., Gallais, A., and Hirel, B. (2001). The challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physio-agronomic and molecular approaches. *Ann. Appl. Biol.* 138, 69–81. doi:10.1111/j.1744-7348.2001.tb00086.x.
- Mastouri, F., Björkman, T., and Harman, G. E. (2012). Trichoderma harzianum Enhances Antioxidant Defense of Tomato Seedlings and Resistance to Water Deficit. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 25, 1264–1271. doi:10.1094/MPMI-09-11-0240.
- Mauch, F., and Dudler, R. (1993). Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.* 102, 1193–1201. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC158905/> [Accessed January 9, 2018].
- Mazzeo, M. F., Di Stasio, L., D'Ambrosio, C., Arena, S., Scaloni, A., Corneti, S., et al. (2017). Identification of Early Represented Gluten Proteins during Durum Wheat Grain Development. *J. Agric. Food Chem.* 65, 3242–3250. doi:10.1021/acs.jafc.7b00571.
- McAinsh, M. R., and Pittman, J. K. (2009). Shaping the calcium signature. *New Phytol.* 181, 275–294. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02682.x.
- Merigout, P. (2006). *Etude du métabolisme de la plante en réponse à l'apport de différents fertilisants et adjuvants culturaux. Influence des phytohormones sur le métabolisme azoté.* Institut national agronomique Paris-Grignon Available at: <http://www.theses.fr/2006INAP0019> [Accessed December 9, 2016].
- Michalak, I., Chojnacka, K., Dmytryk, A., Wilk, R., Gramza, M., and Rój, E. (2016). Evaluation of Supercritical Extracts of Algae as Biostimulants of Plant Growth in Field Trials. *Front. Plant Sci.* 7. doi:10.3389/fpls.2016.01591.
- Millard, P. (1988). The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. *Plant Cell Environ.* 11, 1–8. doi:10.1111/j.1365-3040.1988.tb01769.x.
- Ming, Q., Su, C., Zheng, C., Jia, M., Zhang, Q., Zhang, H., et al. (2013). Elicitors from the endophytic fungus Trichoderma atroviride promote Salvia miltiorrhiza hairy root growth and tanshinone biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 64, 5687–5694. doi:10.1093/jxb/ert342.
- Mladenova, Y. I., Maini, P., Mallegni, C., Goltsev, V., Vladova, R., Vinarova, K., et al. (1998). Siapton - an amino-acid-based biostimulant reducing osmotic stress metabolic changes in maize. *Agro Food Ind. Hi-Tech* 9, 18–22. Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19990701815> [Accessed June 5, 2018].
- Mon, J., Bronson, K. F., Hunsaker, D. J., Thorp, K. R., White, J. W., and French, A. N. (2016). Interactive effects of nitrogen fertilization and irrigation on grain yield, canopy temperature, and nitrogen use efficiency in overhead sprinkler-irrigated durum wheat. *Field Crops Res.* 191, 54–65. doi:10.1016/j.fcr.2016.02.011.

- Monteny, G. J. (2001). The EU Nitrates Directive: A European approach to combat water pollution from agriculture. *ScientificWorldJournal* 1 Suppl 2, 927–935. doi:10.1100/tsw.2001.377.
- Morales-Payan, J. P., and Santos, B. M. (1996). Response of Cilantro (*coriandrum Sativum*) to Combinations of Gibberellic Acid, Folcysteine, and Nitrogen. *HortScience* 31, 760–760. Available at: <http://hortsci.ashspublications.org/content/31/5/760.3> [Accessed June 5, 2018].
- Morales-Payan, J. P., and Santos, B. M. (1997). Influence of Folcysteine and Nitrogen on Lettuce (*Lactuca sativa*) Yield. *HortScience* 32, 437–437. Available at: <http://hortsci.ashspublications.org/content/32/3/437.4> [Accessed June 5, 2018].
- Morales-Payan, J. P., and Stall, W. M. (2003). Papaya (*Carica papaya*) response to foliar treatments with organic complexes of peptides and amino acids. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.* 116, 30–32. Available at: <http://journals.fcla.edu/fshs/article/view/86499> [Accessed June 5, 2018].
- Morán-Diez, E., Hermosa, R., Ambrosino, P., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Lorito, M., et al. (2009). The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the trichoderma harzianum-plant beneficial interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 22, 1021–1031. doi:10.1094/MPMI-22-8-1021.
- Morot-Gaudry, J.-F., Orsel, M., Diaz, C., Daniel-Vedele, F., and Masclaux-Daubresse, C. (2006). Absorption et assimilation du nitrate et recyclage de l'azote organique chez les plantes: intérêt pour le colza. *Ol. Corps Gras Lipides* 13, 393–402. doi:10.1051/ocl.2006.0091.
- Mugnai, S., Azzarello, E., Pandolfi, C., Salamagne, S., Briand, X., and Mancuso, S. (2007). Enhancement of ammonium and potassium root influxes by the application of marine bioactive substances positively affects *Vitis vinifera* plant growth. *J. Appl. Phycol.* 20, 177–182. doi:10.1007/s10811-007-9203-6.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., and Kenerley, C. M. (2013). Trichoderma Research in the Genome Era. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 105–129. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102353.
- Muramatsu, M., and Fukazawa, C. (1993). A high-order structure of plant storage proprotein allows its second conversion by an asparagine-specific cysteine protease, a novel proteolytic enzyme. *Eur. J. Biochem.* 215, 123–132.
- Mutlu, A., and Gal, S. (1999). Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. *Physiol. Plant.* 105, 569–576. doi:10.1034/j.1399-3054.1999.105324.x.
- Nair, P., Kandasamy, S., Zhang, J., Ji, X., Kirby, C., Benkel, B., et al. (2012). Transcriptional and metabolomic analysis of *Ascophyllum nodosum* mediated freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 13, 643. doi:10.1186/1471-2164-13-643.

- Nardi, S., Pizzeghello, D., Schiavon, M., Ertani, A., Nardi, S., Pizzeghello, D., et al. (2016). Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Sci. Agric.* 73, 18–23. doi:10.1590/0103-9016-2015-0006.
- Nezhadahmadi, A., Prodhan, Z. H., and Faruq, G. (2013). Drought Tolerance in Wheat. *Sci. World J.* 2013. doi:10.1155/2013/610721.
- Nicolás, C., Hermosa, R., Rubio, B., Mukherjee, P. K., and Monte, E. (2014). Trichoderma genes in plants for stress tolerance-status and prospects. *Plant Sci.* 228, 71–78. doi:10.1016/j.plantsci.2014.03.005.
- Ohyama, T., Minagawa, R., Ishikawa, S., Yamamoto, M., Van Phi Hung, N., Ohtake, N., et al. (2013). “Soybean Seed Production and Nitrogen Nutrition |,” in *A comprehensive Survey of International Soybean Research - Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships* (IntechOpen), 127. Available at: /books/a-comprehensive-survey-of-international-soybean-research-genetics-physiology-agronomy-and-nitrogen-relationships/soybean-seed-production-and-nitrogen-nutrition [Accessed May 22, 2018].
- Okazaki, K., Kabeya, Y., Suzuki, K., Mori, T., Ichikawa, T., Matsui, M., et al. (2009). The PLASTID DIVISION1 and 2 Components of the Chloroplast Division Machinery Determine the Rate of Chloroplast Division in Land Plant Cell Differentiation. *Plant Cell* 21, 1769–1780. doi:10.1105/tpc.109.067785.
- Olsen, O.-A. (2001). ENDOSPERM DEVELOPMENT: Cellularization and Cell Fate Specification. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 233–267. doi:10.1146/annurev.arplant.52.1.233.
- Osborne, T. B. (1907). *The proteins of the wheat kernel*,. Washington, D.C.: Carnegie Institution of Washington, Available at: <https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/22763>.
- Osman, H. S., and Salim, B. B. M. (2016). Improving Yield and Quality of Kohlrabi Stems Growing under NaCl Salinity Using Foliar Application of Urea and Seaweed Extract. *ResearchGate* 8, 149–160. doi:10.5829/idosi.jhsop.2016.8.3.1182.
- Owen, A. G., and Jones, D. L. (2001). Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. *Soil Biol. Biochem.* 33, 651–657. doi:10.1016/S0038-0717(00)00209-1.
- Palta, J. A., and Fillery, I. R. P. (1995). N application enhances remobilization and reduces losses of pre-anthesis N in wheat grown on a duplex soil. *Aust. J. Agric. Res.* 46, 519–531. doi:10.1071/ar9950519.
- Parrado, J., Bautista, J., Romero, E. J., García-Martínez, A. M., Friaiza, V., and Tejada, M. (2008). Production of a carob enzymatic extract: Potential use as a biofertilizer. *Bioresour. Technol.* 99, 2312–2318. doi:10.1016/j.biortech.2007.05.029.

- Pask, A. J. D., Sylvester-Bradley, R., Jamieson, P. D., and Foulkes, M. J. (2012). Quantifying how winter wheat crops accumulate and use nitrogen reserves during growth. *Field Crops Res.* 126, 104–118. doi:10.1016/j.fcr.2011.09.021.
- Paspatis, E. A. (1990). Effects of external application of gibberellic acid (GA₃) on yield and nitrate content of spinach. *Zizaniology* 2, 161–166. Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19901182794> [Accessed June 5, 2018].
- Pastore, D., Trono, D., Laus, M. N., Di Fonzo, N., and Flagella, Z. (2007). Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress: a case study: durum wheat mitochondria. *J. Exp. Bot.* 58, 195–210. doi:10.1093/jxb/erl273.
- Pechanek, U., Karger, A., Gröger, S., Charvat, B., Schögl, G., and Lelley, T. (1997). Effect of nitrogen fertilization on quantity of flour protein components, dough properties, and breadmaking quality of wheat (English). *Cereal Chem* 74, 800–805.
- Pelagio-Flores, R., Esparza-Reynoso, S., Garnica-Vergara, A., López-Bucio, J., and Herrera-Estrella, A. (2017). Trichoderma-Induced Acidification Is an Early Trigger for Changes in Arabidopsis Root Growth and Determines Fungal Phytostimulation. *Front. Plant Sci.* 8. doi:10.3389/fpls.2017.00822.
- Polo, J., and Mata, P. (2018). Evaluation of a Biostimulant (Pepton) Based in Enzymatic Hydrolyzed Animal Protein in Comparison to Seaweed Extracts on Root Development, Vegetative Growth, Flowering, and Yield of Gold Cherry Tomatoes Grown under Low Stress Ambient Field Conditions. *Front. Plant Sci.* 8. doi:10.3389/fpls.2017.02261.
- Pomeranz, Y. (1988). “Chemical composition of kernel structures,” in *Wheat: Chemistry and Technology* (Ed., AACC, St. Paul, Minn.), 97–158.
- Pompa, M., Giuliani, M. M., Palermo, C., Agriesti, F., Centonze, D., and Flagella, Z. (2013). Comparative analysis of gluten proteins in three durum wheat cultivars by a proteomic approach. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2606–2617. doi:10.1021/jf304566d.
- Popko, M., Michalak, I., Wilk, R., Gramza, M., Chojnacka, K., and Górecki, H. (2018). Effect of the New Plant Growth Biostimulants Based on Amino Acids on Yield and Grain Quality of Winter Wheat. *Molecules* 23, 470. doi:10.3390/molecules23020470.
- Pornon, A., Escaravage, N., and Lamaze, T. (2007). Complementarity in mineral nitrogen use among dominant plant species in a subalpine community. *Am. J. Bot.* 94, 1778–1785. doi:10.3732/ajb.94.11.1778.
- Pornon, A., Marty, C., Winterton, P., and Lamaze, T. (2011). The intriguing paradox of leaf lifespan responses to nitrogen availability. *Funct. Ecol.* 25, 796–801. doi:10.1111/j.1365-2435.2011.01849.x.
- Pu, Z., Chen, G., Wang, J., Liu, Y., Jiang, Q., Li, W., et al. (2014). Characterization and chromosome location of ADP-ribosylation factors (ARFs) in wheat. *Pak. J. Biol. Sci. PJS* 17, 792–801. doi:10.3923/pjbs.2014.792.801.

- Rathore, S. S., Chaudhary, D. R., Boricha, G. N., Ghosh, A., Bhatt, B. P., Zodape, S. T., et al. (2009). Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. *South Afr. J. Bot.* 75, 351–355. doi:10.1016/j.sajb.2008.10.009.
- Rawlings, N. D., and Barrett, A. J. (1995). Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. *Methods Enzymol.* 248, 105–120.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P., and Barrett, A. J. (2004). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 32, D160-164. doi:10.1093/nar/gkh071.
- Rayorath, P., Jithesh, M. N., Farid, A., Khan, W., Palanisamy, R., Hankins, S. D., et al. (2008). Rapid bioassays to evaluate the plant growth promoting activity of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. using a model plant, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *J. Appl. Phycol.* 20, 423–429. doi:10.1007/s10811-007-9280-6.
- Rentsch, D., Schmidt, S., and Tegeder, M. (2007). Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Lett.* 581, 2281–2289. doi:10.1016/j.febslet.2007.04.013.
- Romeuf, I., Tessier, D., Dardevet, M., Branlard, G., Charmet, G., and Ravel, C. (2010). wDBTF: an integrated database resource for studying wheat transcription factor families. *BMC Genomics* 11, 185. doi:10.1186/1471-2164-11-185.
- Rotblat, B., Enshell-Seiffers, D., Gershoni, J. M., Schuster, S., and Avni, A. (2002). Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 32, 1049–1055.
- Rouphael, Y., Colla, G., Giordano, M., El-Nakhel, C., Kyriacou, M. C., and De Pascale, S. (2017). Foliar applications of a legume-derived protein hydrolysate elicit dose-dependent increases of growth, leaf mineral composition, yield and fruit quality in two greenhouse tomato cultivars. *Sci. Hortic.* 226, 353–360. doi:10.1016/j.scienta.2017.09.007.
- Rouphael, Y., Spíchal, L., Panzarová, K., Casa, R., and Colla, G. (2018). High-Throughput Plant Phenotyping for Developing Novel Biostimulants: From Lab to Field or From Field to Lab? *Front. Plant Sci.* 9. doi:10.3389/fpls.2018.01197.
- Roussos, P. A., Denaxa, N.-K., and Damvakaris, T. (2009). Strawberry fruit quality attributes after application of plant growth stimulating compounds. *Sci. Hortic.* 119, 138–146. doi:10.1016/j.scienta.2008.07.021.
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Lombardi, N., Woo, S. L., Vinale, F., Marra, R., et al. (2015). Multiple roles and effects of a novel *Trichoderma* hydrophobin. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 28, 167–179. doi:10.1094/MPMI-07-14-0194-R.
- Ryan, C. A., Pearce, G., Scheer, J., and Moura, D. S. (2002). Polypeptide hormones. *Plant Cell* 14 Suppl, S251-264.

- Saa Silva, S., Brown, P. H., Ponchet, M., New Ag International, International Society for Horticultural Science, and Section Pome and Stone Fruits (2013). *Proceedings of the 1st World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture: Strasbourg, France, November 26-29, 2012*. Leuven, Belgium: ISHS Available at: <http://catalog.hathitrust.org/api/volumes/oclc/864901480.html> [Accessed May 25, 2018].
- Salas-Marina, M. A., Isordia-Jasso, M. I., Islas-Osuna, M. A., Delgado-Sánchez, P., Jiménez-Bremont, J. F., Rodríguez-Kessler, M., et al. (2015). The Epl1 and Sm1 proteins from *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens* differentially modulate systemic disease resistance against different life style pathogens in *Solanum lycopersicum*. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00077.
- Samson, M.-F., André, C., Audigeos, D., Besombes, C., Braun, P., Cassan, D., et al. (2016). *Durum Wheat Pasta with a Good Quality and a Reduced Nitrogen Fertilization: Is it Possible?*. Available at: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01606910> [Accessed April 18, 2018].
- Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Pardo, F., Alonso, G. L., and Salinas, M. R. (2017). Moscatel vine-shoot extracts as a grapevine biostimulant to enhance wine quality. *Food Res. Int.* 98, 40–49. doi:10.1016/j.foodres.2017.01.004.
- Sanders, D. C., Ricotta, J. A., and Hodges, L. (1990). Improvement of Carrot Stands with Plant Biostimulants and Fluid Drilling. *HortScience* 25, 181–183. Available at: <http://hortsci.ashspublications.org/content/25/2/181> [Accessed June 5, 2018].
- Savill, G. P., Michalski, A., Powers, S. J., Wan, Y., Tosi, P., Buchner, P., et al. (2018). Temperature and nitrogen supply interact to determine protein distribution gradients in the wheat grain endosperm. *J. Exp. Bot.* doi:10.1093/jxb/ery127.
- Schaafsma, G. (2009). Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition. *Eur. J. Clin. Nutr.* 63, 1161–1168. doi:10.1038/ejcn.2009.56.
- Sen, A., Srivastava, V. K., Singh, R. K., Singh, A. P., Raha, P., Ghosh, A. K., et al. (2015). Soil and Plant Responses to the Application of *Ascophyllum nodosum* Extract to No-Till Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 46, 123.
- Shah, M. T., Zodape, S. T., Chaudhary, D. R., Eswaran, K., and Chikara, J. (2013). Seaweed Sap as an Alternative Liquid Fertilizer for Yield and Quality Improvement of Wheat. *J. Plant Nutr.* 36, 192–200. doi:10.1080/01904167.2012.737886.
- Sharma, H., Fleming, C., Selby, C., Rao, J., and Martin, T. (2014). Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *J. Appl. Phycol.* 26, 465.
- Sharma, S. H. S., Lyons, G., McRoberts, C., McCall, D., Carmichael, E., Andrews, F., et al. (2012). Biostimulant activity of brown seaweed species from Strangford Lough: compositional analyses of polysaccharides and bioassay of extracts using mung bean and pak choi. *J. Appl. Phycol.* 24, 1081–1091. doi:10.1007/s10811-011-9737-5.

- Shewry, P. (2016). Cultivation and Impact of Wheat. doi:10.1093/acrefore/9780199389414.013.218.
- Shewry, P. R., and Tatham, A. S. (1997). Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins. *J. Cereal Sci.* 25, 207–227. doi:10.1006/jcrs.1996.0100.
- Shoresh, M., Harman, G. E., and Mastouri, F. (2010). Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 21–43. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114450.
- Simmonds Norman W (2006). The relation between yield and protein in cereal grain. *J. Sci. Food Agric.* 67, 309–315. doi:10.1002/jsfa.2740670306.
- Simões, I., and Faro, C. (2004). Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur. J. Biochem.* 271, 2067–2075. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04136.x.
- Simoes Larraz Ferreira, M. (2011). *Dynamique d'assemblage des protéines de réserve et du remplissage du grain de blé dur*. Montpellier, SupAgro Available at: <http://www.theses.fr/2011NSAM0009> [Accessed June 26, 2017].
- Sivasankari, S., Venkatesalu, V., Anantharaj, M., and Chandrasekaran, M. (2006). Effect of seaweed extracts on the growth and biochemical constituents of *Vigna sinensis*. *Bioresour. Technol.* 97, 1745–1751. doi:10.1016/j.biortech.2005.06.016.
- Skylas, D. J., Mackintosh, J. A., Cordwell, S. J., Basseal, D. J., Walsh, B. J., Harry, J., et al. (2000). Proteome Approach to the Characterisation of Protein Composition in the Developing and Mature Wheat-grain Endosperm. *J. Cereal Sci.* 32, 169–188. doi:10.1006/jcrs.2000.0321.
- Song, Y., and Zheng, Q. (2008). Influence of gliadin removal on strain hardening of hydrated wheat gluten during equibiaxial extensional deformation. *J. Cereal Sci.* 48, 58–67. doi:10.1016/j.jcs.2007.08.001.
- Spano, G., Di Fonzo, N., Perrotta, C., Platani, C., Ronga, G., Lawlor, D. W., et al. (2003). Physiological characterization of 'stay green' mutants in durum wheat. *J. Exp. Bot.* 54, 1415–1420. doi:10.1093/jxb/erg150.
- Spinelli, F., Fiori, G., Noferini, M., Sprocatti, M., and Costa, G. (2010). A novel type of seaweed extract as a natural alternative to the use of iron chelates in strawberry production. *Sci. Hortic.* 125, 263–269. doi:10.1016/j.scienta.2010.03.011.
- Stamatiadis, S., Evangelou, L., Yvin, J.-C., Tsadilas, C., Mina, J., and Cruz, F. (2015). Responses of winter wheat to *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. extract application under the effect of N fertilization and water supply. *J. Appl. Phycol.* 27, 589.
- Stevens, C., Titarenko, E., Hargreaves, J. A., and Gurr, S. J. (1996). Defence-related gene activation during an incompatible interaction between *Stagonospora* (Septoria) nodorum and barley (*Hordeum vulgare* L.) coleoptile cells. *Plant Mol. Biol.* 31, 741–749.

- Sun, W., Van Montagu, M., and Verbruggen, N. (2002). Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* 1577, 1–9. doi:10.1016/S0167-4781(02)00417-7.
- Sun, Z., Han, B., Liu, S., Wang, H., and Gao, R. (1996). Absorption and redistribution of nitrogen during grain-filling period of wheat and their regulation by 6-benzylaminopurine. *Acta Phytophysiol. Sin.* 22, 258–264. Available at: <http://europepmc.org/abstract/cba/294864> [Accessed October 4, 2017].
- Szczepanek, M., Wilczewski, E., Poberezny, J., Wszelaczynska, E., Keutgen, A., and Ochmian, I. (2015). Effect of Biostimulants and Storage on the Content of Macroelements in Storage Roots of Carrot. *J. Elem.* 20, 1021–1031. doi:10.5601/jelem.2015.20.1.768.
- Tanou, G., Ziogas, V., and Molassiotis, A. (2017). Foliar Nutrition, Biostimulants and Prime-Like Dynamics in Fruit Tree Physiology: New Insights on an Old Topic. *Front. Plant Sci.* 8. doi:10.3389/fpls.2017.00075.
- Terman, G. L., Ramig, R. E., Dreier, A. F., and Olson, R. A. (1969). Yield-Protein Relationships in Wheat Grain, as Affected by Nitrogen and Water 1. *Agron. J.* 61, 755–759. doi:10.2134/agronj1969.00021962006100050031x.
- Torre, A. L., Battaglia, V., and Caradonia, F. (2015). An overview of the current plant biostimulant legislations in different European Member States. *J. Sci. Food Agric.* 96, 727–734. doi:10.1002/jsfa.7358.
- Traon, D., Amat, L., Zotz, F., and du Jardin, P. (2014). A Legal Framework for Plant Biostimulants and Agronomic Fertiliser Additives in the EU.
- Triboï, E., Martre, P., and Triboï-Blondel, A.-M. (2003). Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *J. Exp. Bot.*, 1731.
- Trocchi, A., Borrelli, G. M., De Vita, P., Fares, C., and Di Fonzo, N. (2000). Mini Review: Durum Wheat Quality: A Multidisciplinary Concept. *J. Cereal Sci.* 32, 99–113. doi:10.1006/jcrs.2000.0322.
- Uauy, C., Brevis, J. C., and Dubcovsky, J. (2006). The high grain protein content gene Gpc-B1 accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat. *J. Exp. Bot.* 57, 2785–2794. doi:10.1093/jxb/erl047.
- Vernieri, P., Borghesi, E., Tognoni, F., Ferrante, A., Serra, G., and Piaggese, A. (2006). Use of Biostimulants for Reducing Nutrient Solution Concentration in Floating System. *Acta Hortic.* 718, 477–484. doi:10.17660/ActaHortic.2006.718.55.
- Victorio, V. C. M., Souza, G. H. M. F., Santos, M. C. B., Vega, A. R., Cameron, L. C., and Ferreira, M. S. L. (2018). Differential expression of albumins and globulins of wheat flours of different technological qualities revealed by nanoUPLC-UDMSE. *Food Chem.* 239, 1027–1036. doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.049.

- Vinje, M. A., Willis, D. K., Duke, S. H., and Henson, C. A. (2011). Differential expression of two β -amylase genes (Bmy1 and Bmy2) in developing and mature barley grain. *Planta* 233, 1001–1010. doi:10.1007/s00425-011-1348-5.
- Visioli, G., Galieni, A., Stagnari, F., Bonas, U., Specca, S., Faccini, A., et al. (2016). Proteomics of Durum Wheat Grain during Transition to Conservation Agriculture. *PLoS One* 11, e0156007. doi:10.1371/journal.pone.0156007.
- Viti, R., and Bartolhi, S. (2018). Effets de certains biostimulants sur la nouaison de l'amandier.
- Viti, R., Bartolini, S., and Vitagliano, C. (1990). Growth regulators on pollen germination in olive. *Acta Hort.* 286, 227–230. doi:10.17660/ActaHortic.1990.286.47.
- Wally, O., Critchley, A., Hiltz, D., Craigie, J., Han, X., Zaharia, L., et al. (2013). Regulation of Phytohormone Biosynthesis and Accumulation in Arabidopsis Following Treatment with Commercial Extract from the Marine Macroalga *Ascophyllum nodosum*. *J. Plant Growth Regul.* 32, 324.
- Weindling, R. (1932). *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology*, 837–845.
- Whapham, C. A., Blunden, G., Jenkins, T., and Hankins, S. D. (1993). Significance of betaines in the increased chlorophyll content of plants treated with seaweed extract. *J. Appl. Phycol.* 5, 231. doi:10.1007/BF00004023.
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* 24, 115–119. doi:10.1016/j.fm.2006.07.004.
- Wirén, N. von, Gojon, A., Chaillou, S., and Raper, D. (2001). “Mechanisms and Regulation of Ammonium Uptake in Higher Plants,” in *Plant Nitrogen* (Springer, Berlin, Heidelberg), 61–77. doi:10.1007/978-3-662-04064-5_3.
- Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., et al. (2014). Trichoderma-based Products and their Widespread Use in Agriculture. *Open Mycol. J.* 8. Available at: <https://benthamopen.com/ABSTRACT/TOMYCJ-8-71> [Accessed May 30, 2018].
- Woolfolk, C. W., Raun, W. R., Johnson, G. V., Thomason, W. E., Mullen, R. W., Wynn, K. J., et al. (2002). Influence of Late-Season Foliar Nitrogen Applications on Yield and Grain Nitrogen in Winter Wheat. *Agron. J.* 94, 429–434. doi:10.2134/agronj2002.4290.
- Xie, B.-B., Qin, Q.-L., Shi, M., Chen, L.-L., Shu, Y.-L., Luo, Y., et al. (2014). Comparative Genomics Provide Insights into Evolution of *Trichoderma* Nutrition Style. *Genome Biol. Evol.* 6, 379–390. doi:10.1093/gbe/evu018.
- Xu, C., and Leskovar, D. I. (2015). Effects of *A. nodosum* seaweed extracts on spinach growth, physiology and nutrition value under drought stress. *Sci. Hortic.* 183, 39–47. doi:10.1016/j.scienta.2014.12.004.

- Yakhin, O. I., Lubyaynov, A. A., Yakhin, I. A., and Brown, P. H. (2017a). Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Front. Plant Sci.* 7. doi:10.3389/fpls.2016.02049.
- Yakhin, O. I., Lubyaynov, A. A., Yakhin, I. A., and Brown, P. H. (2017b). Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Front. Plant Sci.* 7. doi:10.3389/fpls.2016.02049.
- Yang, M., Dong, J., Zhao, W., and Gao, X. (2016). Characterization of proteins involved in early stage of wheat grain development by iTRAQ. *J. Proteomics* 136, 157–166. doi:10.1016/j.jprot.2016.01.002.
- Zhang, X., and Schmidt, R. (1997). The impact of growth regulators on the α -tocopherol status in water-stressed *Poa pratensis*. *Int. Turfgrass Soc.*, 1364–1371.
- Zhang, Y., Pan, J., Huang, X., Guo, D., Lou, H., Hou, Z., et al. (2017). Differential effects of a post-anthesis heat stress on wheat (*Triticum aestivum* L.) grain proteome determined by iTRAQ. *Sci. Rep.* 7, 3468. doi:10.1038/s41598-017-03860-0.
- Zhen, S., Deng, X., Zhang, M., Zhu, G., Lv, D., Wang, Y., et al. (2017). Comparative Phosphoproteomic Analysis under High-Nitrogen Fertilizer Reveals Central Phosphoproteins Promoting Wheat Grain Starch and Protein Synthesis. *Front. Plant Sci.* 8. doi:10.3389/fpls.2017.00067.
- Zhou, W., Zhu, Y., Dong, A., and Shen, W.-H. (2015). Histone H2A/H2B chaperones: from molecules to chromatin-based functions in plant growth and development. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 83, 78–95. doi:10.1111/tpj.12830.
- Zodape, S. T., Mukherjee, S., Reddy, M. P., and Chaudhary, D. R. (2012). Effect of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex silva. extract on grain quality, yield and some yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Int. J. Plant Prod.* 3, 97–101. doi:10.22069/ijpp.2012.646.

Annexe

Effet de biostimulants, de leur stade d'application, du niveau de fertilisation et de l'application d'N foliaire sur le rendement, la teneur en protéines, la quantité de protéines et le poids de mille grains pour plusieurs essais au champ

Site	Fertilisation	N foliaire	Stade d'application	Biostimulant	N	Rendement (Qx/ha)	Teneur en protéines	Quantité de protéines	Poids de mille grains
Moyenne ± Ecart type									
Saint-Sulpice 2015									
Standard	Oui	DFE	CONTRÔLE	10	83,8 ± 3,1	11,3 ± 0,1	9,4 ± 0,4	49,0 ± 2,7	
			DPI4913		85,3 ± 6,2	11,3 ± 0,1	9,6 ± 0,7	49,3 ± 1,7	
			AF086		87,2 ± 5,0	11,2 ± 0,1	9,8 ± 0,6	49,6 ± 3,3	
Mervilla 2016 - 1									
Standard	Non	2 nœuds	CONTRÔLE	4	81,8 ± 8,1	12,8 ± 0,2	10,5 ± 0,9	38,3 ± 2,8	
			DPI4913		86,1 ± 7,6	12,8 ± 0,4	11,1 ± 0,9	38,0 ± 1,4	
			AF086		85,4 ± 5,9	12,7 ± 0,2	10,9 ± 0,7	39,3 ± 3,2	
			DFE	4	86,8 ± 11,3	13,1 ± 0,7	11,3 ± 1,0	37,3 ± 4,1	
			DPI4913		89,3 ± 6,3	13,0 ± 0,5	11,6 ± 0,7	40,9 ± 2,2	
			AF086		87,7 ± 7,1	13,0 ± 0,9	11,4 ± 0,6	38,0 ± 3,4	
		Floraison	CONTRÔLE	4	85,2 ± 12,0	13,0 ± 0,3	11,1 ± 1,4	36,4 ± 1,5	
			DPI4913		88,7 ± 8,6	13,0 ± 0,8	11,5 ± 0,6	39,5 ± 2,6	
			AF086		86,4 ± 5,3	12,9 ± 0,3	11,1 ± 0,8	36,4 ± 2,9	
			DFE	4	69,2 ± 3,1	12,0 ± 0,8	8,3 ± 0,9	37,1 ± 1,3	
			DPI4913		68,7 ± 3,4	11,9 ± 0,8	8,2 ± 0,8	39,2 ± 5,9	
			AF086		69,6 ± 3,6	11,9 ± 0,7	8,3 ± 0,7	37,4 ± 2,5	
		Contrainte	DFE	4	71,4 ± 3,0	12,4 ± 0,5	8,9 ± 0,2	38,1 ± 1,3	
			DPI4913		75,8 ± 3,5	12,4 ± 0,5	9,4 ± 0,8	38,4 ± 1,8	
			AF086		72,5 ± 2,5	12,4 ± 0,5	9,0 ± 0,7	38,4 ± 1,6	
			DFE	4	71,1 ± 6,9	12,3 ± 0,5	8,7 ± 0,9	39,8 ± 1,4	
			DPI4913		67,9 ± 2,5	11,7 ± 0,8	8,0 ± 0,8	41,8 ± 2,6	
			AF086		74,5 ± 3,3	12,3 ± 0,5	9,2 ± 0,5	36,8 ± 2,9	
Mervilla 2016 - 2									
Standard	Non	2 nœuds	CONTRÔLE	4	88,2 ± 7,9	12,6 ± 0,8	11,1 ± 1,7	38,9 ± 2,1	
			DPI4913		93,3 ± 10,7	12,5 ± 0,8	11,7 ± 1,8	39,1 ± 1,6	
			AF086		91,2 ± 7,5	12,5 ± 0,9	11,3 ± 0,4	40,3 ± 2,0	
			DFE	4	89,8 ± 8,2	12,4 ± 0,5	11,1 ± 1,0	39,9 ± 4,3	
			DPI4913		93,0 ± 7,2	12,3 ± 0,7	11,4 ± 0,8	38,8 ± 6,1	
			AF086		93,4 ± 9,2	13,0 ± 0,5	12,1 ± 1,2	40,4 ± 4,7	
		Floraison	CONTRÔLE	4	95,0 ± 9,6	12,1 ± 0,5	11,5 ± 1,5	40,8 ± 2,9	
			DPI4913		95,5 ± 5,6	12,4 ± 0,5	11,9 ± 0,5	40,4 ± 4,2	
			AF086		87,2 ± 10,5	12,2 ± 0,9	10,6 ± 1,0	41,8 ± 1,3	
			DFE	4	80,7 ± 4,8	11,3 ± 0,1	9,1 ± 0,5	40,8 ± 2,0	
			DPI4913		82,1 ± 5,4	11,8 ± 0,2	9,6 ± 0,6	40,4 ± 3,1	
			AF086		81,9 ± 3,4	11,5 ± 0,2	9,4 ± 0,3	38,5 ± 4,5	
		Contrainte	DFE	4	81,8 ± 4,5	11,4 ± 0,2	9,3 ± 0,4	39,9 ± 2,6	
			DPI4913		82,3 ± 5,9	10,9 ± 0,5	9,0 ± 1,0	40,6 ± 1,0	
			AF086		79,6 ± 1,2	11,4 ± 0,2	9,1 ± 0,2	38,8 ± 1,7	
			DFE	4	82,8 ± 4,6	11,5 ± 0,5	9,6 ± 0,9	38,5 ± 2,6	
			DPI4913		82,9 ± 6,4	11,5 ± 0,2	9,5 ± 0,9	40,9 ± 1,0	
			AF086		86,6 ± 6,4	11,8 ± 0,2	10,2 ± 0,9	42,2 ± 3,3	
Rebigue 2017 - 1									
Standard	Non	2 nœuds +	CONTRÔLE	4	85,4 ± 2,8	13,8 ± 0,2	11,8 ± 0,5	58,9 ± 1,2	
			DPI4913		85,1 ± 3,2	14,3 ± 0,5	12,2 ± 0,8	58,5 ± 1,8	
			AF086		83,5 ± 4,1	14,1 ± 0,6	11,8 ± 0,8	58,5 ± 1,7	
		DFE	CONTRÔLE	4	85,8 ± 3,2	14,6 ± 0,6	12,5 ± 0,5	56,5 ± 1,3	
			DPI4913		86,4 ± 2,0	14,3 ± 0,4	12,3 ± 0,3	58,4 ± 1,5	
			AF086		87,8 ± 1,6	14,2 ± 0,5	12,5 ± 0,3	58,5 ± 1,3	
	Contrainte	Non	CONTRÔLE	4	71,0 ± 5,2	11,1 ± 0,2	7,9 ± 0,7	56,3 ± 0,7	
			DPI4913		73,7 ± 7,3	11,2 ± 0,4	8,3 ± 1,1	56,1 ± 0,8	
			AF086		72,5 ± 6,7	11,0 ± 0,4	8,0 ± 1,0	56,0 ± 1,0	
		Oui	CONTRÔLE	4	74,8 ± 8,3	11,3 ± 0,2	8,5 ± 1,1	56,7 ± 0,8	
			DPI4913		73,0 ± 6,8	11,4 ± 0,6	8,4 ± 1,3	55,6 ± 0,5	
			AF086		72,8 ± 6,3	11,4 ± 0,4	8,3 ± 1,0	57,1 ± 0,8	
Rebigue 2017 - 2									
Standard	Non	2 nœuds +	CONTRÔLE	4	85,5 ± 2,2	14,5 ± 0,8	12,4 ± 0,9	57,4 ± 1,8	
			DPI4913		88,7 ± 4,1	13,8 ± 0,3	12,3 ± 0,8	57,6 ± 1,7	
			AF086		84,1 ± 4,8	14,6 ± 0,7	12,3 ± 1,2	57,1 ± 1,8	
		DFE	CONTRÔLE	4	87,3 ± 0,8	14,5 ± 0,1	12,7 ± 0,2	56,7 ± 0,6	
			DPI4913		86,9 ± 4,0	14,4 ± 0,5	12,5 ± 0,5	58,0 ± 1,1	
			AF086		87,2 ± 3,9	14,3 ± 0,2	12,5 ± 0,6	57,1 ± 0,9	
	Contrainte	Non	CONTRÔLE	4	78,0 ± 4,4	11,1 ± 0,3	8,6 ± 0,6	57,0 ± 0,7	
			DPI4913		79,2 ± 8,9	11,0 ± 0,4	8,8 ± 1,2	55,2 ± 2,0	
			AF086		74,3 ± 5,8	10,9 ± 0,2	8,1 ± 0,7	56,4 ± 0,7	
		Oui	CONTRÔLE	4	78,7 ± 5,9	11,4 ± 0,6	9,0 ± 1,1	56,5 ± 0,3	
			DPI4913		78,4 ± 2,0	11,6 ± 0,6	9,1 ± 0,7	56,5 ± 1,6	
			AF086		75,6 ± 3,3	11,0 ± 0,3	8,3 ± 0,4	56,5 ± 0,6	
Saint-Sulpice 2017									
Standard	Non	2 nœuds	CONTRÔLE	4	86,3 ± 4,7	15,0 ± 0,5	12,9 ± 0,7	54,0 ± 3,1	
			DPI4913		88,0 ± 3,5	14,8 ± 0,5	13,0 ± 0,4	52,0 ± 2,4	
			DFE	4	88,1 ± 5,2	14,6 ± 0,2	12,9 ± 0,9	52,7 ± 2,1	
		DFE	CONTRÔLE	4	88,3 ± 4,0	14,7 ± 0,2	13,0 ± 0,6	52,8 ± 2,9	
			2 nœuds +	CONTRÔLE	4	87,5 ± 3,7	14,9 ± 0,5	13,0 ± 0,9	53,2 ± 2,2
			DFE	DPI4913		88,4 ± 1,4	15,0 ± 0,6	13,2 ± 0,7	51,8 ± 2,5