

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de Recherche : Biotechnologies Végétales et Microbiennes, Biodiversité et Environnement
Structure de Recherche : Équipe de Microbiologie et Biologie Moléculaire
Discipline : Biologie
Spécialité : Biotechnologies, Génomique végétale et microbienne
التكنولوجيا الحيوية والجينومات النباتية والميكروبية

Présentée et soutenue le 16/09/2022 par :

Mr. Farid RACHIDI

ÉTUDE DU POTENTIEL ELICITEUR ET/OU BIOSIMULANT DES POLYSACCHARIDES MICROALGAUX SUR LA CROISSANCE ET LA DÉFENSE DES PLANTES – « *SOLANUM LYCOPERSICUM.L* » ; ASPECTS BIOCHIMIQUES, MÉTABOLIQUES ET MOLÉCULAIRES

Devant le Jury

Bouchra BELKADI	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat	Président
Leila MEDRAOUI	PH, Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat	Rapporteur/ Examinatrice
Abdallah OUKARROUM	PES, Université Mohammed VI Polytechnique - Ben Guerir	Rapporteur/ Examinateur
Naima El GHACHTOULI	PES, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, FST - Fès	Rapporteur/ Examinatrice
Abdelkarim FILALI-MALTOUF	PES, Expert, Académie Hassan II des Sciences et Techniques - Rabat	Rapporteur/ Examinateur
Hicham EL ARROUSSI	Expert, Docteur, Fondation MAScIR - Rabat	Co-Directeur
Laila SBABOU	PH, Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat	Directeur

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de Recherche : Biotechnologies Végétales et Microbiennes, Biodiversité et Environnement
Structure de Recherche : Équipe de Microbiologie et Biologie Moléculaire
Discipline : Biologie
Spécialité : Biotechnologies, Génomique Végétale et Microbienne

Présentée et soutenue 16/09/2022 par :

Mr. Farid RACHIDI

ÉTUDE DU POTENTIEL ELICITEUR ET/OU BIOSTIMULANT DES
POLYSACCHARIDES MICROALGAUX SUR LA CROISSANCE ET LA DÉFENSE
DES PLANTES – « *SOLANUM LYCOPERSICUM.L* » ; ASPECTS BIOCHIMIQUES,
MÉTABOLIQUES ET MOLÉCULAIRES.

Devant le Jury :

Bouchra BELKADI	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat	Président
Leila MEDRAOUI	PH, Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat	Rapporteur/ Examinatrice
Abdallah OUKARROUM	PES, Université Mohammed VI Polytechnique - Ben Guerir	Rapporteur/ Examinateur
Naima El GHACHTOULI	PES, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, FST - Fès	Rapporteur/ Examinatrice
Abdelkarim FILALI-MALTOUF	PES, Expert, Académie Hassan II des Sciences et Techniques - Rabat	Rapporteur/ Examinateur
Hicham EL ARROUSSI	Expert, Docteur, Fondation MASciR - Rabat	Co-Directeur
Laila SBABOU	PH, Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat	Directeur

Année Universitaire : 2021/2022

Faculté des Sciences, 4 Avenue Ibn Battouta B.P. 1014 RP, Rabat – Maroc
Tel +212 (05) 37 77 18 34/35/38, Fax : +212 (05) 37 77 42 61, <http://www.fsr.um5.ac.ma>

Je dédie ce travail à :

Mes parents :

- *Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*
- *Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit. Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de vous.*
- *Mes frères et sœurs qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité. Je remercie mes sources de joie et de force : mon père Mohammed RACHIDI, ma mère Malika OUFASKA, mes sœurs, Badiiaa, Hayate, Ouarda et mes frères, Abdelhadi, Anouar, Mohammed, et Ilyas. Merci de m'avoir soutenu et encouragé pendant les moments de doute.*
- *Mes remerciements aux enseignants du LMBM : en particulier le Pr. Jamal AURAG, professeur et directeur de laboratoire de microbiologie et biologie moléculaire, Pr. Jamila MAATJALAH, et Pr. Ilham BOUHMOUCHE. Qu'ils trouvent ici, toute l'expression de notre gratitude.*
- *Je tiens à remercier chaleureusement toute l'équipe LBV de la fondation MASJIR spécialement, Dr. Issam M.KADMIRI, directeur de laboratoire LBV, Dr. M.J. Chanda, Mr. Redouan BENHJMA, Mr. Abderrahim AASFAH et Mr. Yassin EL KASMI pour leurs participations, leurs discussions pertinentes, leurs soutiens, leurs encouragements, et leur temps qui ont consacrés pour la réalisation de ce travail.*

- *Je voudrais aussi exprimer ma reconnaissance envers tous les amis, collègues et condisciples du LMBM aussi bien LBV qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de ma démarche. Ainsi je tiens à remercier plus particulièrement mes chers Mr. Karim RABEH, Mr. Mohamad HENJI, Mlle. Amina GUESSABI et Mlle. Ghizlan LAQHMAJI pour leur amitié, leur aide et leurs encouragements jusqu'au bout.*

A Dr. Nawal MERGHOUB et Dr. Kaoutar YAAKOUBI, merci pour vos encouragements, aide et échange scientifique remarquable. Mr. Soufiane FALL mon ami et mon binôme avec qui j'ai partagé les hauts et les bas de notre parcours. Je remercie mes chers amis Mme. Btissam NIYA et Mr. Nour-eddine El Hallaoui, pour leur aide et leurs encouragements. C'était un plaisir de commencer et partager avec vous cette aventure à MAScIR et aussi à FSR.

- *Condisciples, Mr. Najib El MERNISSI, Mme. Iman BENNIS, Mr. Salaheddine ZAROUAL, et Mr. Ali OUHSSAIN, merci pour tous ce que vous avez fait pour mener ce travail.*
- *Je remercie ma chère amie Mme. Hajar MACHTI pour son aide et son effort inconditionnels, son amitié sincère et sa transparence.*

A tous mes enseignants...

L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire a été réalisé au Centre de Biotechnologie des Algues (CBA) au sein de la Fondation MAScIR en collaboration avec le Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire (LMBM) de la Faculté des Sciences de Rabat (FSR), Université Mohammed V de Rabat, sous la co-direction entre, professeur SBABOU Leila de la Faculté des Sciences de Rabat et Dr. EL ARROUSSI Hicham, le directeur du Centre de la Biotechnologie des Algues (CBA) de la FONDATION MAScIR.

Ce travail s'insère dans le cadre du projet MAScIRBIO Biostimulant: « Développement des biostimulants des plantes à partir des microalgues », sous la direction du Dr. EL ARROUSSI Hicham. Ce projet a reçu le soutien financier du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Formation des Cadres.

En préambule à ce mémoire, j'adresse ces quelques mots pour remercier notre grand Dieu tout puissant pour exprimer ma reconnaissance envers sa grande générosité. Dieu m'a donné la volonté, la patience, la santé et la confiance durant toutes mes années d'études.

Au terme de ce travail, je me fais le devoir de témoigner ma gratitude à l'ensemble des personnes physiques ou morales ayant contribué à la réalisation de ce travail :

- *C'est avec une immense gratitude que je remercie sincèrement mon très cher professeur et mon directeur de thèse Mme Laila SBABOU, professeur à la faculté des sciences de Rabat. Vous avez rendu possible la réalisation de ce travail au-delà de votre rôle de directeur de thèse, le temps que vous m'avez consacré, votre patience, votre disponibilité, le partage de votre expérience et vos judicieux conseils m'ont fait progresser. Je vous remercie sincèrement pour tout l'échange scientifiques que vous m'avez accordé depuis ma licence, comme examinatrice de PFE de licence, le mémoire de master et aujourd'hui comme encadrante de la thèse. Vos encouragements ont su me remettre sur le droit chemin. Je suis heureux que vous fassiez ainsi partie aujourd'hui des personnes qui ont marqué ma vie.*
- *Mes remerciements les plus profonds à mon cher encadrant et pas co-encadrant Mr. Hicham EL ARROUSSI, directeur du Centre de Biotechnologie des Algues, sans vous ce projet sur les Biostimulants n'aurait pas vu le jour. Vous m'avez fait découvrir le domaine de microalgues, la gestion de projet, l'esprit d'équipe la patience et la persévérance. Vous m'avez accompagné avec beaucoup de patience, vous m'avez guidé, toujours de façon très positive et vous m'avez toujours assuré la possibilité de travailler dans les meilleures conditions. Je vous remercie pour votre investissement, votre aide et votre intérêt pour ce projet durant ces années de Thèse. Vous avez su me conseiller et me guider tout en me laissant une grande part de liberté et de responsabilité. Je vous remercie infiniment car vous m'avez permis d'intégrer et de participer aux divers projets. Je vous remercie sincèrement pour tout le soutien que vous m'avez accordé, pour votre disponibilité, et vos encouragements.*

- *Je voudrais également exprimer mes remerciements les plus sincères et ma reconnaissance à Mme. Bouchra BELKADI, professeur à la faculté des sciences de Rabat, pour ses encouragements et aussi pour l'honneur qu'elle m'a accordé en acceptant de présider le jury de ma thèse. J'exprime également ma reconnaissance pour ces conseils tout au long de notre parcours d'étude.*
- *Je remercie tout particulièrement Mme. Laila MEDRAOUI, professeur à la Faculté des Sciences de Rabat, mon encadrante en PFE de master pour vos conseils, votre soutien et votre intérêt pour ce projet, c'est un plaisir de vous avoir comme rapporteur de mon travail et membre de jury. Je la remercie aussi pour sa patience et son sérieux lors de la correction et le suivi de ce travail.*
- *Je remercie également Mr. Abdallah OUKARROUM, professeur à l'Université Mohammed VI Polytechnique de Benguerir, d'avoir aimablement accepté de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Je vous remercie d'avoir gentiment accepté de lire ce mémoire, malgré vos multiples occupations, vous n'avez pas hésité un seul instant à examiner ce travail ; c'est un honneur pour moi.*
- *J'adresse mes remerciements aussi au Mme. Naima El GHACHOUJI, professeur à la Faculté des Sciences et Technique de Fes, veuillez trouver ici toute ma reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Je vous remercie d'avoir gentiment accepté de lire ce mémoire, malgré vos multiples occupations, vous n'avez pas hésité un seul instant à examiner ce travail ; c'est un honneur pour moi.*
- *Le Mr. Adelkarim FILLALI MALIOUT, professeur retraité de la faculté des sciences Rabat, actuellement membre de l'académie Hassan II des sciences et techniques, et x-directeur du Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire. Très cher professeur je vous remercie de m'avoir accepté pour l'inscription pour les trois premières années de ma thèse, sous votre encadrement. Et merci beaucoup pour les bons moments d'échange scientifiques. Grace à vos conseils et à vos orientations ce projet a lieu. Aussi je vous remercie pour votre modestie, votre sympathie, et vos valeurs humaines qui commencent à ce raréfié. Vous avez eu un réel impact positif sur mon parcours professionnel et personnel. C'est un honneur pour moi de vous voir comme membre du jury.*

Je mesure l'honneur que vous me faites en acceptant de juger mon travail. J'espère qu'il sera digne de la confiance que vous m'avez accordée. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

La protection intégrée et raisonnée des cultures constitue un défi majeur pour l'agriculture. Par ailleurs, les nouvelles approches de productions agricoles doivent concilier l'environnement et l'agriculture et donc veiller à préserver la durabilité des écosystèmes par la réduction des intrants chimiques au niveau des sols. Dans ce contexte, l'utilisation des biostimulants et des bioéliciteurs constitue une alternative biologique innovante et prometteuse. Ces produits sont capables d'induire la croissance d'une plante et de mimer son agression par un pathogène, induisant ainsi une résistance chez la plante. Ces substances permettent donc de promouvoir un état de résistance chez les plantes face aux différents stress biotiques et abiotiques. Plusieurs substances biologiques sont connues comme biostimulants telles que les polysaccharides, les extraits végétaux, les acides fulviques et humiques, les acides aminés, ainsi que les extraits d'algues et de microalgues. Au cours de ce travail, nous avons extrait des polysaccharides (PSs) à partir de microalgues et évalué leur potentiel à induire la croissance et la défense de plants de tomate. Les potentiels biostimulant et Bioéliciteur de ces PSs ont été testés et caractérisés par des approches biochimiques, métabolomiques, et moléculaires. Les résultats obtenus ont montré l'effet biostimulant des PSs sur la croissance de la plante (augmentation du nombre de nœuds, du poids sec des pousses et de la longueur des pousses), ainsi que l'amélioration du contenu en caroténoïdes, en chlorophylles et en protéines. Il a été aussi montré une amélioration de l'activité de la Nitrate réductase (NR) et de la NAD-Glutamate Déshydrogénase (NAD-GDH). Par ailleurs, nos études ont montré que ces polysaccharides induisent des voies biochimiques, transcriptomiques et métabolomiques en relation avec les voies de la défense des plantes. Nous avons noté l'induction de protéines PRs dépendantes de la pathogenèse (1,3-bêta-glucanase, chitinase, PAL et POX), des protéines totales, des polyphénols et du H₂O₂. L'analyse métabolomique par GC-MS a montré un changement dans le profil des lipides, des stérols et des alcanes. Aussi, nous avons obtenu une induction de la synthèse des acides gras (C16:3, C18:2 et C18:3, C18:0 et acide azélaïque), des alcanes, des alcènes et du phytostérol. L'analyse par Metaboanalyst 0.5 a montré une induction des voies du métabolisme de l'acide linoléique (LAM), de la biosynthèse des acides gras insaturés (BUFA), de la biosynthèse des acides gras (FAB), de la biosynthèse de la cutine, de la subérine et de la cire (CSWB), de la biosynthèse des brassinostéroïdes (BrB), de l'élongation des acides gras (FAE), de la dégradation des acides gras et du métabolisme de l'acide alpha-linolénique (aLAM). L'approche transcriptomique via qRT-PCR a montré que les gènes, MAPK (1-7), PR (PR1, PR2, PR3, PR9) et PI I ont été induits. Enfin, l'analyse par HPLC-MS a montré une accumulation très significative des phytohormones tZ et GA4. D'autre part, il a été noté une réduction hautement significative de la synthèse d'IAA et de DHZ et une réduction modérément significative de GA1 et de SA. Aucun effet significatif n'a été relevé quant à la synthèse de JA, ABA et iP. L'analyse par l'ACP et heatmap a révélé que les souches qui ont induits positivement divers paramètres dépendants de la croissance et la défense des plantes, sont *D. salina*, *Porphyrodium sp* et *P. tricornutum*. A l'issue de ces résultats, on peut constater que les polysaccharides microalgaux ouvrent de nouvelles perspectives pour le développement de produits Biostimulants et bioéliciteurs d'origine naturelle pour la stimulation de la croissance et l'induction de la défense des plantes.

Mots-clés : Microalgues, Polysaccharides, *S. lycopersicum L* (tomate), Stress, Biostimulants, Bioéliciteurs, Métabolomique, Transcriptomique, Croissance et Défense des Plantes

Integrated and reasoned crop protection is a major challenge for agriculture. In addition, new approaches to agricultural production must reconcile the environment and agriculture and therefore ensure the sustainability of ecosystems by reducing chemical inputs to the soil. In this context, the use of biostimulants and bioelicitors is an innovative and promising biological alternative. These products are capable of inducing the growth of a plant and mimicking its aggression by a pathogen, thus inducing resistance in the plant. These substances can therefore promote a state of resistance in plants to various biotic and abiotic stresses. Several biological substances are known as biostimulants such as polysaccharides, plant extracts, fulvic and humic acids, amino acids, as well as algae and microalgae extracts. In this work, we extracted polysaccharides (PSs) from microalgae and evaluated their potential to induce growth and defense of tomato plants. The biostimulant and biorelicitor potentials of these PSs were tested and characterised by biochemical, metabolomic and molecular approaches. The results obtained showed the biostimulatory effect of PSs on plant growth (increase in the number of nodes, shoot dry weight and shoot length), as well as an improvement in the content of carotenoids, chlorophylls and proteins. It was also shown to improve Nitrate Reductase (NR) and NAD-Glutamate Dehydrogenase (NAD-GDH) activities. Furthermore, our studies showed that these polysaccharides induce biochemical, transcriptomic and metabolomic pathways related to those of plant defense. The induction of pathogenesis-dependent PRs (1,3-beta-glucanase, chitinase, PAL and POX), total proteins, polyphenols and H₂O₂ was noted. Metabolomic analysis by GC-MS showed a change in the lipid, sterol and alkane profiles. An induction of the synthesis of fatty acids (C16:3, C18:2 and C18:3, C18:0 and azelaic acid), alkanes, alkenes and phytosterol was obtained. Analysis by Metaboanalyst 0.5 analysis showed induction of the pathways of linoleic acid metabolism (LAM), unsaturated fatty acid biosynthesis (BUFA), fatty acid biosynthesis (FAB), cutin, suberin and wax biosynthesis (CSWB), brassinosteroid biosynthesis (BrB), fatty acid elongation (FAE), fatty acid degradation and alpha-linolenic acid metabolism (aLAM). The transcriptomic approach through qRT-PCR showed that the genes, MAPK (1-7), PR (PR1, PR2, PR3, PR9) and PI I were induced. Finally, HPLC-MS analysis showed a very significant accumulation of the phytohormones tZ and GA4. On the other hand, there was a highly significant reduction of IAA and DHZ synthesis and a moderately significant reduction of GA1 and SA. No significant effect was found on the synthesis of JA, ABA and iP. PCA and heatmap analysis revealed that the strains that positively induced various plant growth and defense dependent parameters were *D. salina*, *Porphyrodium sp* and *P. tricornutum*. These results show that microalgal polysaccharides open new perspectives for the development of biostimulants and bioelicitors of natural origin for the stimulation of growth and the induction of plant defense.

Keywords : Microalgae, Polysaccharides; *S. lycopersicum L* (tomato), Stress, Biostimulants, Bioelicitors; Metabolomics; Transcriptomics; Plant Growth and Defense.

PUBLICATIONS

- **Farid, R.**, Mutale-Joan, C., Redouane, B., Mernissi Najib, E. L., Abderahime, A., Laila, S., & EL Hicham, A. (2019). Effect of microalgae polysaccharides on biochemical and metabolomics pathways related to plant defense in *Solanum lycopersicum*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 188(1), 225-240.
- **Rachidi, F.**, Benhima, R., Sbabou, L., & El Arroussi, H. (2020). Microalgae polysaccharides bio-stimulating effect on tomato plants: Growth and metabolic distribution. *Biotechnology Reports*, 25, e00426.
- **Rachidi, F.**, Benhima, R., Kasmi, Y., Sbabou, L., & Arroussi, H. E. (2021). Evaluation of microalgae polysaccharides as biostimulants of tomato plant defense using metabolomics and biochemical approaches. *Scientific reports*, 11(1), 1-16.
- **Farid Rachidi**, Laila Sbabou AASFAR Abderrahim, Hicham El Arroussi. Microalgae Polysaccharides-Induced tomato defense pathways by Regulating Pathogenesis-Related Genes, Lipidomic Pathway Analysis and Plant Hormones Cross-Talk (en cours de soumission).
- Mutale-joan, C., **Rachidi, F.**, Mohamed, H. A., Mernissi, N. E., Aasfar, A., Barakate, M., ... & Arroussi, H. E. (2021). Microalgae-cyanobacteria-based biostimulant effect on salinity tolerance mechanisms, nutrient uptake, and tomato plant growth under salt stress. *Journal of Applied Phycology*, 33(6), 3779-3795.
- Pakhrou, O., Medraoui, L., Belkadi, B., **Rachidi, F.**, Errahmani, H., Alami, M., & Filali-Maltouf, A. (2020). Using two retrotransposon-based marker systems (SRAP and REMAP) for genetic diversity analysis of Moroccan Argan tree. *Molecular Biology Research Communications*, 9(3), 93.
- RABEH, K., SBABOU, L., **RACHIDI, F.**, Ferradous, A., Aasfar, A., ELAROUSSI, H., ... & FILALI-MALTOUF, A. Metabolomics Response to Drought Stress in Argania Spinosa L. Skeels Ecotypes. *Skeels Ecotypes*. (En cours de soumission).

COMMUNICATIONS

- **Farid Rachidi**, A. Aasfar, Laila Sbabou, Abdelkarim Filali Maltouf, Hicham El Arroussi. EFFET BIOSTIMULANT DES POLYSACCHARIDES MICROALGAUX SUR LA CROISSANCE DE LA TOMATE. « Communication orale », 2^{ème} congrès international Biotech2017, Faculté des Sciences et Techniques, Fès – Maroc. 22- 25 novembre 2017.

- **F. Rachidi**, A. Aasfar, R. Benhima, A. Filali Maltouf, L. Sbabou Laila Sbabou & H. El Arroussi. Effet biostimulant des microalgues sur la croissance et la distribution des métabolites chez la tomate « *Solanum lycopersicum* ». « Communication orale », 2^{ème} congrès international Cialgues-2018. Faculté des sciences et techniques- Marrakech, Maroc. Du 22 au 24 Mars 2018.

- **Farid Rachidi**, Redouane Benhima, Yassine Kasmi, Laila Sbabou & Hicham El Arroussi. Evaluation of microalgae polysaccharides as biostimulants of tomato plant defense using metabolomics and biochemical approaches. «Oral Communication », second edition of the Plant BioProTech Symposium, which took place from November 19th to 22nd, 2019 in Marrakesh, Morocco. From November 19th to 22nd, 2019.

■ LISTE DES ABRÉVIATIONS

PSs	Polysaccharides	SA	Salicylic Acid
NN	Nombre de noeuds	JA	Jasmonic Acid
SDW	Poids sec des pousses	ABA	Abscicic Acid
SS	Longueur des pousses	MAPK	Mitogen-activated protein kinase
NR	Nitrate Réductase	PBR	Photobioréacteur
NAD-GDH	NAD-Glutamate dehydrogenase	PUFA	PolyUnsaturated Fatty Acid
PR	Protéines dépendantes de pathogène	EPA	Eicosapentaenoic Acid
POX	Peroxydase	DHA	Docosahexaenoic Acid
GC-MS	Chromatographie à phase gazeuse couplée de spectrométrie de masse	TCA	Acide trichloroacétique
LAM	Linoleic acid metabolism	EBIC	European Biostimulants Industry Council
BUFA	Unsaturated fatty acid biosynthesis	PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
FAB	Fatty acid biosynthesis	flg	Flagellin
CSWB	Cutin, suberin and wax biosynthesis	PGN	Peptidoglycane
BrB	brassinosteroid biosynthesis	LPS	Lipopolysaccharide
FAE	Fatty acid elongation	MAMP	Microbe-Associated Molecular Pattern
aLAM	Fatty acid degradation, and alpha-linolenic acid metabolism	DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns
UHPLC-MS	Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry	PRRs	Pattern Recognizing Receptors
IAA	Indole-3-acetic acid	RLK	Receptor-Like Kinase
DHZ	Dihydrozeatine	RLP	Receptor-Like Protein
tZ	Trans-Zeatin	NB-LRR	Nucleotide Binding-site-Leucine-Rich Repeat
iP	Isopentenyladenine	LysM	Motifs lysine
GA	Gibberellic Acid	PTI	Pattern-triggered Immunity
ROS	Espèces réactives de l'oxygène	ETI	Effectors-triggered Immunity
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	PI	Inhibiteurs des protéases
RBOHD	Respiratory burst oxidase homolog D	VIP	Variable importance in projection
CPKs	Protéines kinases dépendantes du calcium	ACP	Analyse en composantes principales
HR	Réponse hypersensible	PLS-DA	Analyse discriminante partielle des Moindres carrés
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène	CI	code d'identification
NO	Monoxyde d'azote	KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
PAL	Phenylalanine ammonia lyase	RT-PCR	Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction
SOD	Superoxyde dismutase	ARN	acide ribonucléique
SAR	Résistance systémique acquise	ADN	acide désoxyribonucléique
LAR	Résistance acquise locale	ADNc	ADN complémentaire
HSTs	Host-selective toxins	EPS	Exopolysaccharides
LOX	Lipoxygenase	CAT	Catalase
BSA	Albumine de sérum bovin	AG	Acides gras
		APX	Ascorbate Peroxidase

■ LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Comparaison entre les systèmes ouverts et fermés pour la production de microalgues.	12
Tableau 2 : Principales espèces de microalgues, leur composition, leurs produits et leurs applications.....	13
Tableau 3 : Caractérisation des différentes protéines PR en fonction de l'espèce végétale. ...	35
Tableau 5 : Production and composition of three microalgae polysaccharides.	44
Tableau 4 : Microalgae crudes polysaccharides effect on biochemical and enzymatic parameters of tomato plant.	44
Tableau 6 : Effect of the microalgae crudes polysaccharides extract (PS) on the tomato plant growth.....	44
Tableau 7 : The effect of microalgae crude polysaccharides on the distribution of fatty acid in tomato plants.	45
Tableau 8 : The effect of microalgae crudes polysaccharides on the distribution of alkanes in tomato plants.	46
Tableau 9 : Correlation between tomato shoot dry weight (g) and polysaccharides treatment concentration (1 mg mL ⁻¹ PS) and composition.....	46
Tableau 10 : Biomass production and composition of polysaccharides extracted from Moroccan microalgae.	57
Tableau 11 : Lipids profile of tomato plants leaves treated by microalgae polysaccharides...	62
Tableau 12 : The effect of microalgal polysaccharides on the biosynthesis and profile of alkanes and alkenes in	63
Tableau 13 : Effect of polysaccharides treatments on profile of others metabolites (µg g ⁻¹) into tomato plants.	64
Tableau 14 : Primers used in RT-qPCR in tomato experiments.	83
Tableau 15 : The PSs microalgae effect on metabolic pathway enrichment analysis based on p-value less than 0.05.	87
Tableau 16 : Dosage de l'ARN extrait.	142

Figure 1 : Illustre de la diversité morphologique et de taille des souches microalgales.	7
Figure 2 : Systèmes de la culture des microalgues.....	13
Figure 3 : Applications des biomasses et les extraits des microalgues.	16
Figure 4 : Nombre de cultures montrant une réponse positive à l'application de biostimulant	20
Figure 5 : Mécanismes de reconnaissance d'une attaque par un pathogène chez la plante.	24
Figure 6 : Mécanismes de reconnaissance de la Flagelline 22 impliquant les récepteurs RLK FLS2/BAK1/BIR1 et le complexe protéique G.	25
Figure 7 : Vue schématique de l'immunité déclenchée par des motifs (PTI) et de l'immunité déclenchée par des effecteurs (ETI) chez les plantes.	26
Figure 8 : Mécanisme de production d'espèces réactives de l'oxygène.	29
Figure 9 : Implication du monoxyde d'azote(NO) et peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) dans les mécanismes de défenses à la suite d'une attaque par un agent pathogène.	30
Figure 10 : Aperçu des réseaux de signalisation des hormones végétales et de leur interaction dans les réponses au stress.	31
Figure 11 : Mécanisme moléculaire de l'élicitation de la défense des plantes.	36
Figure 12 : Growth of microalgae strains: Growth rate (a), Biomass production (b).	43
Figure 13 : Microalgae crude polysaccharides effect on the distribution of Sterols in tomato plants.	45
Figure 14 : Principal component analysis (PCA) biplot for investigated growth	46
Figure 15 : The effect of crude PS on protein content (a), PAL (b), chitinase (c) and β -1,3- Glucanase (d),.....	58
Figure 16 : Peroxidase activity (a), H ₂ O ₂ (b) and polyphenols content (c) in the tomato plants leaves after Polysaccharide treatment.	59
Figure 17 : Metabolites profile of tomato plants leaves treated by polysaccharides. Tomato plants were injected with 1 mg mL ⁻¹ of PS, and H ₂ O as Control.....	59
Figure 18 : Biplot of principal component analysis of variables and treatments (a); Correlation between variables (b); Heatmap hierarchal clustering of studied variables (c); PLS-DA for biochemical variables and treatments (d).	65
Figure 19 : PCA-Biplot of metabolites and treatments (a), Correlation between metabolites (b), Heatmap hierarchal clustering of metabolomics variable (c), and Heatmap of metabolites and treatments (d), after plant treatment by microalgae PS extract.	66
Figure 20 : Relative expression genes in tomato plants after treatment with PS microalgae. .	85

Figure 21 : Important metabolites in response to PSs treatment identified by partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) in.	86
Figure 22 : Phytohormones content in tomato plants after treatment with PS microalgae.	88
Figure 23 : Summary scheme showing the main PSs treatment-induced changes detected at the metabolite levels. Biosynthesis of unsaturated FA pathway (A); Cutine, suberine and wax biosynthesis pathway (B); Brassinosteroide biosynthesis pathway (C).	90
Figure 24 : Principal component analysis (PCA); scores for treatments (A) and loadings different variables (B) in tomato leaves after treatment with PSs.	94
Figure 25 : Graphical Pearson correlation matrix of all variables induced after treatment of tomato plant with PSs treatment.	95
Figure 26 : Schéma récapitulatif de mod d'action des polysaccharides microalgaux sur la biostimulation de la croissance et la bioelicitation de la défense des plantes.	117

DÉDICACE.....	i
AVANT-PROPOS	iii
RÉSUMÉ.....	v
ABSTRACT	vi
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
INTRODUCTION.....	1
PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	4
CHAPITRE I : MIRCOALGUES	5
1. Microalgues.....	6
1.1. Biodiversité des microalgues	6
1.2. Culture des microalgues.....	6
1.2.1. Techniques d'isolement et de purification des microalgues.....	7
1.2.2. Facteurs influençant la croissance des microalgues	9
1.2.2.1. Lumière	9
1.2.2.2. Température	9
1.2.2.3. pH.....	10
1.2.2.4. Salinité.....	10
1.2.2.5. Nutriments.....	10
1.2.3. Systèmes de culture des microalgues	11
1.2.3.1. Bassins et raceways.....	11
1.2.3.2. Photobioréacteurs.....	12
1.3. Bioproduits des microalgues et leurs applications.....	13
1.3.1. Lipides	14
1.3.2. Protéines	14
1.3.3. Polysaccharides	15
1.3.4. Pigments	15
1.3.5. Vitamines.....	15
1.4. Applications des microalgues	16
CHAPITRE II : BIOSTIMULANTS DES PLANTES	17
1. Biostimulants des plantes.....	18
1.1. Généralités	18
1.2. Biostimulant de la croissance des plantes	19
CHAPITRE III : BIOSTIMULATION/BIOELICITATION DE LA DÉFENSE DES PLANTES	22

1. Bioélicitation de la défense des plantes	23
1.1. Mécanismes de défense des plantes	23
1.1.1. Systèmes de défense induits par la plante	23
1.1.1.1. Reconnaissance de l'agent pathogène via les éliciteurs M/P/DAMPs.....	23
1.1.1.2. Immunité déclenchée par des motifs (PTI)	27
1.1.1.2.1. Signalisation par les complexes de signalisation	27
1.1.1.2.2. Transmission du signal : implication des phytohormones	30
1.1.1.2.3. Effecteurs de la réponse de la défense des plantes	33
PARTIE II : MÉTHODOLOGIE, RÉSULTATS & DISCUSSION	37
CHAPITRE I : ARTICLE 1 " L'EFFET BIOSTIMULANT DES EXTRAITS POLYSACCHARIDIQUES SUR LA CROISSANCE ET LA DISTRIBUTION DES METABOLITES CHEZ LES PLANTES DE TOMATE <i>S. LYCOPERSICUM</i> "	38
1. Contexte	39
2. Présentation de l'article.....	41
2.1. Abstract	41
2.2. Introduction.....	41
2.3. Materail and methods.....	42
2.3.1. Mircoalgae culture	42
2.3.2. Microalgae polysaccharides production and characterization	42
2.3.3. Plant growth and crude polysaccharides extracts treatment	42
2.3.4. Plant growth biochemical parameter analysis	42
2.3.5. GC–MS metabolomics analysis of tomato plants treated with microalgae polysaccharides.....	42
2.3.6. Statistical analysis.....	42
2.4. Results.....	43
2.4.1. Growth microalgae and polysaccharides production.....	43
2.4.2. Effect of crude microalgae polysaccharides on growth of tomato plants.....	43
2.4.3. GC–MS metabolomics analysis of tomato plants responses to microalgae crude polysaccharides.....	43
2.4.3.1. Lipid profile of tomato leaves	43
2.4.3.2. Sterol and Alkanes profile.....	43
2.5. Discussion	44
2.6. References.....	47
3. Synthèse du l'article.....	49
CHAPITRE II : ARTICLE 2 " L'EFFET BIOÉLICITEUR DES PSS MICROALGAUX SUR L'INDUCTION DES VOIES DE LA DÉFENSE DES PLANTES DE LA TOMATE, APPROCHES BIOCHIMIAUES ET METABOLOMIAUES"	52
1. Contexte	53

2. Présentation de l'article.....	56
2.1. Abstract.....	56
2.2. Introduction.....	56
2.3. Results.....	57
2.3.1. Microalgae culture and polysaccharides characterization	57
2.3.2. Microalgal polysaccharides effect on tomato plants defense pathways	57
2.3.3. Microalgal polysaccharides effect on protein content, PAL, chitinase and 1,3-β,glucanase activities.....	57
2.3.4. Microalgal polysaccharides effect on peroxidase activity, H ₂ O ₂ and Polyphenols ...	58
2.3.5. GC–MS metabolomics analysis of tomato plants’ response to microalgae polysaccharide treatment	58
2.3.6. Microalgae polysaccharides effect on lipid and sterol profiles in tomato plants.....	60
2.3.7. Microalgae polysaccharide effect on alkanes and alkenes profile	60
2.3.8. Other metabolites.....	60
2.4. Discussion	60
2.5. Conclusion	67
2.6. Materials and methods	67
2.6.1. Microalgae culture conditions and growth measurements	67
2.6.2. Polysaccharides production and partial characterization.....	67
2.6.3. Microalgae polysaccharides effect on tomato plant defense	68
2.7. Statistical analysis	69
2.8. References.....	69
3. Synthèse de l'article	72
CHAPITRE III : ARTICLE 3 " L'ETUDE DES VOIES DE DÉFENSE DE LA TOMATE INDUITES PAR LES POLYSACCHARIDES DE MICROALGUES VIA : LA RÉGULATION DES GÈNES LIÉS À LA PATHOGENÈSE, L'ANALYSE DES VOIES LIPIDOMIQUES ET L'INTERACTION ENTRE LES HORMONES VÉGÉTALES"	
1. Contexte	76
2. Présentation de l'article.....	77
2.1. Abstract.....	77
2.2. Introduction.....	78
2.3. Material and methods.....	80
2.3.1. Growth and treatments of tomato plants.....	80
2.3.2. Metabolomics analysis	81
2.3.3. Metabolic Pathway Analysis	81
2.3.4. Gene expression analysis Rt-PCR.....	82
2.3.5. Quantification of Plant Hormones	83
2.3.6. Statistical analysis.....	84

2.4. Results.....	84
2.4.1. Tomato plant defense Gene expression analysis	84
2.4.2. Metabolomic Analysis	86
2.4.3. Metabolic Pathway Analysis	87
2.4.4. Phytohormones profiling	87
2.5. Discussion	88
2.5.1. Gene expression analysis.....	88
2.5.2. Metabolic Pathway Analysis	90
2.5.3. UFA biosynthesis pathway	91
2.5.4. Cutine, suberine and wax biosynthesis pathway	91
2.5.5. Brassinosteroide biosynthesis pathway	92
2.5.6. Phytohormones profiling	92
2.5.7. PCA analysis and correlation	94
2.6. Conclusion	95
2.7. Refrences.....	96
3. Synthèse de l'article	101
CHAPITRE IV : DISCUSSION GÉNÉRALE	105
1. Les polyssacharides microalgaux comme biostimulant de la croissance, la réduction et l'assimilation de l'azote et et du profil métabolique	107
1.1. La biostimulation de la croissance	107
1.2. La stimulation de la réduction et l'assimilation de l'azote	108
1.3. L'induction de la synthèse des métabolites	109
2. Les polysaccharides induisent les voies biochimiques, métabolomiques, transcriptomiques et hormonale, dépendantes de la défense naturelle des plantes.....	110
2.1. Biochimiques et transcriptomiques.....	111
2.2. Analyses métabolomiques	111
2.3. Biosynthèse et interaction entres les phytohormones	113
CONCLUSION & PERSPECTIVES	114
1. Conclusion.....	114
2. Perspectives.....	117
RÉRÉRENCES	118
ANNEXE	142
A. Quantification de l'ARN	142

L'agriculture durable reste une nécessité primordiale pour maintenir la sécurité alimentaire pour les générations futures. Ces dernières décennies, l'intensification de l'agriculture a permis d'augmenter la productivité, mais a également eu des effets néfastes sur l'homme et l'environnement (Muller et al. 2017; Pingali 2012). Cette nocivité est aggravée par quatre principaux facteurs. Le premier est la croissance accrue de la population qui va passer de sept milliards en 2011 à neuf milliards d'ici 2 050 (Pathak et al. 2018; R. Singh et al. 2017) et qui exigera une augmentation de 60 % de la production agricole au cours des 30 prochaines années (Pathak et al. 2018; R. Singh et al. 2017; Chiaiese et al. 2018; Ronga et al. 2019; Alexandratos and Bruinsma 2012). Le deuxième est lié aux activités socio-économiques développées par cette population croissante, qui ont contribué à : (i) une réduction de la surface disponible pour la production de cultures vivrières ; (ii) une dégradation et une raréfaction des ressources en eau ; (iii) une accumulation de composés xénobiotiques dans les sols ; et (iv) une dégradation de la qualité et de la fertilité des sols (Pathak et al. 2018). Le troisième facteur est la conséquence du changement climatique qui menace la production agricole actuelle et future (Rosenzweig et al. 2014). Et finalement, l'utilisation large et excessive des produits chimiques dans l'agriculture comme promoteurs de la croissance et agents de protection des plantes (Dmytryk and Chojnacka 2018; Baweja, Kumar, and Kumar 2019; Pan, Jeevanandam, and Danquah 2019; Michalak et al. 2016; Win et al. 2018). Compte tenu des impacts négatifs de ces produits, les réglementations actuelles limitent l'utilisation des engrais minéraux et des produits chimiques en agriculture (Dmytryk and Chojnacka 2018; Pan, Jeevanandam, and Danquah 2019).

Par conséquent, maintenir des productivités agricoles élevées tout en assurant la durabilité du système agricole est un défi urgent (Muller et al. 2017; Steensland 2019). Pour relever ce défi, il est nécessaire d'adopter des pratiques et des solutions agricoles durables (Pathak et al. 2018; Dmytryk and Chojnacka 2018). Dans ce contexte, les chercheurs ont porté leur attention sur les produits biologiques tels que, les microalgues et les cyanobactéries, qui se présentent comme une ressource prometteuse pour l'amélioration et la protection des cultures en raison de leur potentiel, biostimulant et bioéliciteur (Pathak et al. 2018; R. Singh et al. 2017; Chiaiese et al. 2018; Dmytryk and Chojnacka 2018; Pan, Jeevanandam, and Danquah 2019; Górka et al. 2018).

Les microalgues présentent un ensemble de caractéristiques ayant une valeur unique pour répondre à ce scénario agricole difficile. Ils constituent un groupe très diversifié de micro-

organismes essentiellement photosynthétiques qui comprend des cyanobactéries (organismes procaryotes) et des organismes eucaryotes (par exemple, les algues vertes, les euglénoïdes et les diatomées) (Richmond and Hu 2013; Barsanti and Gualtieri 2005; Mata, Martins, and Caetano 2010) Les microalgues, offrent une alternative prometteuse pour le développement des biostimulants de la croissance et la protection des plantes, et contribuent à la réduction de notre dépendance aux engrais et pesticides chimiques (Prasanna et al. 2014; 2015). Selon la littérature, les métabolites d'algues peuvent jouer un rôle important dans: (i) la décontamination et la fertilisation des sols ; (ii) la protection des plantes contre les stress biotiques et abiotiques ; et (iii) le développement des plantes (Ronga et al. 2019; Górka et al. 2018). En outre, les microalgues et les cyanobactéries présentent des phytohormones, connues pour leur activité en tant que promoteurs de la croissance des plantes (Pan, Jeevanandam, and Danquah 2019; Han et al. 2018; Lu and Xu 2015).

Dans ce contexte vient cette thèse pour contribuer à l'étude de l'effet des microalgues sur la croissance et la tolérance des plantes de la tomate au stress biotique et abiotique, afin d'améliorer la production et la protection des plantes et aussi minimiser l'utilisation des produits chimiques.

Les travaux effectués durant cette thèse ont pour objectif principal d'évaluer l'efficacité des polysaccharides (PSs) microalgaux à stimuler la croissance des plantes de la tomate « *Solanum Lycopersicum L* », à induire la défense de la plante, et améliorer l'absorption et l'assimilation des nutriments. Et encore leur effet sur les voies; biochimiques, métabolomiques et transcriptomiques en relation avec la défense des plantes de la tomate.

L'ensemble des travaux sont synthétisés dans ce manuscrit qui est organisé en 3 parties :

Partie 1 : Est consacrée à l'étude de l'effet biostimulant des polysaccharides de trois microalgues, *A. platesis*, *D. salina* et *porphorydium sp* sur ; (i) la croissance des plantes, de la tomate en étudiant les paramètres agronomiques ; (ii) l'assimilation de l'azote via le dosage des activités de la nitrate réductase (NR) et de NAD-Glutamate Dehydrogenase (NAD-GDH) ; (iii) l'activité photosynthétique, par l'évaluation des pigments la chlorophylle a (Chla), la chlorophylle b (chl b) et les caroténoïdes ; et finalement (iv) la distribution des métabolites en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée de spectrométrie de masse (GC-MS).

Partie 2 : Est consacrée à une évaluation du potentiel bioéliciteur des PSs microalgues sur les mécanismes de la défense des plantes de tomate via ; (i) Une approche biochimiques, par l'étude des activités enzymatiques des protéines PR (Chitinase et 1,3-bêta-glucanase), PAL et Peroxydase (POX), ainsi que par le dosage des protéines, polyphénols et superoxyde d'hydrogène (H_2O_2) ; et (ii) Une approche ; métabolomiques, en étudiant les profils des métabolites induits on utilisant la GC-MS.

Partie 3 : Est focalisée sur l'étude des mécanismes de défense des plantes de la tomate, induits par les extraits polysaccharidiques. Cette étude est faite sur trois niveaux d'analyses ; (i) transcriptomique, par l'étude de l'expression des gènes dépendants de la défense à savoir, les gènes de la cascades MAPKs (MAPK 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7), les gènes PRs (PR1, Glucanase et Chitinase), le gène Phenylalanine ammonia lyase (PAL), le gène Lipoxygénase (Lox), les gènes des inhibiteurs de protéase (PI1 et PI2) ; (ii) l'analyses des voies de biosynthèses, LAM, BUFA, FAB, CSWB, BrB, FAE, aLAM, on utilisant GC-MS et Mytaboanalyst 5.0.

Ce travail entre dans le cadre d'un projet sous le thème « *le développement des biostimulants des plantes à partir des microalgues* ». Le projet est le fruit d'une collaboration entre la fondation MAScIR et le ministère de l'enseignement supérieur.



PARTIE I

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I



MIRCOALGUES

1. Microalgues

1.1. Biodiversité des microalgues

Les microalgues constituent un groupe de microorganismes très diversifiés (**Figure 1**). En général, elles sont catégorisées en deux groupes : les procaryotes à savoir les cyanobacteries (algues vert-bleu) et prochlorophyta, et les eucaryotes tels que Chlorophyta (algues vertes), Rhodophyta (algues rouges), Phaeophyta, Bacillariophyta (Diatomées), et Chrysophyta (Romano et al. 2017). Ces microorganismes sont capables de synthétiser les macromolécules organiques complexes (les lipides, les polysaccharides, les acides nucléiques, les protéines,...). Cette capacité est due à leur activité photoautotrophique en utilisant la lumière, le CO₂ et les nutriments inorganiques tels que le phosphore et l'azote (Idrees 2014). Le nombre des microalgues est estimé de 2.10⁵ à 8.10⁵ et leurs tailles varient entre quelques micromètres et quelques centaines de micromètres (Venkatesan, Manivasagan, and Kim 2015). Le spécimen individuel de la plupart de ces microorganismes est inobservable, mais lorsqu'ils produisent une large population ils deviennent visibles avec différentes couleurs : verte, rouge, brune ou vert-bleu (J. Singh and Saxena 2015). Elles contribuent à la moitié de l'activité photosynthétique globale (Andersen 1996).

Statistiquement la majorité des espèces microalgales décrites jusqu'à maintenant appartiennent aux groupes des algues vertes, des cyanophycées et des diatomées (J. Singh and Saxena 2015). Les microalgues croissent généralement dans les eaux douces et de mer ; ainsi on les trouve dans des écosystèmes extrêmes (extrêmophiles) ; les lacs et les mers salées ; les limites des zones photiques (200-300m) au-dessous de la surface de l'eau ; des sols riches en humus dans les déserts, les roches, etc...(J. Singh and Saxena 2015).

1.2. Culture des microalgues

La culture des microalgues est une alternative biotechnologique très prometteuse pour une industrie durable vu leur potentiel économique. Elles peuvent être cultivées par différentes méthodes et dans différentes conditions. Elles utilisent l'énergie lumineuse pour convertir le CO₂ et H₂O absorbés en matière organique (Biomasse) via l'activité photosynthétique (Ozkurt 2009). Pour leur croissance, elles ont besoin de l'azote et du phosphore. Elles nécessitent aussi d'autres éléments nutritifs ; les macroéléments Na, Mg, Ca, K et microéléments à savoir Mo, Mn, B, Co, Fe, Zn. En général, pendant le développement, la cellule microalgale passe par

quatre phases de la croissance : la phase de latence, la phase exponentielle, la phase stationnaire puis la phase de déclin.

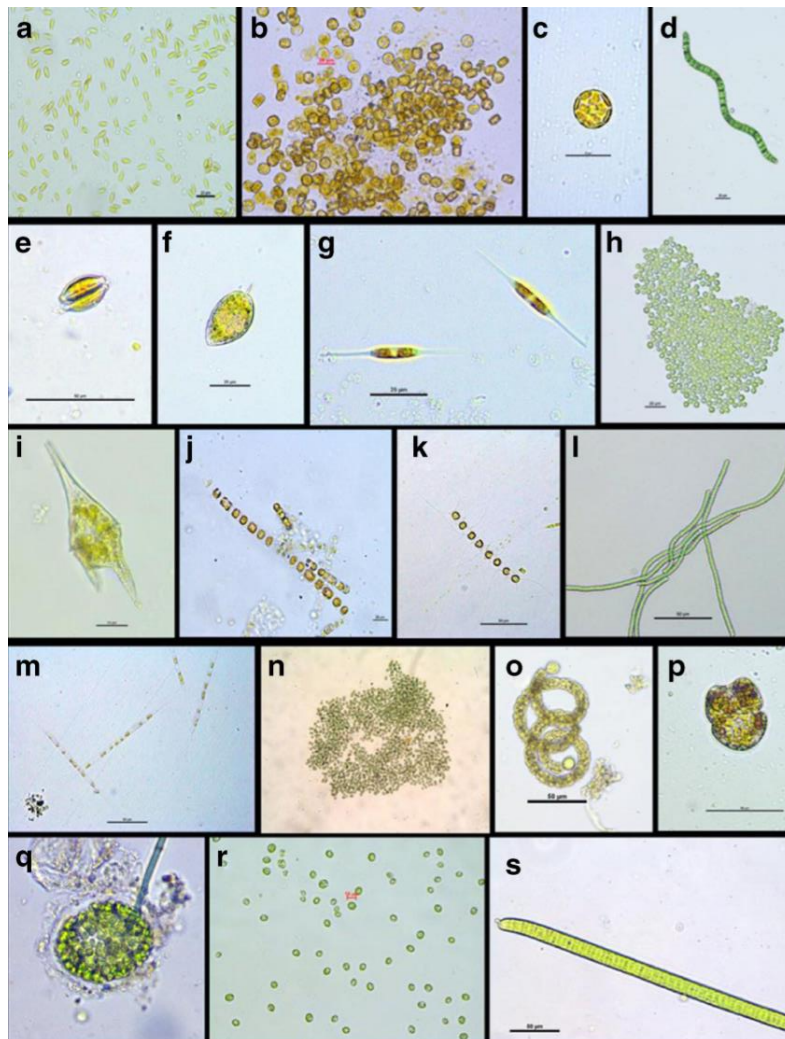


Figure 1 : Illustre de la diversité morphologique et de la taille des souches microalgales.

A. *Amphora* sp B. *Thalassiosira weissflogii* C. *Thalassiosira* sp D. *Arthrospira platensis* E. *Navicula* sp F. *Prorocentrum* sp G. *Nitzschia* sp H. *Microcystis* sp I. *Ceratium* sp J. *Skeletonema costatum* K. *Chaetoceros gracilis* L. *Spirulina subsalsa* M. *Rhizosolenia* sp N. *Microcystis aeruginosa* O. *Anabaena* sp P. *Aphanocapsa* sp Q. *Halosphaera* sp R. Green algae S. *Oscillatoria* sp (Sandeep et al. 2019).

1.2.1. Techniques d'isolement et de purification des microalgues

L'isolement et la purification d'une monoculture microalgale est suit plusieurs étapes :

- ✚ Échantillonnage : une technique d'échantillonnage appropriée, une saison d'échantillonnage, une évaluation de l'habitat et la conservation des échantillons sont des

facteurs essentiels pour la collecte de microalgues. Il est nécessaire d'enregistrer les facteurs abiotiques du site d'échantillonnage tels que la lumière, la température de l'eau, l'O₂ dissous et le CO₂, la concentration en nutriments, le pH et la salinité afin d'imiter ces conditions au laboratoire (Mutanda et al. 2011).

- ✚ Isolement d'une cellule unique : c'est le transfert d'une cellule microalgale à partir de l'échantillon vers le milieu de la culture stérile. Ce transfert est assuré par la micropipette ou le capillaire en verre sous une observation microscopique.
- ✚ Dilution en série : c'est la technique la plus utilisée pour l'isolement de la cellule microalgale. Le facteur de dilution est généralement constant à chaque étape, ce qui entraîne une progression géométrique de la concentration de manière logarithmique. Le succès de la technique dépend fortement de la précision d'une quantité mesurée de culture cellulaire pendant le transfert d'un milieu à un autre.
- ✚ Strie sur Plaque : dans l'intérêt de la purification et de l'identification, la technique « strie sur plaque » reste la plus courante pour l'isolement d'une souche microalgale pure à partir d'une mixture des microorganismes. Cette méthode nécessite la préparation de plaques de gélose aseptique suivie de l'introduction d'une boucle d'inoculation stérile dans l'échantillon liquide ou le pincement d'une colonie morphologiquement distincte de la surface de la membrane ultérieure avec un outil à épingler stérile. C'est la meilleure méthode pour isoler les cultures axéniques sans nécessiter de manipulation ni de modification de technique. Après incubation, les plaques de gélose incubées, offrant des conditions physiologiques optimales pour l'espèce / souche d'intérêt.
- ✚ Centrifugation/densité : la centrifugation applique une sédimentation par gravité à des organismes distincts en fonction de la taille des cellules. Cette technique est généralement appliquée pour séparer les gros organismes des cellules microalgales. La technique centrifuge à gradient de densité sépare les différentes espèces de microalgues en différentes bandes. Cette technique est principalement utilisée pour concentrer le nombre de cellules d'une souche de microalgues souhaitée à partir des échantillons concentrés. La vitesse et le temps de centrifugation varient en fonction des espèces de microalgues cibles.

 **Enrichissement de Milieu** : des cultures d'enrichissement utilisant une pression de sélection peuvent être utilisées pour obtenir l'isolement d'une seule cellule. Les substances d'enrichissement couramment utilisées comprennent des milieux nutritifs spécifiques, des extraits de sol, des nutriments comme le nitrate et le phosphate, et des métaux traces (Mutanda et al. 2011). L'ajustement du pH est une stratégie couramment adoptée pour obtenir des cultures exemptes de bactéries. Les habitats naturels peuvent être déficients en un ou plusieurs nutriments nécessaires à la croissance des microalgues. Dans la nature, les nutriments sont recyclés ou fournis par l'action physiologique d'autres organismes. L'échantillonnage réduit le recyclage des nutriments et peut ainsi provoquer la mort des microalgues. Les substances enrichissantes sont généralement ajoutées en quantités minimales à des stades séquentiels.

1.2.2. Facteurs influençant la croissance des microalgues

La culture des microalgues dépend de l'espèce, la disponibilité des nutriments (N, P, K,...), le pH, la température, la salinité, le carbone inorganique, l'oxygène, l'intensité lumineuse et le CO₂ (Mutanda et al. 2011).

1.2.2.1. Lumière

L'intensité lumineuse reste un facteur limitant majeur de la croissance des microalgues. La durée et l'intensité lumineuse affectent directement l'activité photosynthétique des microalgues et influencent leur composition chimique ainsi que le taux de la production (Krzemińska et al. 2014). La productivité de la biomasse et le taux de la croissance diminuent avec la diminution de la durée de l'éclairage (Jacob-Lopes et al. 2009). Une forte intensité endommage les récepteurs lumineux chloroplastiques, ce qui induit une photoinhibition et la réduction de la croissance (Lee 1999). En général 18h lumière/ 6h obscurité reste le photopériodisme le plus souhaitable par les microalgues.

1.2.2.2. Température

La température joue un rôle primordial dans les réactions photocatalytiques (Xing et al. 2013). Elle a aussi un effet sur le maintien de l'équilibre chimique des espèces, la solubilité des gaz ainsi que le pH (4). La température optimale de la croissance des microalgues varie entre 20 C° et 25 C° (Solimeno et al. 2015). La plupart des espèces se développent et tolèrent les températures entre 16 C°-35 C° (Bitog et al. 2011; Chisti 2007; S. P. Singh and Singh 2015). Les températures en-dessous de 16 C° diminuent le taux de la croissance cellulaire ; cependant

les températures au-delà de 35 C° sont létales pour certaines espèces (Bitog et al. 2011). En général, une augmentation de la température est accompagnée par une amélioration de l'activité photosynthétique et l'assimilation des nutriments.

1.2.2.3. pH

Le pH est un autre facteur important qui affecte la croissance des microalgues. Ces derniers ont des exigences différentes vis-à-vis du pH. La croissance de la plupart des espèces microalgales est favorable à des pH entre 8.2 et 8.7. Toutefois, elles peuvent aussi bien être cultivées à des pH qui varient entre 7 et 9 (Berberoglu, Pilon, and Melis 2008). Le pH du milieu de culture intervient dans la régulation de l'assimilation des nutriments essentiels à savoir le nitrate et le phosphate.

1.2.2.4. Salinité

La tolérance des espèces des microalgues et des cyanobactéries à la salinité varie considérablement. Cette variation de tolérance engendre deux groupes de microalgues ; le premier est hypotonique qui renferme les espèces d'eau douce qui peuvent tolérer des faibles concentrations en sels ; et le deuxième est hypertonique qui englobe les espèces marines, qui ont la capacité de tolérer les concentrations élevées de sels (P. Singh et al. 2015). Des salinités de l'ordre de 20 à 24 g L⁻¹ se sont avérées optimales pour la plupart des microalgues (Lavens and Sorgeloos 1996). Les microalgues peuvent être maintenues dans une large gamme de salinité, grâce à leurs capacités d'osmorégulation défensives inhérentes, telles que les parois cellulaires rigides, la régulation de l'absorption du sel, la synthèse de composés de faible poids moléculaire non chargés et par l'excrétion d'eau et de sels (Kirst 1990). L'inhibition de la photosynthèse et la croissance sont induites par des concentrations en sel qui dépassent le seuil supportable par les espèces. A des conditions extrêmes, une plasmolyse ou un éclatement cellulaire peut se produire (Fogg 2001; Kirst 1990).

1.2.2.5. Nutriments

Le besoin nutritionnel est variable selon les espèces microalgales, mais les exigences de base restent les mêmes pour toutes les espèces. L'azote, le phosphore et le carbone sont des macronutriments primordiaux des microalgues (CH_{1.7} O_{0.4} N_{0.15} P_{0.0094}) (Juneja, Ceballos, and Murthy 2013). Le silicium reste le majeur macronutriment pour certaines espèces marines surtout les diatomées. Les Micronutriments comme, Mo, K, Co, Fe, Mg, Mn, B, et Zn sont

exigés comme éléments de trace, jouant un impact primordial sur la croissance des microalgues qui est liée à leur influence sur diverses activités enzymatiques de la cellule (Hu, Zhang, and Sommerfeld 2006; Gardner-Dale, Bradley, and Guest 2017) carence en éléments nutritifs affecte considérablement le taux de croissance des microalgues et entraîne une faible production de la biomasse (Khozin-Goldberg and Cohen 2006; Ito et al. 2013). Par contre, l'apport en nutriments induit fortement la synthèse et l'accumulation des glucides et des lipides dans les cellules microalgales (Prathima Devi and Venkata Mohan 2012).

En plus de ces facteurs qui affectent la croissance des microalgues, il existe d'autres qui sont soit de nature abiotique (le changement de taux de dioxyde de carbone et de l'oxygène dans le milieu, le type de milieu de culture, la présence d'une substance chimique toxique dans la culture), soit de nature biotique (contaminant biologique) tel que les bactéries, les champignons, les virus, les protozoaires et/ou la présence d'autres souches microalgales. D'autres facteurs liés aux procès à savoir la concentration de la biomasse, l'intensité de l'agitation et la fréquence de la récolte de la biomasse ont également une influence sur les microalgues (Chisti 2008; 2007; Płaczek, Patyna, and Witczak 2017).

1.2.3. Systèmes de culture des microalgues

Les systèmes de culture des microalgues sont classifiés en deux catégories : les systèmes ouverts et les systèmes fermés ou photobioréacteurs (PBRs) (**Figure 2**).

1.2.3.1. Bassins et raceways

Ce type de systèmes de culture des microalgues comprend les étangs naturels (Lac, Lagunes, étang) et les étangs artificiels (étangs raceways). Le système de culture le plus connu est le raceway qui peut être ouvert ou fermé (Hase et al. 2000). Pour assurer la circulation de la culture microalgale, une bonne distribution des nutriments et aussi les rayons lumineux; des roues à aubes sont fournis pour assurer l'agitation. La scalabilité, la conception simple, la capacité de production élevée et le coût de maintenance et d'exploitation bas, restent les principaux avantages de culture des microalgues dans ces systèmes (Ugwu, Aoyagi, and Uchiyama 2008). Cependant, ce système a des inconvénients non négligeables à savoir la contamination par d'autres microalgues (Smith et al. 2005), l'infection par des virus destructifs des microalgues (Schroeder et al. 2003), l'attaque par des champignons (Gutman, Zarka, and Boussiba 2009), les pertes d'eau par évaporation, une faible diffusion du CO₂ atmosphérique, l'exigence d'une grande surface terrestre, la limitation à quelques souches, ainsi que les

conditions environnementales (Pluie, température et intensité lumineuse) (Ugwu, Aoyagi, and Uchiyama 2008). Les raceways fermés sont moins vulnérables à la contamination et aux perturbations environnementales que les bassins ouverts (Tableau 1).

1.2.3.2. Photobioréacteurs

Pour surmonter les problèmes associés aux systèmes ouverts, des systèmes photobioréacteurs (PBRs) (**Figure 2**) ont été développés. Les PBR sont constitués de verre / plexiglas / PVC transparent avec éclairage interne ou externe et dotés d'un échange de gaz contrôlé et d'un mélangeur / circulation de milieu. Les principaux facteurs limitant la croissance des microalgues tels que l'intensité lumineuse, la photopériode, la température, l'agitation, le changement de gaz et les pertes par évaporation sont contrôlables par certains PBRs. Ces derniers assurent une limitation de contamination par les bactéries ou d'autres contaminations et facilitent ainsi la culture d'algues axéniques des monocultures (P. Singh et al. 2015). La taille et le type de ces PBR peuvent varier selon le type de souche, l'utilisation finale de la biomasse et la scalabilité. De point de vue conception, ils sont très diversifiés. On trouve des bioréacteurs fermés à panneaux plats, les tubes verticaux / inclinés, les hélicoïdaux, les ponts aériens, les ponts aériens tubulaires horizontaux / serpentins, les colonnes à bulles, les membranes ou les PBR de type hybride (Qiang and Richmond 1996; Rubio et al. 1999; Ugwu, Aoyagi, and Uchiyama 2008).

Tableau 1 : Comparaison entre les systèmes ouverts et fermés pour la production de microalgues.

	Paramètres	Système ouvert	Système fermé
Impact environnemental	Superficie ; quantité en eau ; Pertes de CO ₂	élevé	Faible
Problèmes biologiques	Espèces algale	Restreinte	Flexible
	Contamination	Risque élevé	Faible risque
	Productivité de la biomasse	Faible	Elevée
	Composition en biomasse	Variable	Reproductible
Problèmes de processus	Control de la température	Non	Oui
	Dépendance au climat	élevé	Faible
	Besoin énergétique	Faible	Elevée
	Contrôle de processus	Non	Oui
	Utilisation de l'eau usée	Oui	Oui
	Nettoyage de réacteur	Non requis	Requis
Cout	Investisment, maintenance, récolte	Faible	Elevé

Adapté de Pires, J. C. (2015). (Pires 2015)



Figure 2 : Systèmes de la culture des microalgues.

A gauche les étangs raceway (système ouvert) (de <http://algae-energy.co.uk>) et à droit les photobioréacteurs (système fermé).

1.3. Bioproduits des microalgues et leurs applications

La biodiversité des microalgues, permettra de générer une vaste diversité de molécules bioactives exploitables dans différents applications industrielles. Ces microalgues contiennent les protéines, les lipides, les polysaccharides, les pigments, les phytohormones, les vitamines et les minéraux (**Tableau 2**) (Bhattacharya and Goswami 2020). Ainsi, elles peuvent produire des métabolites secondaires sous forme de molécules bioactives ayant des conformations complexes et une efficacité biologique.

L'exploitation des microalgues durant ces 20 dernières années est pointue sur quatre microalgues remarquables : a) *Spirulina* (*Arthrospira*), b) *Chlorella vulgaris*, c) *Dunaliella salina*, and d) *Haematococcus pluvialis*.

Tableau 2 : Principales espèces de microalgues, leur composition, leurs produits et leurs applications.

Espèces/groupe	Composition (% matière sèche)			Produits	Applications
	Protéin	Lipid	Carbohy drate		
<i>Arthrospira platensis</i>	46 –63	4 –9	8 –14	Phycocyanin, biomasse	Aliments naturels, cosmétiques
<i>Arthrospira maxima</i>	60 –71	6 –7	13 –16	Protéin, Vitamine B 12	Capsule antioxydante, système immunitaire
<i>Aphanizomenon flos – aquae</i>	62	3	23	Protéin, acide gras essentiel, β - carotène	Aliments santé, complément alimentaire,
<i>Chlorella spp.</i>	57	2	26	Biomasse, extrait Carbohydrate	Nutrition animale, complément alimentaire
<i>Chlorella vulgaris</i>	51 –58	14 –22	12 –17	Biomasse, extrait Carbohydrate	Aliments diététiques, compléments alimentaires, Nutrition animale
<i>Dunaliella salina</i>	57	6	32	Carotenoids, β - carotene	Aliments diététiques, compléments alimentaires, Nutrition animale
<i>Haematococcus pluvialis</i>	48	15	27	Carotenoids, astaxanthin	Aliments santé, produits pharmaceutiques, aliments pour animaux
<i>Odontella aurita</i>	39 –61	22 –38	14 –18	Acide gras, EPA	Pharmaceutiques, cosmétiques, anti-inflammatoires

<i>Porphyridium cruentum</i>	28 –39	9 –14	40 –57	Polysaccharides	Produits pharmaceutiques, cosmétiques
<i>Isochrysis galbana</i>	50 –56	12 –14	10 –17	Acide gras	Nutrition animale
<i>Phaedactylum tricomutum</i>	38 –42	18 –20	20 –25	Lipides, Acide gras	Nutrition, production de carburant
<i>Lyngbya majuscula</i>	25 –33	11 –13	28 –37	Immune modulateurs	Produits pharmaceutiques, nutrition
<i>Scenedesmas spp.</i>	47	1 –9	21 –52	Protéin	Aquaculture, nutrition humaine
<i>Schizochytrium sp.</i>	40 –46	22 –24	10 –14	DHA et EPA	Aliments, boissons et compléments alimentaires
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	28 –45	22 –38	25 –33	DHA	Développement du cerveau, santé et nutrition infantiles
<i>Nannochloropsis oculata</i>	63	11	15	Biomasse	Nourriture pour poissons marins larvaires et juvéniles
<i>Nannochloropsis sp</i>	42 –50	12 –16	28 –30	EPA	Complément alimentaire et produits pharmaceutiques

Cité et adapté par Bhattacharya, M., & Goswami, S. (2020)(Bhattacharya and Goswami 2020)

1.3.1. Lipides

Les microalgues contiennent une grande quantité de lipides, environ 30 à 50% de leur poids total. Ce pourcentage important, les rend plus attrayants pour produire du biodiesel et des compléments alimentaires diététiques (Yeh and Chang 2012). Les lipides sont catégorisés en deux groupes : ceux qui ont une chaîne avec 14-19 atomes de carbone, destinés à la production du biodiesel, et ceux qui dépassent 19 atomes de carbone qui sont les plus largement connus comme PUFA (polyunsaturated fatty acid) microalgues, par exemple : acide eicosapentaénoïque (EPA) et acide docosahexaénoïque (DHA). Ces $\omega-3$ lipides constituent des compléments alimentaires car ils sont considérés comme fondamentaux dans la nutrition humaine (Lai 2015). Les PUFAs et autres lipides des microalgues peuvent être utilisés dans l'industrie cosmétique ou comme des composés lubrifiants pour les polymères (Michalak et al. 2015).

1.3.2. Protéines

Les microalgues sont des sources pertinentes de protéines, de peptides et d'acides aminés. Certaines microalgues peuvent contenir plus de 50% de poids sec en termes de protéines (Khan, Shin, and Kim 2018). Les peptides de microalgues marines exercent plusieurs effets bénéfiques sur la santé, comme antihypertenseur, antitumoral, antimutagène, anti-tyrosinase, anticoagulant et antioxydant (Vo, Ryu, and Kim 2013; Rizzello et al. 2016). Les protéines des microalgues marines ont des effets bénéfiques sur le système cardiovasculaire, tels que les activités antihypertensives et inhibitrices de l'angiotensine (Sheih, Fang, and Wu 2009; Suetsuna and Chen 2001).

1.3.3. Polysaccharides

En général, le taux des polysaccharides chez les microalgues est de 50% par rapport à leur poids sec. Cette capacité est due à leur efficacité en photo-conversion et le stockage facile des glucides (Yen et al. 2013). Ces derniers sont composés principalement de glucose, d'amidon, de cellulose et de plusieurs types de polysaccharides (PSs) qui peuvent constituer une source de matière première pour la production de bioéthanol (Bhattacharya and Goswami 2020). Ces PSs microalgaux peuvent intervenir dans la régulation du système immunitaire et les réactions inflammatoires, et peuvent être exploités pour la production des produits cosmétiques, des ingrédients alimentaires et des agents thérapeutiques. En plus de PSs matriciels, les microalgues produisent des polysaccharides extracellulaires, particulièrement les exopolysaccharides sulfatés connu par leurs activités biologiques (Bhattacharya and Goswami 2020). Ces polysaccharides sulfatés sont hautement bioactifs, permettent la génération du matériel bioactif, et des produits nutritionnels et pharmaceutiques (Arad and Levy-Ontman 2013).

1.3.4. Pigments

Les microalgues renferment trois principaux pigments : les chlorophylles, les caroténoïdes et les phycobiliprotéines. La majorité de ces pigments représente des précurseurs de vitamines. Leurs applications sont très diversifiées ; de l'alimentation animale, aux additifs alimentaires, aux cosmétiques, aux produits pharmaceutiques, aux colorants alimentaires et aux biomatériaux (Poonam Sharma and Sharma 2017; Nobre et al. 2013). Les astaxanthines sont l'un des pigments, qui ont des activités antioxydantes potentielles telles que des effets anti-âge, anti-inflammatoires et immunitaires peuvent être utilisés pour les industries alimentaires et nutraceutiques (Cheng et al. 2016). Les phycobiliprotéines ont des propriétés potentielles qui les rendent primordiales dans le domaine de la santé, comme agent préventif de cancer, antiviral, antioxydant, antiallergique, anti-inflammatoire et neuro-défensive (C.-Y. Chen et al. 2013).

1.3.5. Vitamines

Les microalgues représentent une source inexplorée de presque toutes les vitamines connues : pro-vitamine A (α - et β -carotène, apocaroténoïdes), vitamine C (acide ascorbique), vitamine E (tocophérols et tocotriénols) et certaines vitamines du groupe B, telles que B1 (thiamine), B2 (riboflavine), B3 (niacine) et B12 (cobalamine) (Mus et al. 2013; Hosseini Tafreshi and Shariati 2009; Jäpelt and Jakobsen 2013) La vitamine D est également présente dans les microalgues.

Les vitamines sont essentielles à la santé, car elles sont des précurseurs d'importants cofacteurs enzymatiques nécessaires aux fonctions métaboliques essentielles. Les vitamines présentent également une forte activité antioxydant.

1.4. Applications des microalgues

Les microalgues ou leurs extraits montrent un grand potentiel dans divers domaines d'applications (**Figure 3**) à savoir : **(i)** Leur utilisation comme des biofertilisant/biostimulant ou bioéliciteur dans l'agriculture (Renuka et al. 2018); **(ii)** Pour l'environnement, les microalgues sont exploitées dans la phycoremédiation, pour la bioséquestration de CO₂ et le traitement des eaux usées (Basu et al. 2013); **(iii)** Grâce à leur efficacité photosynthétique, leur taux de croissance et leur quantité en lipide, les microalgues peuvent être des agents prometteurs pour la production de la bioénergie (Y. Y. Choi et al. 2019); **(iv)** Des études ont montrés que les microalgues ou leur dérivées sont valorisables comme produits alimentaires pour animaux et poissons, produits pharmaceutiques, cosmétiques, produits bioplastiques, fluorophores, et colorants alimentaires et textiles (Beetul et al. 2016); **(v)** De nos jours, l'intégration de la production de biocarburants et de bioproduits à base de microalgues avec le traitement des eaux usées présente des avantages majeurs pour la valorisation des mircoalgues dans le domaine de la bioraffinerie (Christenson and Sims 2011).

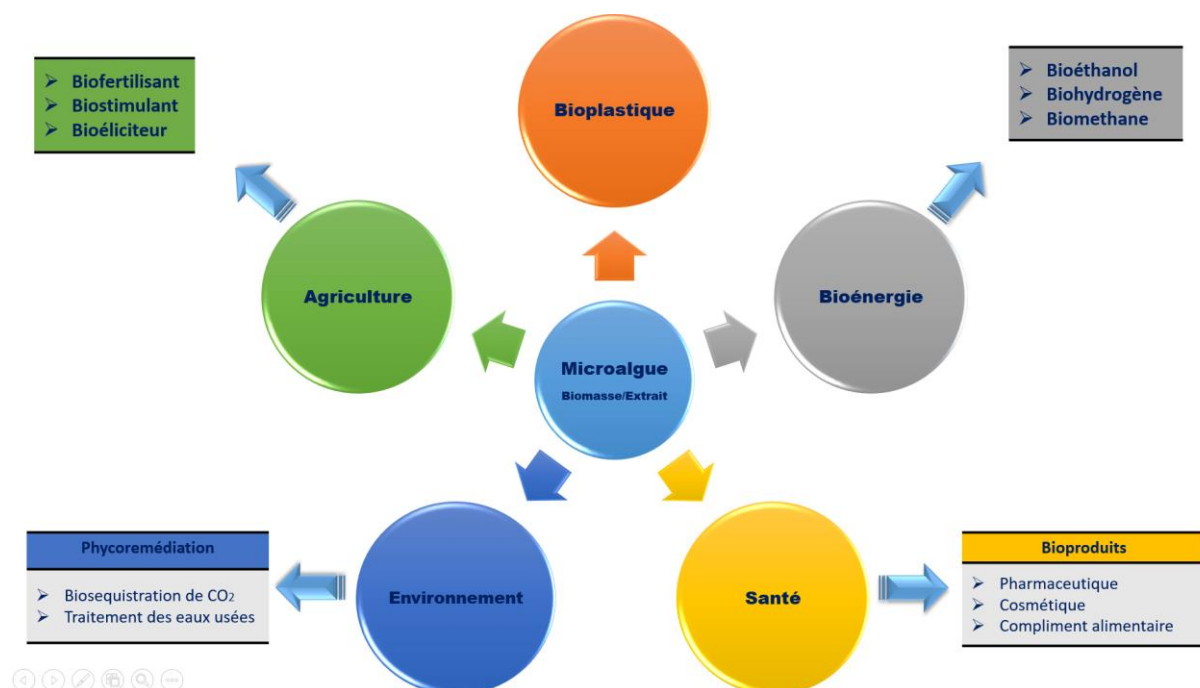


Figure 3 : Applications des biomasses et les extraits des microalgues.

Adapté de (Beetul et al. 2016; Renuka et al. 2018)

CHAPITRE II



BIOSTIMULANTS DES PLANTES

1. Biostimulants des plantes

1.1. Généralités

La productivité des plantes est dépendante de la régulation de leur croissance et leur développement et aussi l'atténuation des effets des stress, biotique et abiotique (Oleg I Yakhin et al. 2017). En plus des méthodes conventionnelles, les biostimulants sont intégrés dans le système agricole afin d'optimiser le potentiel de rendement et de productivité des plantes (Oleg I Yakhin et al. 2017). Cette nouvelle approche, des biostimulants offrent un potentiel indirect qui permet de réguler et modifier les processus physiologiques des plantes dont le but est de stimuler la croissance et induire la tolérance aux stress afin d'augmenter le rendement (Oleg I Yakhin et al. 2017).

Le développement de la science du « Biostimulant des plantes » a vu une progression scientifique, commencée par un concept général dans lequel Filatov 1944 (VLADIMIR P Filatov 1944) et 1951a (V P Filatov 1951b) et b (V P Filatov 1951a) a considéré les biostimulants comme des « Stimulants biogéniques ». Selon Filatov, ces derniers représentent des matériaux biologiques dérivés de divers organismes, y compris des plantes, qui ont été exposés à des facteurs de stress et qui pourraient affecter les processus métaboliques et énergétiques chez les humains, les animaux et les plantes. Après quelques années, Blagoveshchensky (1956) (Blagoveshchensky 1956) a spécifié l'effet des biostimulants biogènes comme des acides organiques qui sont capables d'améliorer les activités enzymatiques chez les plantes, cité par (Oleg I Yakhin et al. 2017; Herve 1994) qui a proposé que un biostimulant doit être fonctionnel à des faibles doses, être respectueux de l'environnement et avoir un potentiel reproductible sur les plantes agricoles.

En 2012 EBIC « European Biostimulants Industry Council » a constaté que les biostimulants, « Contiennent des substances et / ou des micro-organismes dont la fonction, lorsqu'ils sont appliqués aux plantes ou à la rhizosphère, est de stimuler les processus naturels pour améliorer / favoriser l'absorption des nutriments, l'efficacité des nutriments, la tolérance au stress abiotique et la qualité des cultures. Les biostimulants n'ont pas d'action directe contre les ravageurs, et ne rentrent donc pas dans le cadre réglementaire des pesticides ». Trois ans après, (du Jardin 2015) a défini les biostimulants comme « Toute substance ou micro-organisme appliqué aux plantes dans le but d'améliorer l'efficacité nutritionnelle, la tolérance au stress abiotique et / ou les caractéristiques de qualité des cultures, quelle que soit sa teneur en

nutriments. Par extension, les biostimulants végétaux désignent également des produits commerciaux contenant des mélanges de telles substances et / ou micro-organismes. ». En fin, en (O I Yakhin, Lubyantsev, and Yakhin 2016) à considérer les biostimulants ; «Produits principalement à base de matières premières naturelles, utilisés dans des petites doses pour la modification des processus physiologiques et biochimiques des plantes dans le but de réaliser plus complètement le potentiel génétique de leur productivité en raison des changements de statut hormonal, l'activation des processus métaboliques, l'augmentation de l'efficacité de la nutrition, la stimulation de la croissance, du développement et renforcement de la capacité à résister aux effets négatifs de divers facteurs de stress».

Classification

La classification des catégories des biostimulants est basée sur la formulation d'une ou plusieurs composantes et elles peuvent classées en fonction de l'origine ou le mode d'action de l'ingrédient actif (Basak 2008).

Mode d'action

À l'heure actuelle, étant donné la difficulté à déterminer un « mode d'action » pour un produit complexe à plusieurs composants tels qu'un biostimulant.

1.2. Biostimulant de la croissance des plantes

De nouvelles approches, telles que l'application des biostimulants à l'agriculture, ont été proposées non seulement pour améliorer la productivité et la qualité des cultures et des produits dérivés des cultures, mais aussi pour accroître la durabilité de la production agricole, en évitant une nouvelle dégradation de l'environnement (par exemple, eutrophisation, infertilité des sols et perte de biodiversité) (Calvo, Nelson, and Kloepper 2014; Garcia-Gonzalez and Sommerfeld 2016).

Wozniak, E., et al 2020 (Wozniak et al. 2020) ont fait une synthèse de l'impact de plus de 80 biostimulants de différentes catégories « extraits d'algues, autres extraits de plantes, acides humiques et fulviques, acides aminés et de protéines hydrolysées, mélanges de composés synthétiques et naturels, et des phosphites à une variété de produits microbiens vivants et de métabolites microbiens » sur 60 plants dans leur revue “Biostimulant Mode of Action : Impact of Biostimulant on Whole-Plant Level”. Ils ont constaté que malgré les différentes compositions chimiques des biostimulants évalués, ils génèrent des réponses similaires sur un

large éventail de plantes, contribuant à améliorer la germination, la croissance des pousses et des racines, la floraison et la nouaison, et la production des cultures mesurée par un rendement accru et amélioré (**Figure 4**). Ces effets positifs des biostimulants sur la croissance et le développement d'une plante sont étayés par des preuves que les biostimulants améliorent les processus universels d'absorption et d'utilisation des nutriments, et améliorent les performances des plantes leur permettant de surmonter les divers stress abiotique et biotique (Wozniak et al. 2020).

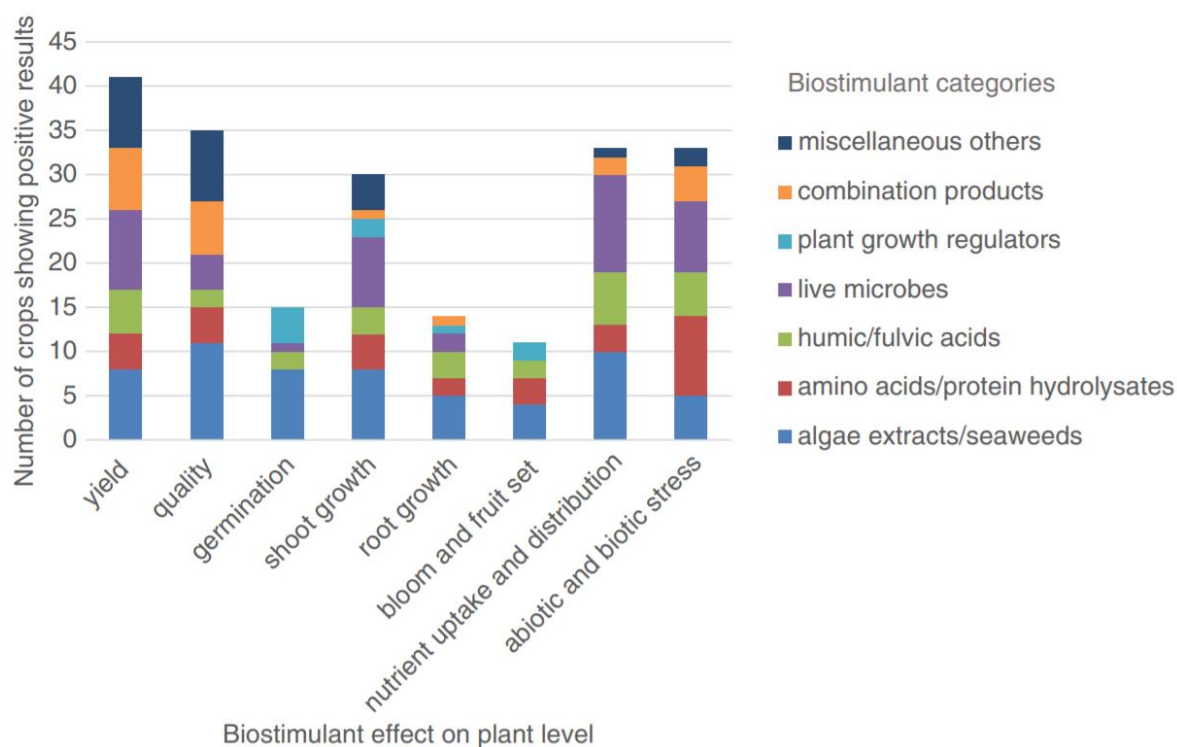


Figure 4 : Nombre de cultures montrant une réponse positive à l'application de biostimulant

(Wozniak et al. 2020).

On a signalé que sept grandes catégories de biostimulants augmentaient le rendement, la qualité, la germination, la croissance des pousses, la croissance des racines et la floraison et la nouaison, l'absorption et la distribution des nutriments, et améliorer les performances des cultures en cas de stress abiotique et biotique (Wozniak et al. 2020).

Diverses études ont montré que les biomasses et les extraits des microalgues sont capables de contribuer à une production agricole durable et saine (Navarro-López et al. 2020; Calvo, Nelson, and Kloepper 2014; Garcia-Gonzalez and Sommerfeld 2016; Rachidi et al. 2020; Mutale-joan et al. 2020). Les différents extraits de *Scenedesmus* ont un potentiel biostimulant sur l'indice de germination des graines de *Nasturtium officinale*, l'activité de l'auxine chez le haricot mungo «*Vigna radiata L.*» et le concombre «*Cucumis sativus* », et l'activité de

cytokinine chez le concombre (Navarro-López et al. 2020). Ils peuvent améliorer la germination des graines, améliorer la croissance des plantes, le rendement, la nouaison et la production de fruits, ainsi que la durée de conservation après la récolte (Calvo, Nelson, and Kloepper 2014; Navarro-López et al. 2020). L'étude menée par (Mutale-joan et al. 2020) a montré que les extraits bruts obtenus à partir de microalgues et de cyanobactéries ont induit un effet biostimulant sur la croissance des plants de tomates, la teneur en chlorophylle, l'absorption des nutriments et le profil des métabolites. L'application des extraits polysaccharidiques d'une cyanobactérie et deux microalgues (*A. platensis*, *D. salina* et *Porphyridium sp*) sur les plantes de tomates, a amélioré le nombre de nœuds, le poids sec, la longueur des pousses, la teneur en caroténoïdes, de chlorophylle et de protéines, et des activités de nitrate réductase et NAD-glutamate déshydrogénase dans les feuilles (Rachidi et al. 2020).

CHAPITRE III



BIOSTIMULATION/BIOELICITATION DE LA DÉFENSE DES PLANTES

1. Bioélicitation de la défense des plantes

1.1. Mécanismes de défense des plantes

Il existe deux systèmes de défense contre les pathogènes chez les plantes : le premier système de défense auquel le pathogène sera confronté est un système constitutif basé sur les barrières structurales et chimiques naturellement présentes au sein de la plante (Nobécourt 1946).

Le second est un système de défense inductible basé sur l'activation des mécanismes de défense par les plantes lors de la détection d'une attaque pathogène (Schwessinger and Zipfel 2008; Nicaise, Roux, and Zipfel 2009). Dans ce système, on va élaborer que les systèmes de défense induits.

1.1.1. Systèmes de défense induits par la plante

1.1.1.1. Reconnaissance de l'agent pathogène via les éliciteurs M/P/DAMPs

La reconnaissance des éliciteurs par les cellules hôtes est une étape importante dans l'activation des mécanismes de défense (**Figure 5**).

Chez les végétaux les éliciteurs sont subdivisés en deux catégories. Ceux qui proviennent de l'agent pathogène, les éliciteurs exogènes et qui sont connus sous le nom de Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP)(Chinchilla et al. 2006; Gust et al. 2007; Nicaise, Roux, and Zipfel 2009). Ces molécules sont conservées d'une espèce pathogène à l'autre (Jones and Dangl 2006). Ils sont également spécifiques à une classe de pathogènes (bactéries, champignons), induisant ainsi une différenciation des pathogènes chez les plantes. Les molécules des parois des champignons, comme la chitine agissent comme des éliciteurs (Zipfel and Felix 2005; Bittel and Robatzek 2007). La flagelline (flg22), le peptidoglycane (PGN), des protéines telles que le facteur d'élongation EF-TU ou le lipopolysaccharide (LPS) sont les PAMP bactériennes les plus détectées par les plantes (Mishra, Sharma, and Misra 2012)(Millet et al. 2010). Ces molécules constitutives peuvent aussi exister chez les organismes bénéfiques, comme les champignons mycorhiziens ou les Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (Y. Y. Song et al. 2010; Mauch-Mani et al. 2017; Stringlis et al. 2018). Toutes ces molécules peuvent ensuite être spécifiées sous le terme plus général de MAMP (Microbe-Associated Molecular Pattern), car MAMP désigne des molécules issues de micro-organismes pathogènes ou bénéfiques (Postel and Kemmerling 2009).

Les éliciteurs endogènes ou Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs), sont des molécules libérées après la lésion tissulaire de la plante, provoquée par un stress biotique ou abiotique (H. W. Choi and Klessig 2016). L'hydrolyse enzymatique de la pectine, le polymère constituant de la paroi des plantes par le pathogène, des fragments de polysaccharides (cellodextrines) ou des oligogalacturonides (Ferrari et al. 2013; Benedetti et al. 2015) sont libérés et par la suite reconnus par des récepteurs spécifiques.

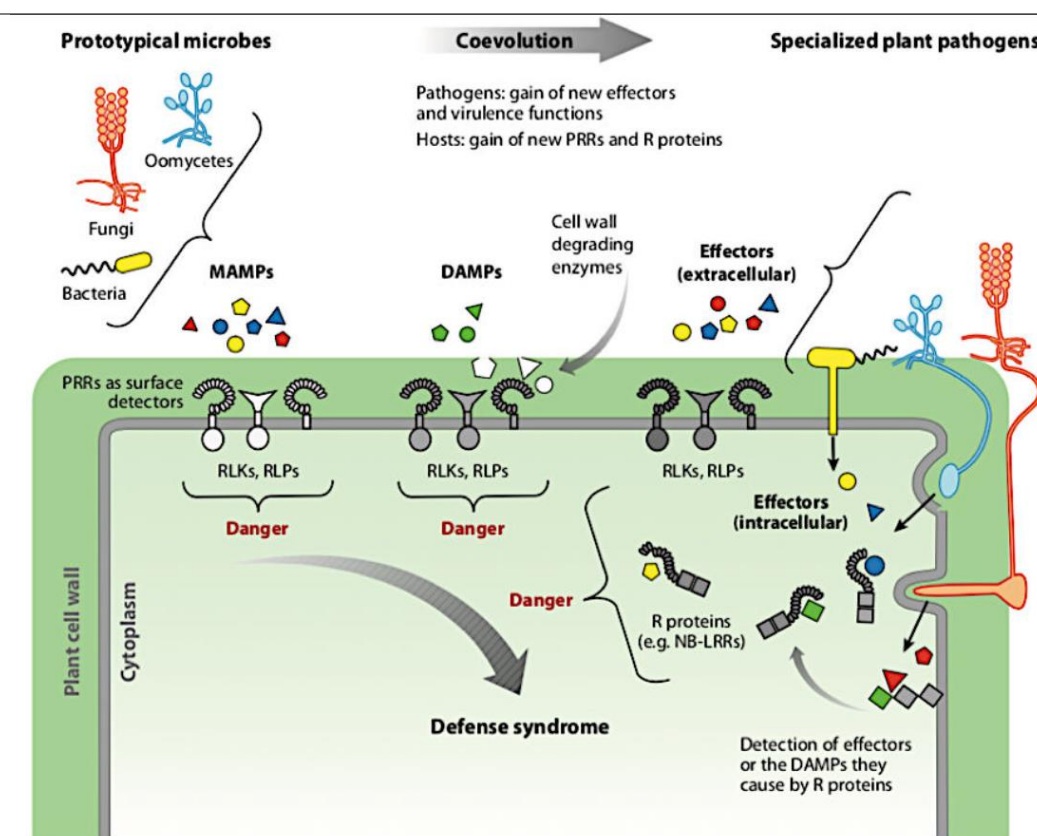


Figure 5 : Mécanismes de reconnaissance d'une attaque par un pathogène chez la plante.
(Boller and Felix 2009).

Les Récepteurs de reconnaissance de motifs (PRRs, acronyme de Pattern Recognizing Receptors), sont les récepteurs protéique transmembranaires qui assurant la reconnaissance des éliciteurs (Gómez-Gómez 2004; Monaghan and Zipfel 2012; Newman et al. 2013; De Lorenzo et al. 2018). La classification des PRRs chez les plantes est basée sur leur localisation cellulaire, leur domaine ligand, et leur fonction. Les récepteurs kinases (RLKs) possèdent un domaine extracellulaire *N*-terminal (ils peuvent être constitués d'un domaine lectine qui se lie à certains carbohydrates, d'une répétition de motifs leucine (LRRs) ou de motifs lysine (LysM) ou de domaine kinases associés à la paroi (Tör, Lotze, and Holton 2009) dont le rôle est de détecter et d'interagir avec l'éliciteur et d'un domaine transmembranaire couplé à un domaine kinase cytoplasmique qui assurent la transduction du signal à l'intérieur de la cellule (Macho and Zipfel

2014). Les récepteurs RLPs sont caractérisés par un domaine extracellulaire LRR et d'une ancre membranaire Cterminale (Tör, Lotze, and Holton 2009) sans domaine kinase intracellulaire. La transduction de signal pour les RLPs est assurée par leur fonctionnement en association avec les RLKs (Zipfel 2014). Pour être reconnu, les ligands doivent interagir avec leur récepteur par le biais d'interactions non covalentes *via* des ponts hydrogène ou des interactions hydrophobes (Hohmann, Lau, and Hothorn 2017). L'interaction entre un ligand et son récepteur peut aboutir à l'activation du récepteur par phosphorylation du domaine kinase ou à la formation d'un complexe avec un corécepteur (Couto and Zipfel 2016).

Par exemple, la flg22 (Flagelline 22) est l'élévateur le plus connu et le plus utilisé pour étudier les mécanismes de défense des plantes. C'est un peptide de 22 acides aminés localisé au niveau de la région N-terminale du flagelle (Felix et al. 1999; Felix and Boller 2003). *Solanum lycopersicum*, *Nicotiana benthamiana* et *Arabidopsis thaliana* reconnaissent le motif flg22 en impliquant les récepteurs RLK FLS2/BAK1/BIR1 et le complexe protéique G afin d'activer la défense (**Figure 6**) (Asai et al. 2002; Schwessinger and Zipfel 2008; Chinchilla et al. 2006).

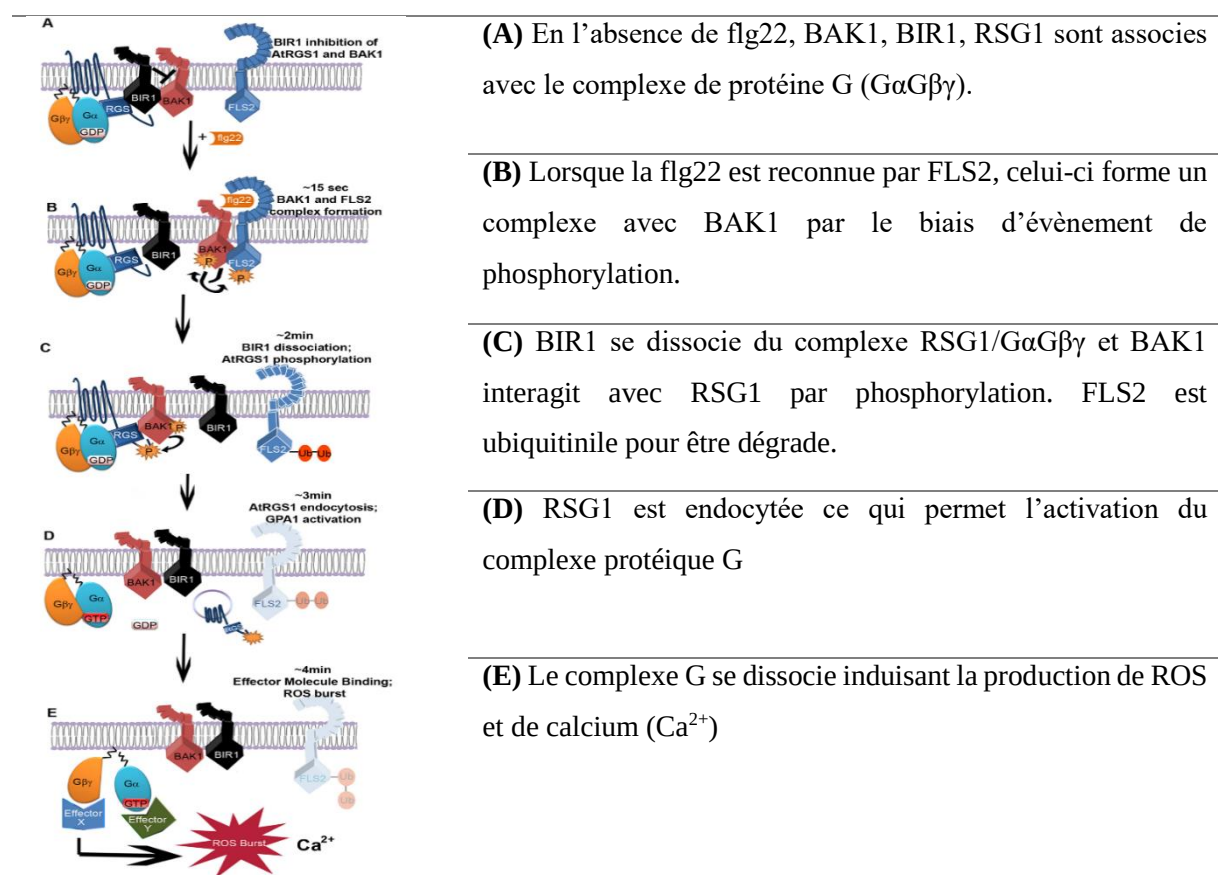


Figure 6 : Mécanismes de reconnaissance de la Flagelline 22 impliquant les récepteurs RLK FLS2/BAK1/BIR1 et le complexe protéique G.

(Tunc-Ozdemir and Jones 2017).

La première couche de l'immunité induite, appelée immunité déclenchée par des motifs PTI (PAMP-triggered Immunity), est activée par la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) ou des motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP) par les récepteurs de reconnaissance des motifs (PRR). Plusieurs événements de signalisation PTI se produisent, tels que l'activation des cascades de kinases de protéines activées par des agents mitogènes (MAPK), un afflux de Ca^{2+} dans le cytosol et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Des composés antimicrobiens sont produits et les gènes de défense sont activés. Cependant, pour supprimer la PTI, les agents pathogènes déploient des effecteurs. Lorsqu'ils sont reconnus par des récepteurs contenant des nucléotides (NB) et des leucine-rich-repeat (LRR) (NLRs), la deuxième couche immunitaire, appelée immunité déclenchée par des effecteurs, ETI (Effectors-triggered Immunity) prend place. Les NLR perçoivent directement ou indirectement les effecteurs pathogènes, entraînant un changement de conformation qui, associé à plusieurs événements de signalisation intracellulaire, déclenche finalement la réponse hypersensible (HR) ou d'autres réponses de défense. De manière surprenante, les études les plus récentes ont rapporté que la PTI et l'ETI sont mutuellement liées et potentialisent ensemble la réponse immunitaire (indiqué par des flèches rouges) (**Figure 7**) (Nguyen et al. 2021).

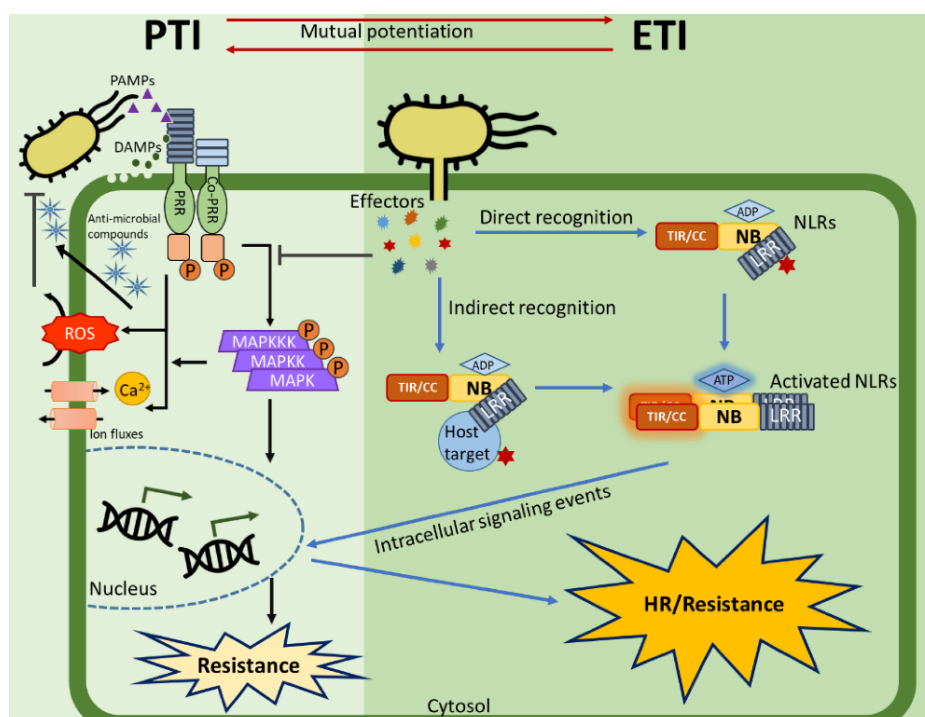


Figure 7 : Vue schématique de l'immunité déclenchée par des motifs (PTI) et de l'immunité déclenchée par des effecteurs (ETI) chez les plantes.

Nguyen, Q. M., et al (2021)(Nguyen et al. 2021).

1.1.1.2. Immunité déclenchée par des motifs (PTI)

1.1.1.2.1. Signalisation par les complexes de signalisation

L'activation de la résistance basale (PTI) nécessite que des signaux soient générés, transportés et traduits afin d'activer les mécanismes de défense. Dès les premières heures de l'infection, l'interaction éliciteur/PRRs déclenche l'activation de voies signalétiques qui convergent vers l'induction de gènes de défense au travers de l'émission d'un signal. La transmission de ce signal, générée en amont par les PRRs, implique plusieurs acteurs cellulaires dont le rôle est d'amplifier cette signalisation. Les événements biochimiques observés dans les premières minutes de l'interaction PRRs/éliciteurs incluent différents acteurs cellulaires à savoir :

❖ *Modification des flux ioniques et activation des MAP-Kinases*

La modification des flux ioniques est l'une des premières modifications intracellulaires mise en place par la plante en réponse à une attaque pathogène. La régulation de ces flux est contrôlée par des enzymes membranaires de type Ca^{2+} ATPase, H^{+} ATPase et des canaux ioniques (Blumwald, Aharon, and Lam 1998) qui assurent le maintien du gradient électrochimique cellulaire nécessaire au transport transmembranaire des solutés. Les principales fluctuations observées en réponse à un éliciteur sont un influx d'ions calcium (Ca^{2+}) engendré par l'activation des canaux calciques, un influx de protons hydrogène (H^{+}) et un efflux d'ions potassium (K^{+}), chlorure (Cl^{-}) et sodium (Na^{+}) (Mishra, Sharma, and Misra 2012). La perturbation de ces flux ioniques engendre des phénomènes biophysiques (hyperpolarisation/dépolarisation de la membrane plasmique) (Blumwald, Aharon, and Lam 1998) changement de pH intra/extracellulaire) dont l'amplitude et la durée varient en fonction de l'éliciteur. Les ions Ca^{2+} jouent un rôle prépondérant de messenger secondaire pénétrant dans les compartiments cellulaires (Mishra, Sharma, and Misra 2012; Toyota et al. 2018) et en activant un réseau protéique forme d'un ensemble de protéines kinases appelées Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) (P. He, Shan, and Sheen 2007). Les MAPKs forment un ensemble de 3 kinases constituées d'une MAPKK kinase (MAPKKK), d'une MAPK kinase (MAPKK) et d'une MAPK qui agissent en cascade par phosphorylations/déphosphorylations. Les MAPKKKs sont activées par phosphorylation des motifs serine/thréonine en réponse à un stimulus extracellulaire. Leur activation engendre la phosphorylation des MAPKKs qui seront à leur tour activées et stimuleront l'activation des MAPKs selon le même processus de phosphorylation sur les résidus thréonine et tyrosine (Cargnello and Roux 2011). Une fois activées, les MAPKs phosphorylées,

vont-elles mêmes activer des facteurs de transcription de type WRKY et la phosphorylation de nombreuses protéines (Garcia-Brugger et al. 2006).

Parallèlement à ces événements précoces, l'interaction PRRs/éliciteurs induit également la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

❖ *Production d'espèces réactives de l'oxygène*

La production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) constitue une réponse immédiate et générale à différents types de stress. Les ROS sont des sous-produits du métabolisme synthétisés dans plusieurs compartiments cellulaires (chloroplastes, mitochondries, peroxysomes, apoplaste) et dont les formes majoritaires sont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les anions superoxydes (O_2^-), les anions hydroxyles (HO^-) et l'oxygène singulet ($1O_2$). Leur synthèse est induite lors d'interactions plante-pathogène mais également lors d'interactions avec des agents symbiotiques (Nanda et al. 2010) et en réponse à des stress abiotiques (Camejo, Guzmán-Cedeño, and Moreno 2016). Dans les minutes qui suivent la reconnaissance d'un éliciteur par les PRRs, les ROS sont produits par des NADPH oxydases membranaires RBOHD (Respiratory Burst Oxidase homologous) qui peuvent être activées par les complexes intracellulaires kinases des PRRs tels que BIK1 *via* phosphorylation ou par des protéines kinases dépendantes du calcium (CPKs) ou par les ions Ca^{2+} qui viennent interagir avec les motifs EF localisés au niveau de la région N-terminale des RBOHD (**Figure 8**) (Kadota, Shirasu, and Zipfel 2015; Qi et al. 2017). En plus des RBOHD, d'autres protéines apoplastiques telles les peroxydases participent plus tardivement à la synthèse de ROS tels que H_2O_2 . Les ROS sont impliqués dans divers mécanismes de défense tels que la synthèse de composés antimicrobiens (Stulemeijer and Joosten 2008; Mishra, Sharma, and Misra 2012) le remodelage pariétal en oxydant et en précipitant les extensines (Rashid 2016; Castilleux et al. 2018) dans le but de bloquer l'entrée d'organismes pathogènes. Ils assurent également un rôle signalétique nécessaire à l'expression de certains gènes de défense et à l'ouverture/fermeture des stomates (Pallavi Sharma et al. 2012; Kadota, Shirasu, and Zipfel 2015). Outre leur implication lors de la PTI, les ROS sont également impliqués dans des mécanismes de défense plus intenses mis en place par la plante lors de la résistance déclenchée (ETI). Parmi ces mécanismes, on peut citer la réponse hypersensible (HR) qui est l'un des mécanismes les plus visibles et les plus efficaces contre une infection pathogène de type biotrophe en permettant l'isolement spatial du pathogène. Cet isolement est rendu possible par le biais d'une importante production de ROS qui induit la mort programmée des cellules jouxtant le site d'infection empêchant ainsi la propagation de l'organisme biotrophe.

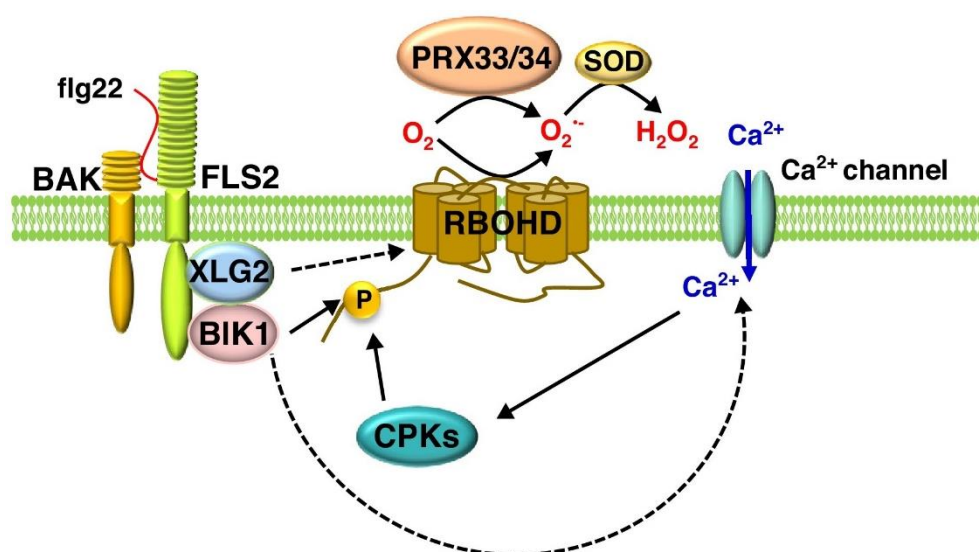


Figure 8 : Mécanisme de production d'espèces réactives de l'oxygène.

(Kadota, Shirasu, and Zipfel 2015; Qi et al. 2017).

❖ Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est synthétisé par les cellules végétales, pendant lorsqu'ils sont confrontés avec l'agent pathogène (Romero - Puertas et al. 2004). NAD(P)H nitrate réductase (NR), c' est l'enzyme cytosolique qui assure la production de NO, en réduisant le nitrate en NO (Koen et al. 2013). Aussi l'oxyde nitrique synthase like (NOS-I) est l'une des principales sources de production de NO. Le mode d'action du NO reste encore à expliquer. Des interactions entre les voies de signalisation impliquant des MAPKs, Ca^{2+} et les ROS (Romero - Puertas et al. 2004). NO pouvait à la fois stimuler la production des ROSs et activer les canaux calciques intracellulaires dont le fonctionnement contribue à une augmentation de Ca^{2+} (Lamotte et al. 2004). NO est une molécule majeure dans la résistance contre les organismes pathogènes tels que *Pseudomonas syringae* DC3000 ou *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseoliocola* (Zeidler et al. 2004; Mur et al. 2019). Cette augmentation de résistance peut être expliquée par le fait que NO soit impliqué dans l'expression de gènes de défense, participe aux voies de biosynthèse d'hormones, la production de phytoalexines ainsi la production de métabolites antimicrobiens pour éviter l'infection (**Figure 9**) (Molina-Moya et al. 2019; Romero-Puertas et al. 2004; Koen et al. 2013; Wendehenne, Durner, and Klessig 2004)

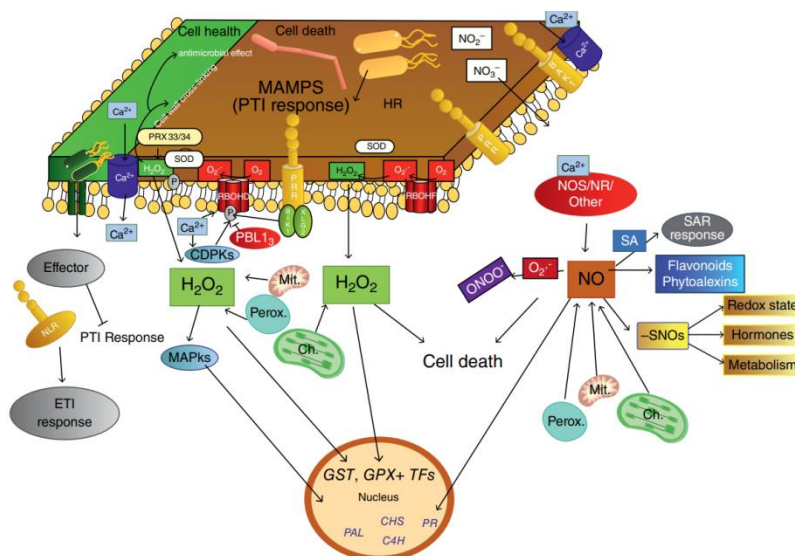


Figure 9 : Implication du monoxyde d'azote(NO) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans les mécanismes de défenses à la suite d'une attaque par un agent pathogène.

Les flèches bleues indiquent les voies dans lesquelles est impliqué le NO. CHS, Chalcone synthase; C_4H , acide cinnamique 4 hydroxylase; Ca^{2+} , apport de calcium; GPX, glutathion peroxydase; H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène; HR, réponse hypersensible; JA, acide jasmonique; MAPK, protéine cinétique activée par les mitogènes; NO, oxyde nitrique; NOS, oxyde nitrique synthase; ONOO⁻, peroxydinitrite; PAL, phenylalanine ammoniac lyase; SA, acide salicylique; SAR, résistance systémique acquise; SOD, superoxyde dismutase. Molina-Moya, E., et al (Molina - Moya et al. 2019).

1.1.1.2.2. Transmission du signal : implication des phytohormones

Le signal généré par les événements précoces, précédemment décrits, est ensuite relayé par la synthèse d'hormone(s) de défense. Une infection pathogène chez les plantes se traduit par une modification des balances hormonales cellulaires. La plante synthétise plusieurs phytohormones parmi lesquelles l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET), sont connues pour leur implication dans la défense contre différents pathogènes. Ces molécules capables de diffuser de cellule en cellule permettent d'induire l'expression de gènes associés à la résistance aux bactéries pathogènes (Oliver and Ipcho 2004). Les plantes peuvent activer des voies de défenses distinctes en modulant leurs balances hormonales selon le mode trophique de l'organisme pathogène. Typiquement SA semble impliqué dans la résistance contre les pathogènes biotrophes (Schulze-Lefert and Panstruga 2003).

JA semble alors privilégié dans la résistance contre les pathogènes nécrotrophes (Robert-Seilanianz, Grant, and Jones 2011). Il est intéressant de noter que les deux voies activées par les

hormones JA et SA sont très souvent antagonistes (**Figure 10**). La signalisation générée par ces hormones aboutit à la production de composés antimicrobiens et favorise des renforcements pariétaux par remodelage de la paroi.

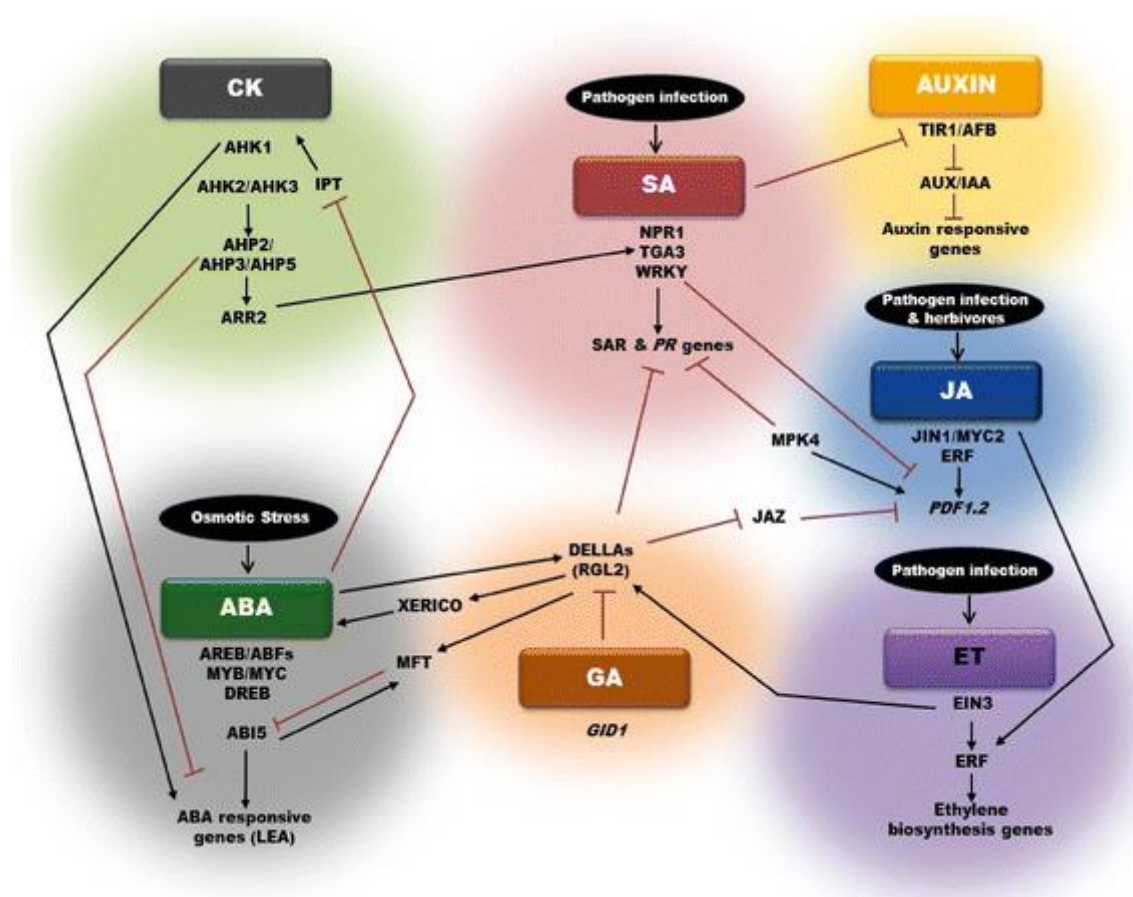


Figure 10 : Aperçu des réseaux de signalisation des hormones végétales et de leur interaction dans les réponses au stress.

ABA, SA, JA et ET sont des acteurs majeurs de la réponse au stress, ABA régulant principalement les stress osmotiques. SA, JA et ET contrôlent les réponses aux stress biotiques. Les voies de signalisation de l'ABA et de l'AG interagissent, les DELLA servant de point d'intersection, pour influencer l'équilibre entre la dormance et la germination des graines. Les voies SA et JA sont régulées de manière antagoniste par plusieurs facteurs de transcription. La diaphonie JA-ET est synergique. Les auxines, les AG et les CK participent aux réponses aux stress biotiques via la voie de signalisation du SA. Les CKs interagissent également avec l'ABA et fonctionnent dans les réponses aux stress de la sécheresse et de la salinité. Les flèches représentent une régulation positive (accumulation de transcrits, de protéines ou d'hormones), et les flèches bloquées représentent une régulation négative. Verma, V., et al (2016) (Verma, Ravindran, and Kumar 2016).

❖ *L'acide salicylique*

L'acide salicylique (SA) dérive de la phenylalanine *via* l'action de la phenylalanine ammonia lyase (PAL) (Dixon et al. 2002). En général, la réponse de la défense médiée par l'AS joue un rôle central dans la résistance acquise locale (LAR) et systémique (SAR) contre les pathogènes biotrophes, tels que *Pseudomonas syringae* (Verma, Ravindran, and Kumar 2016).

L'accumulation de SA participe à l'augmentation de la production de ROS en maintenant l'état actif des molécules phosphorylées qui contribuent à leur production. L'activation de la voie de signalisation dépendante de SA induit l'expression de certaines protéines PR (pathogenesis related) qui contribuent à la résistance locale face aux biotrophes (Y. Zhang, Lubberstedt, and Xu 2013) telles que PR-1 qui est d'ailleurs considérée comme un marqueur de la voie de SA. SA joue aussi un rôle dans la SAR, une résistance plus générale à l'échelle de la plante entière y compris dans les organes non infectés. Cette résistance permet à la plante de mobiliser plus efficacement ses mécanismes de défense suite à l'attaque par un pathogène grâce à un système de « mémoire ». Pour cela, SA va diffuser dans les autres cellules de la plante par le biais du phloème et induire des changements d'expressions géniques dans les cellules saines de la plante.

❖ *L'acide jasmonique et l'éthylène*

Lorsque la plante est infectée par des pathogènes nécrotrophes, la réponse immunitaire végétale passe par une autre voie de signalisation hormonale induisant la synthèse d'acide jasmonique (JA) et d'éthylène (ET).

La réponse médiée par l'ET/JA contribue à la défense contre les agents pathogènes nécrotrophes, tels que *Botrytis cinerea* (Verma, Ravindran, and Kumar 2016). En sécrétant des toxines, les HSTs (Host-selective toxins), et des enzymes qui dégradent les polymères des parois cellulaires. Ils sont capables de stimuler une réponse hypersensible chez la plante en sécrétant des molécules similaires à celle de la HR favorisant ainsi une production de ROS et provoquant la mort des cellules qui entourent les cellules infectées (Kliebenstein and Rowe 2008). L'action des ROS sur la paroi est perçue comme un stress oxydatif qui engendre la libération des lipides membranaires tels que l'acide linoléique et l'acide linolénique. Les acides gras libérés sont ensuite oxydés par les lipoxygénases (LOX) en hydroperoxydes. Les hydroperoxydes sont à l'origine de la synthèse de plusieurs molécules impliquées dans la défense comme JA ou des composés fongiques. Il existe de ce fait une corrélation directe entre le niveau de production de JA et de l'expression du gène *LOX*. L'activation de la voie JA induit également l'expression de gènes spécifiques comme le gène *PDF1.2* qui ne s'exprime qu'en l'absence de SA (Spoel, Johnson, and Dong 2007). ET

est également une phytohormone qui s'accumule dans la plante en réponse à des stress abiotiques et biotiques. La synthèse d'ET consiste en trois étapes successives : la méthionine est convertie en *S*-adenosyl-méthionine (SAM) qui est ensuite convertie en acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique, le précurseur direct d'ET (Adie et al. 2007). Chez *A. thaliana*, la perception de flg22 induit une augmentation de l'expression des gènes ACS, ce qui se traduit par une augmentation de la production en ET (Berens et al. 2017). Certaines protéines-PR sont directement inductibles par ET telles que PR-2, PR-3, PR-4 et PR-12 (Broekaert et al. 2006). De plus, ET et JA semble agir de manière synergique dans la défense contre les organismes necrotrophes et participent à l'établissement d'une résistance induite (ISR) dans les tissus non infectés, de façon similaire à la SAR (Choudhary, Prakash, and Johri 2007; Bari and Jones 2009).

De plus en plus de preuves indiquent que les voies de réponse de défense médiées par le SA et l'ET/JA sont mutuellement antagonistes (Verma, Ravindran, and Kumar 2016). Les phytohormones SA et JA/ET peuvent également stimuler l'activation de la PTI lorsque celles-ci sont appliquées de manière exogène. Elles sont donc également considérées comme des éliciteurs.

1.1.1.2.3. Effecteurs de la réponse de la défense des plantes

La reconnaissance de l'agent pathogène *via* les éliciteurs et la transduction du signal conduit à la mise en place de diverses réactions de défense (Boller and Felix 2009) dont les produits directs ou indirects peuvent contribuer à l'arrêt du développement du pathogène. Les mécanismes de défense comprennent des modifications structurales et biochimiques de la paroi cellulaire, la synthèse de phytoalexines et de protéines PR qui vont agir de manière directe sur le pathogène.

Ces mécanismes de défense impliquent également l'activation de la transcription de gènes de défense (Thatcher, Anderson, and Singh 2005).

❖ *Modification de la paroi végétale*

En réponse à un agent pathogène, la plante peut induire le renforcement des parois dans le but de limiter l'entrée du pathogène dans les cellules (Thatcher, Anderson, and Singh 2005).

L'une des modifications anatomiques les plus courantes est la formation d'appositions, appelées papilles, entre la paroi et la membrane de la cellule au niveau de la zone de contact du pathogène (Voigt 2014; Ellinger and Voigt 2014). La formation de papilles se fait aussi au niveau des

plasmodesmes des cellules saines qui jouxtent les zones nécrosées afin de confiner le pathogène aux points d'infections (Jongebloed et al. 2004). La callose, polymère de $\beta(1,3)$ -Dglucose, est un constituant majeur des papilles (Hückelhoven 2007). Elle s'accumule dans les plantes en réponse à des stress abiotiques et biotiques (Esquerré-Tugayé, Boudart, and Dumas 2000). La paroi cellulaire peut aussi être renforcée par apparition de lignine, un polymère de monolignols résistant aux enzymes hydrolytiques des pathogènes (Miedes et al. 2014). Ce polymère permet à la plante d'augmenter sa résistance à la pression mécanique par exemple lors de la pénétration de l'appressorium fongique dans les cellules (Hückelhoven 2007). La lignine restreint la diffusion des toxines et des enzymes formant ainsi une barrière imperméable aux molécules néfastes produites par le pathogène.

❖ *Activation des gènes de défense*

Lors de la réponse PTI, la plante active la transcription de nombreux gènes impliqués dans la restriction et le contrôle développemental du pathogène. Parmi ces gènes, on peut citer ceux qui codent pour la synthèse des protéines PR. Les protéines PR sont des protéines dont l'accumulation a été démontrée en conditions pathologiques (van Loon, Rep, and Pieterse 2006; Sels et al. 2008). Les protéines PR ont un effet à court terme et sont classées en plusieurs familles parmi lesquelles on distingue des glucanases (PR-2), des chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11) qui possèdent des activités enzymatiques capables de dégrader les parois cellulaires d'organismes fongiques et bactériens (**Tableau 3**). Les defensines (PR-12) et les thionines (PR-13) perméabilisent les parois d'organismes pathogènes et la réduction de l'élongation de l'hyphe (Y. Zhang, Lubberstedt, and Xu 2013). Les inhibiteurs de protéases (PR-6) et les endoproteinases (PR-7) inhibent l'activité de protéases pathogènes (Sels et al. 2008). Certaines protéines PR telles que PR-1 sont des protéines clés dans la défense contre des pathogènes biotrophes tels que *Pseudomonas syringae* et peuvent être caractéristiques d'une voie hormonale. PR-1, PR-2 et PR-5 sont dépendantes de la voie de SA. D'autres gènes codant pour la synthèse de molécules antimicrobiennes sont considérés comme participants actifs dans l'immunité végétale. Des protéines riches en cystéine, nommées defensines (PDF1.2), induisent la perméabilisation des membranes fongiques et la réduction de l'élongation de l'hyphe (Y. Zhang, Lubberstedt, and Xu 2013). PR-3, PR-4 et PDF1.2 dépendent de la voie hormonale de JA. De la même façon, en réponse à une attaque pathogène, la synthèse de composés toxiques comme les phytoalexines est activée. Les phytoalexines sont des molécules lipophiles de faible poids moléculaire et antimicrobiennes qui s'accumulent aux sites d'infections pathogènes (Brown and Hammond-

Kosack 2015). Chez *Arabidopsis thaliana*, la phytoalexine majoritaire est la camalexine (Glawischnig 2007). La camalexine joue un rôle important dans la défense en déstabilisant la membrane cellulaire des agents pathogènes (Zhou, Tootle, and Glazebrook 1999). Sa production a été reportée suite à des infections bactériennes (*Pseudomonas syringae* DC3000 (Beets et al. 2012; N. Zhang et al. 2014), fongiques (*Plectosphaerella cucumerina*) (Denby, Kumar, and Kliebenstein 2004; Sanchez-Vallet et al. 2010) et en réponse à des infections causées par des oomycètes (Roetschi et al. 2001). D'autres phytoalexines telles que le resveratrol, la phytoalexine majeure de la vigne, peuvent être synthétisées à partir de la voie des phenylpropanoïdes via l'enzyme clé : la phénylalanine ammonia lyase (PAL) (Dixon et al. 2002).

Tableau 3 : Caractérisation des différentes protéines PR en fonction de l'espèce végétale.

Family	Type member	Properties
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknow
PR-2	Tobacco PR-2	β-1,3-glucanase
PR-3	Tobacco P,Q	Chitinase type I,II,IV,V,VI,VII
PR-4	Tobacco 'R'	Chitinase type I,II
PR-5	Tobacco S	Thaulatin-like
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor
PR-7	Tomato P ₆₉	Endoproteinase
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III
PR-9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	Peroxidase
PR-10	Parsley "PR1"	Ribonuclease-like
PR-11	Tobacco "class V" chitinase	Chitinase type I
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate-oxidase
PR-16	Barley OxOLP	Oxalate-oxidase-like
PR-17	Tobacco PRp27	Unknow

Elles ont été découvertes en fonction de leurs propriétés « défensives ». (van Loon, Rep, and Pieterse 2006; Sels et al. 2008).

Conclusion

Le mécanisme moléculaire de l'éllicitation : La reconnaissance des éliciteurs par les récepteurs liés à la membrane plasmique entraîne des flux ioniques, une explosion de Ca^{2+} , une acidification cytoplasmique, une explosion de ROS, une activation de la NADPH oxydase, une activation des protéines G et une phosphorylation de la protéine kinase activée par des agents mitogènes. Il active également les messagers des voies de signalisation en aval, comme l'acide salicylique, l'acide jasmonique et le méthyl jasmonate. Les messagers activent les facteurs de transcription et

l'expression des gènes, ce qui conduit à la reprogrammation du métabolisme secondaire (Desender, Andrivon, and Val 2007) (**Figure 11**).

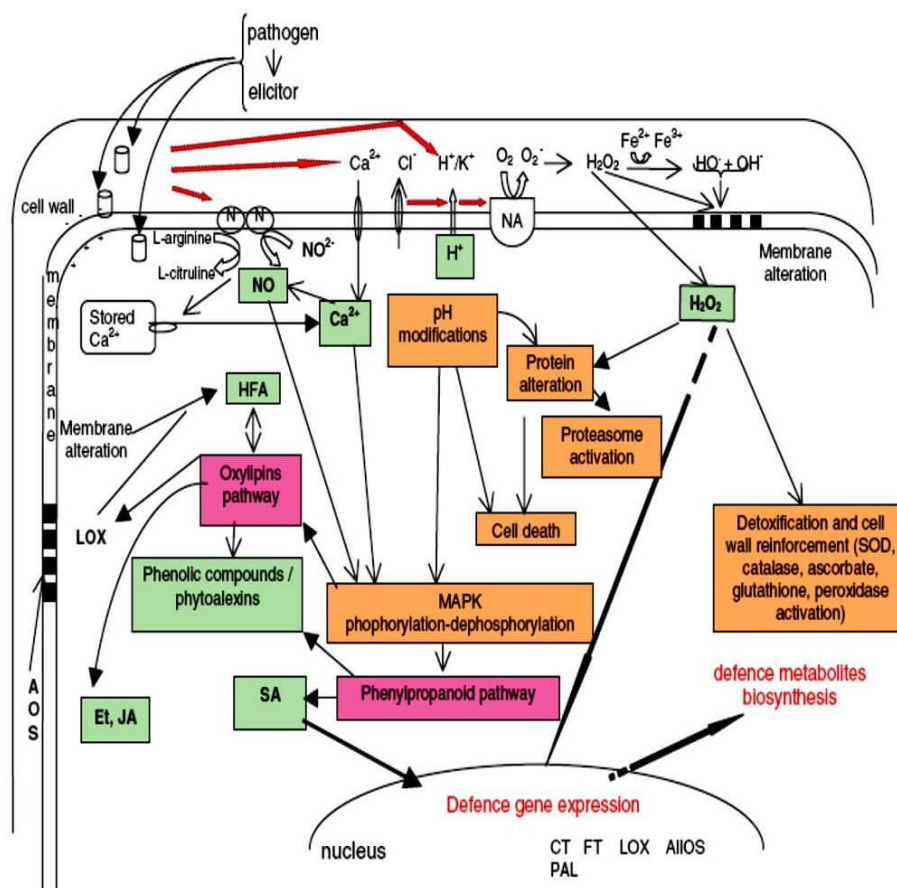


Figure 11 : Mécanisme moléculaire de l'éllicitation de la défense des plantes.

(Desender, Andrivon, and Val 2007).



PARTIE II

MÉTHODOLOGIE, RÉSULTATS & DISCUSSION

CHAPITRE I



ARTICLE 1 :
L'EFFET BIOSIMULANT DES EXTRAITS
POLYSACCHARIDIQUES
SUR LA CROISSANCE ET LA DISTRIBUTION DES
METABOLITES CHEZ LES PLANTES DE TOMATE
« S. LYCOPERSICUM »

1. Contexte

Ces derniers temps, le secteur agricole est confronté à des défis concomitants : augmenter la productivité pour nourrir la population mondiale croissante et accroître l'efficacité de l'utilisation des ressources, tout en réduisant l'impact environnemental sur les écosystèmes et la santé humaine. En fait, les engrais et les pesticides jouent un rôle crucial dans l'agriculture, représentant un outil puissant pour les producteurs afin d'augmenter le rendement et de garantir une productivité et la protection des cultures(Colla and Rouphael 2020).

À cette fin, l'agriculture moderne doit revoir ses pratiques en intégrant de nouvelles approches pour produire des aliments de manière durable(Rouphael, Lucini, et al. 2020). Une approche nouvelle et respectueuse de l'environnement est l'utilisation de biostimulants végétaux, qui peuvent réduire la dépendance aux intrants chimiques, en particulier les engrais synthétiques, et assurer la stabilité des rendements dans des conditions environnementales et édaphiques défavorables (Calvo, Nelson, and Kloepper 2014; Colla et al. 2017; Oleg I Yakhin et al. 2017). Selon le récent règlement de l'Union européenne (2019/1009), les biostimulants végétaux sont des "produits fertilisants capables de stimuler le processus de nutrition des plantes indépendamment de la teneur en nutriments des produits" [EU rapport 2019]. Les biostimulants végétaux déclenchent des processus naturels dans les cultures afin d'améliorer l'absorption et l'efficacité des nutriments, la tolérance au stress abiotique et de moduler les caractéristiques qualitatives des produits [EU rapport 2019]. Les biostimulants végétaux comprennent différentes catégories inclus les extraits des algues (Bitterlich et al. 2018; Rouphael and Colla 2018; Rouphael et al. 2018; Rouphael, Lucini, et al. 2020; Rouphael, Carillo, et al. 2020).

Les microalgues sont des ressources capables de synthétiser plusieurs bicomposés, avec un potentiel biostimulants des différents processus dans la plante en relation avec la croissance, la nutrition et la défense. Ces composés présentent un intérêt commercial en raison de leurs propriétés biologiques et rhéologiques, qui permettent leur application dans divers secteurs industriels (Costa et al. 2021). Bien qu'il soit bien établi que les microalgues et les cyanobactéries produisent plusieurs molécules bioactives et de signalisation actives sur les cultures horticoles et agronomiques, leurs applications ciblées dans le domaine des sciences végétales n'en sont encore qu'à leurs débuts (Colla and Rouphael 2020).

Dans ce contexte, cette étude vise pour l'évaluation du potentiel biostimulant des polysaccharides microalgaux comme une approche durable pour améliorer la production

végétale et répondre aux challenges environnementaux, en minimisant l'utilisation des produits chimiques.

Les objectifs principaux de cette étude sont :

- La culture et le suivi de la croissance des souches microalgales « *A. platensis*, *D. salina* et *Porphorydium sp* » sous les conditions optimales.
- L'extraction et la caractérisation chimiques des polysaccharides microalgaux.
- L'étude de l'effet biostimulant des polysaccharides microalgaux sur les paramètres physiologiques, biochimiques et métabolomiques en relation avec la croissance des plantes de la tomate.

2. 1^{er} Article

Biotechnology Reports 25 (2020) e00426



Contents lists available at ScienceDirect

Biotechnology Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/btr

Microalgae polysaccharides bio-stimulating effect on tomato plants: Growth and metabolic distribution

Farid Rachidi^{a,b}, Redouane Benhima^a, Laila Sbabou^b, Hicham El Arroussi^{a,*}

^a Green Biotechnology Laboratory MAScIR (Moroccan Foundation for Advanced Science, Innovation & Research), Madinat Al Irfane, Rabat, Morocco

^b Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University Mohammed V, Rabat, Morocco

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 June 2019

Received in revised form 24 January 2020

Accepted 26 January 2020

Keywords:

Microalgae

Polysaccharides

Biostimulant

Solanum lycopersicum

Metabolomic

ABSTRACT

Microalgae polysaccharides represent a potentially bioresource for the enhancement and the protection of agricultural crops. We investigate the possibility to use microalgae polysaccharides as a plant biostimulant. The crude polysaccharides extract (PS) from three microalgae strains were applied to *Solanum lycopersicum* plants by irrigation and compared basing on their effects on shoot and root length, nodes number and shoot and root dry weight. The application of 1 mg mL⁻¹ PS from *A. platensis*, *D. salina* and *Porphyridium* sp. on tomato plants improved significantly the nodes number (NN), shoot dry weight (SDW), and shoot length (SS) by 75 %, 46.6 %, 25.26 % compared to control respectively. Furthermore, crude PS treatment showed an improvement of carotenoid, chlorophyll and proteins content, and Nitrate Reductase (NR), NAD-Glutamate Dehydrogenase (NAD-GDH) activities in plants leaves compared to control. 1 mg mL⁻¹ of *Porphyridium* sp. enhanced significantly the carotenoid content and NAD-GDH activity by 400 %, 200 % compared to control respectively. In the same way, *A. platensis* PS improved chl a, chl b and NR activity by 90.1 %, 102.7 % and 88.34 compared to control respectively. In addition, it is found that a PS treatment has affected the protein content, which reaches 88.3 % under 0.5 mg mL⁻¹ of *D. salina* PS treatment. GC-MS metabolomics analysis also showed a change in lipids, sterol and alkanes profiles. Some sterols precursors were increased such as Cholesta-6,22,24-triene, which may indicate an enhancement of the biosynthesis of sterols and/or steroidal glycoalkaloids in treated plants.

Therefore, this is an evidence to use microalgae polysaccharides as a plant biostimulant.

© 2020 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Microalgae are a diverse group of eukaryotic and prokaryotic photosynthetic microorganisms that can grow rapidly and live in harsh conditions due to their unicellular structure [1]. They constitute a diverse group of organisms with a wide range of physiological and biochemical characteristics. Thus, they naturally produce many different bioactive compounds namely, proteins, lipids, carotenoids, vitamins and polysaccharides [2]. Polysaccharides produced mainly by seaweeds are widely used in different industries. Significant amounts of polysaccharides are used in food, pharmaceuticals and other products for human consumption. Microalgae and cyanobacteria have complex carbohydrate metabolic pathways encompassing the ability to synthesize intracellular monosaccharides, polymeric reserve glucans and structurally complex extracellular polysaccharides (EPSs) [3]. Several

microalgae such as *C. reinhardtii*, *B. braunii*, *D. tertiolecta*, *P. cruentum*, *Spirulina* sp, *I. galbana* and *D. salina*, can be a source of exopolysaccharides [4,5].

Microalgae polysaccharides especially sulfated polysaccharides are exploited in different fields due to their biological properties including anticoagulant, anti-inflammatory, antiviral and antitumoral activities and also for their good biocompatibility, biodegradability, non-toxicity, low cost and abundance [6]. In the agricultural field, microalgae polysaccharides can be a new bioactive source of plant biostimulants for crop improvement and protection against biotic and abiotic stress [7–13]. Several studies have shown the potential of these molecules to stimulate different metabolic pathways of plants. In the same way, Guzmán-Murillo et al., [14] showed that exopolysaccharides extracted from *P. tricornutum* and *D. salina* stimulated the germination of pepper under salt stress conditions. In addition, *D. salina* exopolysaccharides have shown the potential to stimulate germination, growth and tolerance of tomato and wheat plants at salt stress [4–15]. On the other hand, the aqueous extract rich of *Scenedesmus* sp and *A. platensis* polysaccharides and oligosaccharides showed a good capacity for improving plant growth, development and leaf

* Corresponding author.

E-mail addresses: farid.rachidi.bio@gmail.com (F. Rachidi), h.elarroussi@mascir.com (H. El Arroussi).

<https://doi.org/10.1016/j.btr.2020.e00426>

2215-017X/© 2020 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

nutrient status of *Petunia x hybrida* plant, offering an interesting potential use as biostimulants [16]. Another study showed that liquid extracts of *C. vulgaris* and *S. quadrica* induced stimulation of root development of *Beta vulgaris* L. plants [17].

The objective of this study was to study the biostimulatory effect of microalgal polysaccharides on the growth and metabolite distribution of tomato plants under controlled conditions.

2. Material and methods

2.1. Microalgae culture

Microalgae strains (*Arthrospira platensis* MS001, *Dunaleilla salina* MS002, *Porphyridium* sp. MS099) were isolated from Moroccan aquatic ecosystems and maintained in MASClR's (Moroccan Foundation for Advanced Science, Innovation and Research) collection. The microalgae were cultivated in 500 mL Erlenmeyer containing Walne's medium with pH 8.2 at 25 °C for *D. salina*, and *Porphyridium* sp. *A. platensis* was cultivated in Zarrouk medium in pH 9 at 30 °C. All cultures were incubated by agitation in orbital shaker at 130 rpm under continuous illumination ($150 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). After 23 days, total biomass was harvested by centrifugation at 4200 g for 10 min and rinsed with water before lyophilizing.

2.2. Microalgae polysaccharides production and characterization

1g of dry microalgae biomass powder was suspended in 40 ml of distilled water and incubated at 90 °C for 2 h with stirring. The mixture was centrifuged at 4000 g for 15 min. After recovering the supernatant, the extraction process was repeated twice, and then the supernatants were mixed with two volumes of absolute ethanol, stirred vigorously and left overnight at 4 °C. The precipitated polysaccharides were recovered in pellet by centrifugation at $16800 \times g$ for 10 min. The PS pellet was washed three times with absolute ethanol, lyophilized and stored at -80 °C for future use.

The total neutral sugar and uronic acids contents of the crude PS were determined according to two methods [18,19]. Sulfate content in polysaccharides was determined by the barium chloride-gelatin method [20].

Proteins content were determined according to the Bradford method using crystalline bovine serum albumin (BSA) as standard.

2.3. Plant growth and crude polysaccharides extracts treatment

In this set of experiments, we used *Solanum lycopersicum* L. var. Jana F1 (tomato) bayer nunhems netherlands bv. Seeds. Wide adaptable variety for main season (long production period). Plant is vigorous, good cover and short inter nodes, very high yield. Fruit is high quality with round shape and nice red color (purchased from "Syngenta Morocco") were surface-disinfected using sodium hypochlorite solution (1 %) containing 10 μL of Tween-20 for 20 min and then rinsed with sterile water.

Sterile seeds were kept in darkness in magenta boxes with MS/4 (Murashige and Skoog)-agar medium for 7 days at 25 °C and the seedlings were transplanted into 12 cm diameter pots containing a mixture of sandy soil and peat (60:40) sterilized twice in autoclave (121 °C, 20 min). The young tomato plants were grown in a phytotron at 26 °C, 16 h/8 h Light/dark cycle and $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ illumination intensity and 68 % humidity. Plants were irrigated with 10 ml/plant of PSs solution (0.25, 0.5 and 1 mg/mL distilled water, pH 6.8) five time (one time a week).

Plants were irrigated every day with 20 mL of water, alternated twice a week with a nutrient solution containing: 8 μM MnCl_2 , 0.5 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.4 μM ZnSO_4 , 46 μM H_3BO_3 , 0.25 μM

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.6 μM Fe-EDTA, 4.1 mM KNO_3 , 0.9 mM K_2SO_4 , 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 1.5 mM KH_2PO_4 [21].

35 days after transplanting, the plants were harvested to measure growth parameters: shoot length, shoot and root dry weight (after an incubated at 70 °C for 72 h) and nodes number. Five independent replicates for each treatment were performed.

2.4. Plant growth biochemical parameter analysis

Biochemical parameters such as pigments concentration (chlorophyll **a**, chlorophyll **b** and carotenoids), protein and nitrogen reduction and assimilation-related enzymatic activities: Nitrate Reductase (NR) and NAD-Glutamate Dehydrogenase (NAD-GDH) were analyzed according to the following methods:

For the Chlorophylls and carotenoid concentration, we used the [22] equations to determine the content of pigments in which the ethanol (95 %) was used as the extraction solvent. The pigment was measured by spectrophotometer for chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoid as follow:

$$\text{Chl a} = (13,36 \times A_{664}) - (5,19 \times A_{648}).$$

$$\text{Chl b} = (27,43 \times A_{648}) - (8,12 \times A_{664}).$$

$$\text{Carotenoid} = (1000 \times A_{470}) - (2,270 \times \text{Chl a}) - (81,4 \times \text{Chl b} / 227)$$

The NR and NAD-GDH activities were measured according to the methods of Allegre [23] and Singh & Srivastava [24] respectively.

Simultaneously, an absorbance standard curve was prepared as a function of the concentrations of 0, 1, 2, 3, 4 and 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of NO_2^- in the reading solution. Thus, NR was estimated in $\mu\text{mol NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$. Glutamate dehydrogenase activity is expressed in terms of μmol of NAD (H) oxidation/reduction ($\text{g FW}^{-1} \text{min}^{-1}$).

2.5. GC-MS metabolomics analysis of tomato plants treated with microalgae polysaccharides

The chloroform (5 mL) was added to 0.4 g of fresh tomato leaves ground treated with liquid nitrogen, the reaction was assisted with ultrasonic (Branson Sonifier 450): 40 KHz at room temperature for 1 h. Then the tubes were incubated in 85 °C for 4 h.

The chloroform extract was analyzed with GC-MS according to the method of EL Arroussi et al. [4]. GC MS analysis was performed after acid transesterification. The reaction was catalyzed by 6 % H_2SO_4 (w:w) in methanol and assisted by ultrasonic (Branson Sonifier 450) : 40 KHz at room temperature for 1 h. Volatile metabolites profile was characterized by gas chromatography (GC) (Agilent 7890A Series GC) coupled to mass spectrometry (MS) equipped with a multimode injector and 123-BD11 column with a dimension of 15 m x 320 μm x 0.1 μm and electron impact ionization. Detection was done using full scan mode between 30–1000 m/z, with gain factor of 5 and the identification was performed using NIST 2014 MS Library.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 13.0 and R programs. Multivariate Analysis of Variance (MANOVA) and Tukey test perform Significant of difference analysis insured by SPSS. For the study of the correlation between the variables and parameters, we used the test of Pearson via the R program.

3. Results

3.1. Growth microalgae and polysaccharides production

The growth rate and biomass production of the three microalgae strains after 23 days of culture in laboratory conditions were (1.28 g L^{-1} ; 0.13) (0.026 , 0.95 g L^{-1}) and (0.03 , 0.67 g L^{-1}) for *A. platensis*, *D. salina* and *Porphyridium* sp. respectively (Figs. 1a and b).

The Table 1 shows that the content of crude polysaccharides extracted from *A. platensis*, *D. salina* and *Porphyridium* sp. were 2.59 %, 4.1 % and 5.53 % respectively.

The microalgae crude PS was analyzed, and their neutral sugars, sulfate content, and uronic acid contents were measured by colorimetric analyses (Table 1). We note that PS are contain 17.27 %, 33.05 % and 35.35 % of neutral sugars; 3.6 %, 23.9 % and 13.8 % of uronic acids, and 5.3 %, 11.54 % and 10.4 % of sulfate group in *A. platensis*, *D. salina* and *Porphyridium* sp. respectively.

3.2. Effect of crude microalgae polysaccharides on growth of tomato plants

3.2.1. Effect on morphological parameters

The results on tomato plants growth irrigated with three concentrations (0.25 mg mL^{-1} , 0.5 mg mL^{-1} and 1 mg mL^{-1}) of crude PS from three microalgae species are presented in Table 2. All PS treatments significantly ($P < 0.05$) stimulated the tomato plant growth parameters compared to control. Treatment, 1 mg mL^{-1} of crude PS showed the greatest increase highly significant in shoot size (SS), numbers of nodes (NN), root dry weight (RDW) and shoot dry weight (SDW). The polysaccharide treatments of *D. salina*, *Porphyridium* sp. and *A. platensis*, at a concentration of 1 mg mL^{-1} induced a maximum improvement percentage highly significant of 46.61 %, 25.26 % and 12.12 % for SDW, SS, and RDW respectively. As the percentage of improvement of number of nodes induced by this concentration for all the strains is reached 75 % and it is highly significant in comparison with the control (Table 2).

3.2.2. Microalgae polysaccharides effect on pigments, protein concentration and enzymatic activities

The assessment of Chlorophyll, carotenoid, proteins concentration and enzymatic activity of NAD-GDH and NR as markers used in this study to assess the effect of microalgae crude PS on tomato plant growth. All microalgae treatment studied had a significant effect on carotenoid, Chlorophyll and protein content, as well as enzymatic activities of NAD-GDH and NR in tomato plant leaves compared to the control (Table 3). *A. platensis* crude polysaccharide treatments improved significantly chl *a* by 90.08 %

in 0.25 mg mL^{-1} , chl *b* by 102.71 % in 0.5 mg mL^{-1} and nitrate reductase activity by 124 % in 1 mg mL^{-1} of PS compared to control plant. As we see that, the 1 mg mL^{-1} treatment of *Porphyridium* sp. improved highly significant the carotenoids content and NAD-Glutamate dehydrogenase activity with 468 % and 124 % respectively compared to control. Finally, the results show that the 0.5 mg mL^{-1} of *D. salina* PS induced a protein biosynthesis with a very significant percentage improvement of 88 % (Table 3).

3.2.3. GC-MS metabolomics analysis of tomato plants responses to microalgae crude polysaccharides

3.2.3.1. Lipid profile of tomato leaves. Very long chain fatty acids (VLCFAs) are essential to plants. They are involved as membrane constituents and signaling molecules in sphingolipids and phospholipids and are necessary for the production of cuticular waxes phospholipids and complex sphingolipids have, collectively, profound effects on embryo, leaf, root and flower development. In the same way, unsaturated fatty acids (UFAs) play key roles in membrane structure and function. We therefore observed the effect of PS crude extracts on Fatty acids using GC-MS. The results (Table 4) showed that the all-crude PS treatments allowed a modification of the Fatty Acid profiles in tomato leaves (Table 4). The highest improvement of VLCFA concentration was obtained by 0.5 mg mL^{-1} and 1 mg mL^{-1} treatment of *Porphyridium* sp and *D. salina*, reaching up to 70 % and 42 % respectively (Table 4). On the other hand, 0.25 mg mL^{-1} crude PS of *A. platensis* generally increased the UFA content by 41.03 % compared to the control, and particularly improvement of linolenic acid (C18:3) by 48.43 %. While, 0.5 mg mL^{-1} crude PS of *A. platensis* increased SFA content with 46.06 % and decreased UFA with 68.5 % compared to control (Table 4).

3.2.3.2. Sterol and Alkanes profile. Phytosterols and Alkanes are another's categories of biochemical markers evaluated in this study. They play an important role in plant growth and development, including cell division, cell elongation, cellulose biosynthesis, and cell wall formation, while very long chain alkanes (VLCA) are the predominant wax components of plant cuticle. In order to elucidate the phytosterol and alkane profile in tomato leaves, we measured their content using GC-MS. Fig. 2 shows that phytosterols content increased after treatment with crude polysaccharides extracted from *A. platensis* and *D. salina*. Contrarily, *Porphyridium* sp. crude PS significantly decreased the phytosterols content in tomato plant leaves. The highest phytosterol enhancement was observed in plants treated with 0.25 mg mL^{-1} crude PS of *A. platensis* reaching up to 113 % compared to the control. While 1 mg mL^{-1} of crude PS extracted

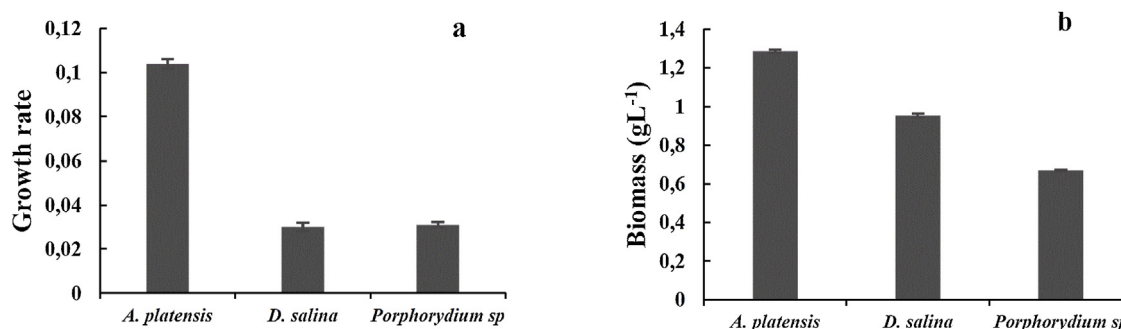


Fig. 1. Growth of microalgae strains: Growth rate (a), Biomass production (b).

Strains microalgae were cultivated in 150 ml Erlenmeyer at 25°C during 23 days under continuous illumination ($150 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Data represents average of 3 replicates $\pm$ standard error. $\mu = \ln(C_2/C_1) / t_2 - t_1$ of the exponential phase, C: cellule concentration, t: time.

Table 1
Production and composition of three microalgae polysaccharides.

Strains	Polysaccharide (%/DB)	Total sugars (%/PS)	Sulfate (%/PS)	Uronic acid (%/PS)	Protein (%/PS)	Amino acid(%/PS)
<i>Arthrospira platensis</i>	2.590 ± 0.408	17.275 ± 1.05	5.306 ± 0.37	3.602 ± 1.581	2.746 ± 0.211	0.206
<i>Dunaleila salina</i>	4.103 ± 0.134	33.050 ± 0.925	11.541 ± 0.924	23.951 ± 2.622	4.202 ± 0.021	0.083
<i>Porphyridium</i> sp.	5.529 ± 0.158	35.350 ± 0.025	10.427 ± 0.542	13.808 ± 5.452	2.701 ± 0.008	0.017

Data represents average of 3 replicates ± standard error.

Table 2
Effect of the microalgae crudes polysaccharides extract (PS) on the tomato plant growth.

		Length (cm)		Number	Fresh. Weight (g)		Dry. weight (g)	
		Root	Shoot	Nodes	Root	Shoot	Root	Shoot
Control	water	15.17 ± 2.11	33.53 ± 0.69	04.00 ± 0.00	2.61 ± 0.20	8.79 ± 0.30	0.33 ± 10 ⁻³	1.33 ± 0.03
<i>A. Platensis</i>	0.25 mg mL ⁻¹	15.02 ± 1.52	37.90 ± 1.25***	05.00 ± 0.00***	2.61 ± 0.26	9.70 ± 0.05***	0.29 ± 0.01	1.64 ± 0.02***
	0.5 mg mL ⁻¹	12.46 ± 0.75	36.80 ± 1.00***	06.00 ± 0.00***	3.32 ± 0.14***	10.71 ± 0.32***	0.33 ± 0.02	1.49 ± 0.03***
	1 mg mL ⁻¹	14.00 ± 0.33	34.87 ± 0.22	07.00 ± 0.00***	2.96 ± 0.15***	8.57 ± 0.27	0.37 ± 0.02***	1.43 ± 0.02**
<i>D. salina</i>	0.25 mg mL ⁻¹	15.50 ± 0.33	39.1 ± 0.45***	05.00 ± 0.00***	2.61 ± 0.19	9.75 ± 0.21***	0.31 ± 0.01	1.65 ± 0.05***
	0.5 mg mL ⁻¹	13.56 ± 0.08	37.87 ± 0.74***	06.00 ± 0.00***	3.42 ± 0.15***	10.62 ± 0.21	0.35 ± 0.02	1.73 ± 0.04***
	1 mg mL ⁻¹	14.67 ± 0.56	40.20 ± 1.15***	07.00 ± 0.00***	3.26 ± 0.12***	11.38 ± 0.03***	0.32 ± 0.01	1.95 ± 0.01***
<i>Porphyridium</i> sp.	0.25 mg mL ⁻¹	15.27 ± 0.81	35.14 ± 0.77	06.00 ± 0.00***	2.44 ± 0.21	9.73 ± 0.15***	0.29 ± 0.01	1.58 ± 0.23***
	0.5 mg mL ⁻¹	15.27 ± 0.84	39.03 ± 0.69***	07.00 ± 0.00***	2.95 ± 0.25	11.41 ± 0.36***	0.34 ± 0.02	1.93 ± 0.07***
	1 mg mL ⁻¹	15.00 ± 1.33	42.00 ± 0.67***	07.00 ± 0.00***	3.40 ± 0.16***	11.58 ± 0.37***	0.32 ± 0.04	1.91 ± 0.03***

Data represents average of 5 replicates ± standard error; asterix represents a significant difference compared to the control treatment using MANOVA analysis ($p \leq 0.05$) and Tukey test ±: refers to standard deviation with $n = 5$ replicas. *5 %; **1 %; ***0.1 %.**Table 3**
Microalgae crudes polysaccharides effect on biochemical and enzymatic parameters of tomato plant.

		Carotenoid ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Chl a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Chl b ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Proteins (mg mL^{-1})	NAD-GDH ($\text{mmNADH min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$)	NR ($\mu\text{M NO}_2 \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$)
Control	water	0.16 ± 0.05	1.21 ± 0.07	1.84 ± 0.14	0.283 ± 0.007	0.0066 ± 0.001	0.80 ± 0.03
<i>A. Platensis</i>	0.25 mg mL ⁻¹	0.21 ± 0.03	2.30 ± 0.11***	2.99 ± 0.15**	0.507 ± 0.020***	0.0062 ± 0.001	1.66 ± 0.11***
	0.5 mg mL ⁻¹	0.28 ± 0.03**	2.24 ± 0.28***	3.73 ± 0.86***	0.364 ± 0.017**	0.0074 ± 0.002	1.45 ± 0.24***
	1 mg mL ⁻¹	0.33 ± 0.01***	1.21 ± 0.34	1.63 ± 0.24	0.441 ± 0.034***	0.0080 ± 0.001	2.52 ± 0.26***
<i>D. salina</i>	0.25 mg mL ⁻¹	0.47 ± 0.05***	2.03 ± 0.82*	1.61 ± 0.19	0.354 ± 0.040*	0.0103 ± 0.0002***	2.07 ± 0.05***
	0.5 mg mL ⁻¹	0.42 ± 0.06***	1.09 ± 0.15	1.14 ± 0.21	0.533 ± 0.047***	0.0120 ± 0.001***	0.75 ± 0.06
	1 mg mL ⁻¹	0.43 ± 0.07***	1.70 ± 0.43	1.83 ± 0.46	0.519 ± 0.011***	0.0119 ± 0.0006***	1.04 ± 0.19
<i>Porphyridium</i> sp.	0.25 mg mL ⁻¹	0.55 ± 0.05***	0.76 ± 0.09	1.32 ± 0.13	0.446 ± 0.003***	0.0110 ± 0.0004***	1.31 ± 0.13***
	0.5 mg mL ⁻¹	0.81 ± 0.05***	1.66 ± 0.02	2.96 ± 0.32**	0.341 ± 0.023	0.0140 ± 0.0008***	1.18 ± 0.10*
	1 mg mL ⁻¹	0.91 ± 0.06***	1.67 ± 0.32	2.18 ± 0.51	0.413 ± 0.018***	0.0148 ± 0.001***	1.40 ± 0.26***

Data represents average of 5 replicates ± standard error; asterix represents a significant difference compared to the control treatment using MANOVA analysis ($p \leq 0.05$) and Tukey test ±: refers to standard deviation with $n = 5$ replicas. *5 %; **1 %; ***0.1 %.

from *Porphyridium* sp. showed the most significant decrease in phytosterol in tomato leaves (Fig. 2a).

The profile of sterols showed an important change after treatment with crude PS of *D. salina* and *Porphyridium* sp. (Fig. 2b). All *D. salina* crude PS treatments decreased the content of the different sterols detected in this study. However, there Cholesta-6,22,24-triene appeared in plants treated with 1 mg mL⁻¹ of crude PS which is not present in the control (Fig. 2b).

Table 5 shows that the crude PS of three microalgae decreased the total alkane content in tomato plant leaves. Alkane profile underwent a redistribution after treatment by the various microalgae crude PS (Table 5). For example, tomato plants treated with 0.5 mg mL⁻¹ of crude PS extracted from *A. platensis* showed a disappearance of all alkanes detect in the control and which were replaced with 100 % Tetracosane. The appearance of three new alkanes (Nanacosane, tricosane and docosane) and the disappearance of five alkanes (Octadecane, triacontane, heptacosane, 1-chloro, heneicosane, hentriacontane) in tomato plants leaves after treatment by 0.25 mg mL⁻¹ of crude PS from *D. salina* (Table 5). The treatment by 1 mg mL⁻¹ of crude PS from *Porphyridium* sp. allowed for the disappearance of most of the alkanes, thus increasing the percentage of Eicosane and Octacosane (Table 5).

4. Discussion

Three microalgae *A. platensis*, *D. salina* and *Porphyridium* sp. belonging to 3 distinct classes Cyanophyceae, Chlorophyceae and Porphyridiophyceae were investigated for their prospective bio-stimulant activities in tomato plant. Indeed, an increase of the leaves, nodes and consequently shoot dry weight was revealed in tomato plant treated by crude polysaccharide extracts of these microalgae (Table 2). PCA analysis showed that *Porphyridium* sp. and *D. salina* crude polysaccharides had greater effect on growth parameters compared (Fig. 3) to PS of *A. platensis* previously studied [25].

PCA analysis (Fig. 3), showed that the stimulatory effect of PS crude extracts increased with concentration. Remarkably, growth parameters induced depend on the concentration of polysaccharides as well as microalgae strains. Shoot length and weight, carotenoid content and NAD-GDH activity were highly stimulated by treatment with 1 mg mL⁻¹ crude *Porphyridium* sp. PS, followed by 0.5 mg mL⁻¹ crude of *Porphyridium* sp. PS and lastly 1 mg mL⁻¹ crude of *D. salina* PS treatment. These growth parameters show a positive correlation between them. Contrariwise, other parameters

Table 4

The effect of microalgae crude polysaccharides on the distribution of fatty acid in tomato plants.

	Faty acid	Control	<i>A. platensis</i>			<i>D. salina</i>			<i>Porphyridium</i> sp.		
			Water	0,25 mgmL ⁻¹	0,5 mgmL ⁻¹	1 mgmL ⁻¹	0,25 mgmL ⁻¹	0,5 mgmL ⁻¹	1 mgmL ⁻¹	0,25 mgmL ⁻¹	0,5 mgmL ⁻¹
SFA	C8:0	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	C9:0	0.71	0.30	0.00	0.24	0.55	0.48	0.23	0.18	0.33	0.34
	C12:0	0.59	0.22	0.00	0.00	0.24	0.36	0.00	0.18	0.29	0.31
	C14:0	1.14	0.77	0.81	0.80	0.84	0.97	0.97	0.80	1.03	1.07
	C15:0	0.00	0.00	1.18	0.00	0.96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	C16:0	41.03	30.32	44.81	35.78	43.47	38.07	42.09	32.65	40.93	38.86
	C17:0	1.14	1.86	1.84	2.55	0.97	3.02	2.32	2.41	1.53	1.96
	C18:0	11.59	7.29	35.77	11.40	26.31	10.43	11.58	23.46	9.48	9.14
	C20:0	0.99	0.74	1.05	1.01	0.97	1.02	1.63	0.99	1.19	1.14
UFA	C16:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35
	C16:3	4.58	11.44	0.00	5.28	0.00	4.61	3.30	3.69	3.03	3.37
	MDD*	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.11	0.00	0.00
	C18:2	12.92	11.55	4.07	12.81	6.77	9.89	9.31	9.73	9.11	9.98
	C18:3	22.71	33.71	8.60	27.77	17.20	28.46	25.48	22.61	29.34	30.82
VLCFA	C21:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.56	0.00	0.00	0.00	0.00
	C22:0	0.97	0.62	0.71	0.85	0.77	1.10	1.07	0.68	1.16	1.15
	C23:0	0.00	0.23	0.00	0.45	0.00	0.00	0.57	0.30	0.41	0.44
	C24:0	1.22	0.93	1.16	1.07	0.96	1.03	1.47	1.03	1.18	1.09
	C25:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00
	C26:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.98	0.00
Total	VLCFA	2.19	1.79	1.87	2.36	1.73	2.13	3.11	2.20	3.73	2.69
	UFA	40.21	56.71	12.67	45.87	23.97	43.52	38.09	37.14	41.48	44.52
	SFA	59.79	43.29	87.33	54.13	76.03	56.48	61.91	62.86	58.52	55.48

C8:0, Sbericacid; C9:0, Azelaicacid; C12:0, Lauricacid; C14:0, Myristicacid, C15:0, Pentadecylicacid; C16:0, Palmiticacid; C17:0, Margaricacid; C18:0, Stearicacid; C20:0, Arachidicacid; C16:1, Palmitoleicacid; C16:3, Roughanicacid; Methyl 6,10-octadecad; C18:2, linoleicacid; C18:3, Linolenicacid ;C21:0, Henicosanoicacid ; C22:0, Behenicacid ; C23:0, Tricosylicacid ; C24:0,Lignocericacid ; C25:0, Hyenicacid ; C26:0,Ceroticacid; SFA, saturatedfattyacid ; UFA, unsaturatedfattyacid ; VLCFA, verry long chainfattyacid.

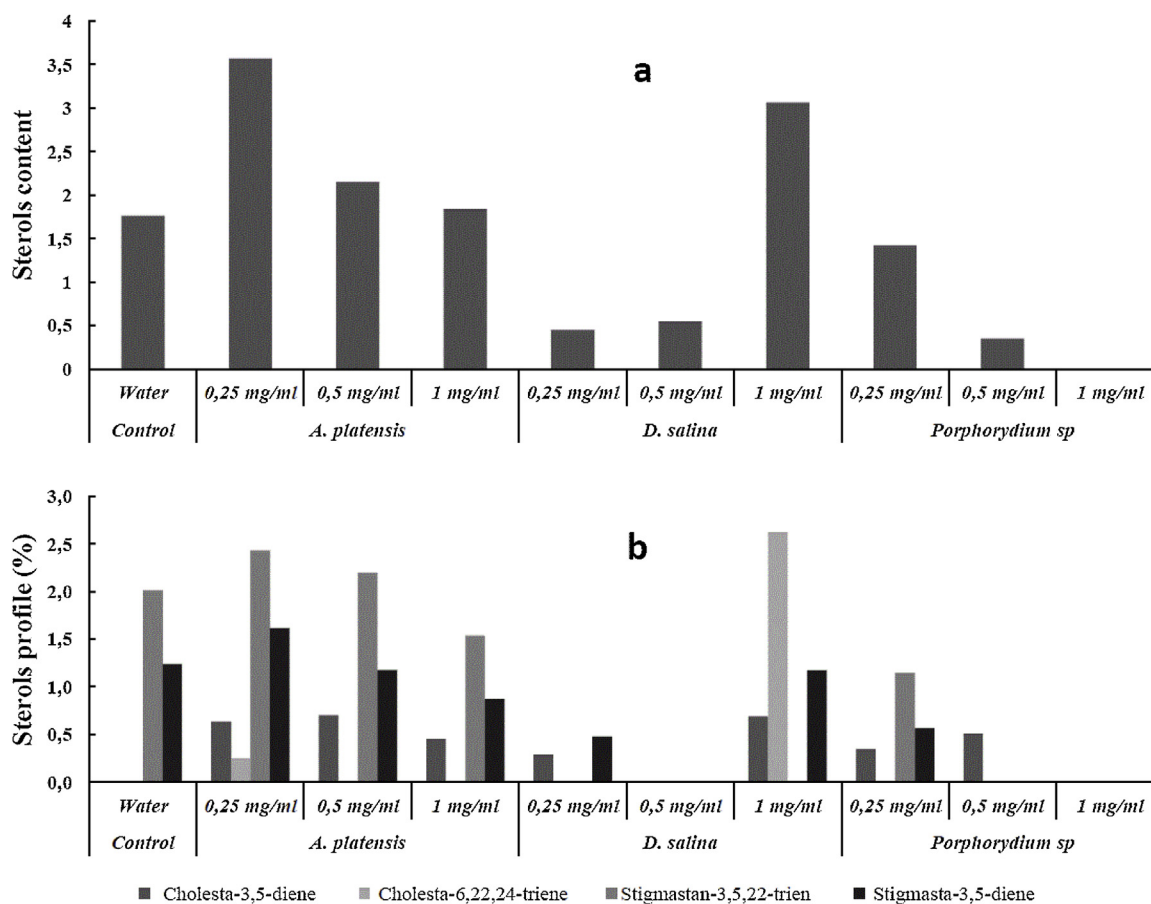
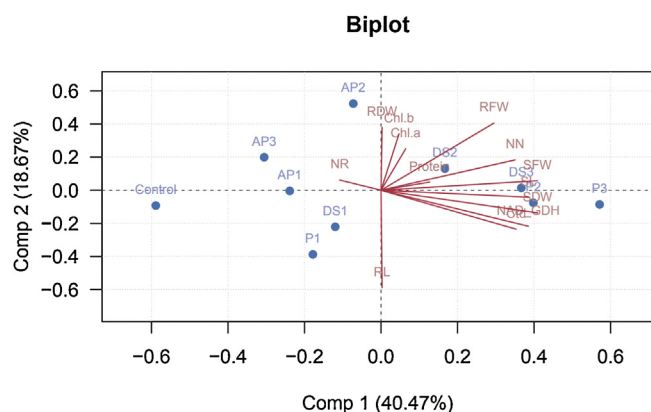
**Fig. 2.** Microalgae crude polysaccharides effect on the distribution of Sterols in tomato plants.

Table 5

F. Rachidi et al./Biotechnology Reports 25 (2020) e00426

The effect of microalgae crudes polysaccharides on the distribution of alkanes in tomato plants.

Alkane	Control	<i>A. platensis</i>			<i>D. salina</i>			<i>Porphyridium</i> sp.		
	Water	0.25 mgmL ⁻¹	0,5 mgmL ⁻¹	1 mgmL ⁻¹	0,25 mgmL ⁻¹	0,5 mgmL ⁻¹	1 mgmL ⁻¹	0,25 mgmL ⁻¹	0,5 mgmL ⁻¹	1 mgmL ⁻¹
Eicosane	23.05	53.96	0.00	35.25	24.01	7.24	2.39	56.77	4.03	69.60
Heptadecane	6.07	0.00	0.00	0.00	0.00	40.70	35.95	0.00	0.00	0.00
Octacosane	7.13	3.83	0.00	0.00	34.17	39.28	0.00	0.00	0.00	30.40
Octadecane	8.30	0.00	0.00	10.13	0.00	12.79	20.85	16.86	68.37	0.00
Triacotane	4.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Heptacosane	2.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	27.60	0.00
Heneicosane	44.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.00	0.00	0.00
Hentriacontane,	4.46	7.52	0.00	0.00	0.00	0.00	7.70	8.17	0.00	0.00
Tetracosane	0.00	8.71	100.00	25.90	0.00	0.00	28.92	0.00	0.00	0.00
Octadecane	0.00	25.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2-Methyltriacontane	0.00	0.00	0.00	11.59	7.92	0.00	0.00	9.20	0.00	0.00
Hexacosane	0.00	0.00	0.00	17.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Nonacosane	0.00	0.00	0.00	0.00	2.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Tricosane	0.00	0.00	0.00	0.00	4.65	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Docosane	0.00	0.00	0.00	0.00	27.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Heptadecane	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.19	0.00	0.00	0.00
Cyclotetradecane	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.65	0.00	0.00
Octadecane	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.00	0.00	0.00
Dotriacontane	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.34	0.00	0.00
Total of alkanes	16.14	7.58	2.44	10.27	11.62	7.74	13.38	9.67	9.42	9.54

**Fig. 3.** Principal component analysis (PCA) biplot for investigated growth parameters.

RL, Root length; RFW, Root fresh weight; RDW, Root dry weight; SL, Shoot length; SFW, Shoot fresh weight; SDW, Shoot dry weight; NN, Nodes number; Chl a; Chl b; Cad, Carotenoid; Protein; Nitrate reductase, NAD_GDH, NAD-Glutamate dehydrogenase. Crude polysaccharide of (AP, *Arthrospira platensis*; D.S, *Dunaliella salina*; P, *Porphyridium* sp.) with tree concentrations (1 : 0.25 mg mL⁻¹, 2 : 0.5 mg mL⁻¹ and 3 : 1 mg mL⁻¹

such as chlorophyll content, root weight and NR activity seem to be slightly influenced by two *A. platensis* PS extracts concentrations (0.5 mg mL⁻¹ and 1 mg mL⁻¹).

The enhancement of tomato growth after PS treatment was accompanied by an increase of its major element such as nitrogen enzymes activities and protein content. Photosynthesis and nitrate assimilation and basal metabolism were enhanced by carboxylated or sulfated polysaccharides in similar studies [26,27]. Moreover, it was shown that basal metabolism and cycle regulatory cyclins were enhanced in treated plants with oligo-carrageenan which

caused an increase in leaf biomass by the stimulation of cell division [27]. In *Pinus radiata*, Oligosaccharide kappa increased the level of IAA and GA displaying “a reciprocal positive interaction” and their effects overlapped regarding cell division and expansion, and tissue differentiation [28].

Biological activity of PS extracts results from its composition [29–32]. Crude PS extract contained essentially carbohydrates, sulfate content and uronic acids. These elements could be the origin of the stimulation. Overall, correlation test showed that growth stimulation was mainly related to sugars content, sulfated and carboxylated groups (uronic acid) of polysaccharides (Table 6).

These results confirm previous studies. Carrageenan as seaweeds sulfated oligosaccharides showed the plant growth biostimulant activity [33] or carboxylated PSs such as alginate [26] was demonstrated. Polysaccharides from *Spirulina platensis* increased the length of tomato and pepper plants by 20 % and 30 % respectively [15]. While *Dunaliella salina* PS were used to enhance tomato tolerance to salt stress [4].

Lipid profiling by GC–MS showed that all plants treated with crude microalgae polysaccharides displayed Lipid profile rearrangements. A decrease in stigmasterols and an accumulation of cholesta was observed (Fig. 2). Some sterols in minute amounts, such as campesterol in *Arabidopsis thaliana*, are precursors of oxidized steroids acting as growth hormones collectively named brassinosteroids. BRs have several functions in plant metabolism. BRs regulate photosynthesis by inducing rubisco and carbonic anhydrase [34]. Cell division and cell expansion were also positively regulated by BRs [35]. There are so far no studies done on the impact of biostimulants on plant phytosterols.

On the other hand, we revealed that very long chain alkanes dropped under PS treatment (Table 5). VLCA constitute with very long chain fatty acids and their derivative a cuticles wax in epidermal leaf. This have a protective function against abiotic and biotic stresses. This cuticle however is a hydrophobic barrier so the

Table 6Correlation between tomato shoot dry weight (g) and polysaccharides treatment concentration (1 mg mL⁻¹ PS) and composition.

Correlation coefficient					
PS (%)	Total sugars (%)	Sulfate(%)	Uronic acid(%)	Protein (%)	Amino acid(%)
0.839	0.983	0.995	0.899	0.536	–0.913

decrease of VLCA under PS treatment could be explained by the humectant function of PS ensured by its strong hydrophobicity. Nevertheless, no significant variation was detected in fatty acid profile (Table 4).

More investigations are needed to confirm our finding about the role of BRs function and to elucidate and involved pathways. The biostimulatory effect of PS from a many algae species has been proven. PS have proven their promoting activity to herbaceous plants such as tobacco, pepper [25], chickpea, maize [33], opium poppy [26], *Catharan thusroseus* [36] as on trees such as Monterey pine [28] and *Eucalyptus* [37]. During last few years, PS have found its path to the market. We promote PS from microalgae. This is a renewable source, easy to cultivate, with a good PS productivity and a high plant promoting activity.

Funding

The authors would link to give special thanks for the financial support of MESRSFC and CNRST Morocco, for the realization of this project under the best conditions (Grant number: PPR2).

Author contributions statement

E.A.H. and L.S conceived the experiments, R.F. and R.B conducted the experiments, E.A.H., R.F and R.B analyzed the results. All authors reviewed the manuscript. The authors declare that they have no conflict of interest.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no competing interests.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledgement Chanda Mutale Joan for the revision of the quality of the English language of this article. We also acknowledgement Mr. Rida RABI who has been involved in the statistical analysis of this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00426>.

References

- [1] Y. Chisti, Biodiesel from microalgae, *Biotechnol. Adv.* 25 (3) (2007) 294–306, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001> PubMed PMID: 17350212.
- [2] L. Gouveia, B. Nobre, F. Marcelo, S. Mrejen, M. Cardoso, A.F. Palavra, R.L. et Mendes, Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂, *Food Chem.* 101 (2) (2007) 717–723.
- [3] F. Rossi, R. De Philippis, Exocellular Polysaccharides in Microalgae and Cyanobacteria: Chemical Features, Role and Enzymes and Genes Involved in Their Biosynthesis. The Physiology of Microalgae, Springer, 2016, pp. 565–590.
- [4] H. El Arroussi, R. Benhima, A. Elbaouchi, B. Sijilmassi, N. El Mernissi, A. Afsar, I. Meftah-Kadmiri, N. Bendou, A. Smouni, Dunaliella salina exopolysaccharides: a promising biostimulant for salt stress tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum*), *J. Appl. Phycol.* (2018), doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s10811-017-1382-1>.
- [5] A. Mishra, K. Kavita, B. Jha, Characterization of extracellular polymeric substances produced by micro-algae Dunaliella salina, *Carbohydr. Polym.* 83 (2) (2011) 852–857, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.067>.
- [6] P. Manivasagan, J. Oh, Marine polysaccharide-based nanomaterials as a novel source of nanobiotechnological applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 82 (2016) 315–327, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.081> PubMed PMID: 26523336.
- [7] S.I. Abdel-Hafez, K.A. Abo-Elyousr, Ismail R. Abdel-Rahim, Fungicidal activity of extracellular products of cyanobacteria against, *Alternaria porri* 50 (2) (2015) 239–245.
- [8] a.m. Abo-Shady, B.A. Al-ghaffar, M. Rahhal, H.A. Abd-El Monem, Biological control of faba bean pathogenic fungi by three cyanobacterial filtrates, *Pak. J. Biol.* 10 (18) (2007) 3029–3038.
- [9] H.A. Alwathnani, K.J.A. Jo B. Perveen, Biological control of fusarium wilt of tomato by antagonist fungi and cyanobacteria, *Afr. J. Biotechnol.* 11 (5) (2012) 1100–1105.
- [10] H. Righini, E. Baraldi, Y. García Fernández, A. Martel Quintana, Roberti RJMd, Different antifungal activity of *Anabaena* sp., *Ecklonia* sp., and *Jania* sp. against *Botrytis cinerea*, *Mar. Drugs* 17 (5) (2019) 299.
- [11] R. Roberti, S. Galletti, P. Burzi, H. Righini, S. Cettrullo, C.J.B.C. Perez, Induction of defence responses in zucchini (*Cucurbita pepo*) by *Anabaena* sp. water extract, *Biol. Control* 82 (2015) 61–68.
- [12] R. Prasanna, L. Nain, R. Tripathi, V. Gupta, V. Chaudhary, S. Middha, et al., Evaluation of fungicidal activity of extracellular filtrates of cyanobacteria—possible role of hydrolytic enzymes, *J. Basic Microbiol.* 48 (3) (2008) 186–194.
- [13] J.-D.J.M. Kim, Screening of cyanobacteria (blue-green algae) from rice paddy soil for antifungal activity against plant pathogenic fungi, *Mycobiology* 34 (3) (2006) 138–142.
- [14] M.A. Guzmán-Murillo, F. Ascencio, J.A. Larrinaga-Mayoral, Germination and ROS detoxification in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) under NaCl stress and treatment with microalgae extracts, *Protoplasma* 250 (1) (2012) 33–42, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s00709-011-0369-z>.
- [15] H. El Arroussi, A. Elbaouchi, R. Benhima, N. Bendaou, A. Smouni, I. Wahby, Halophilic microalgae *Dunaliella salina* extracts improve seed germination and seedling growth of *Triticum aestivum* L. Under salt stress, *Acta Hort.* 1148 (2016) 13–26, doi:<http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1148.2>.
- [16] B.M. Plaza, C. Gómez-Serrano, F.G. Acien-Fernández, S. Jimenez-Becker, Effect of microalgae hydrolysate foliar application (*Arthrospira platensis* and *Scenedesmus* sp.) on *Petunia x hybrida* growth, *J. Appl. Phycol.* (2018), doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s10811-018-1427-0>.
- [17] V. Barone, A. Baglieri, P. Stevanato, C. Broccanello, G. Bertoldo, M. Bertaggia, M. Cagnin, D. Pizzeghello, V.M.C. Moliterni, G. Mandolino, F. Fornasier, A. Squartini, S. Nardi, G. Concheri, Root morphological and molecular responses induced by microalgae extracts in sugar beet (*Beta vulgaris* L.), *J. Appl. Phycol.* 30 (2) (2017) 1061–1071, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s10811-017-1283-3>.
- [18] N. Blumenkrantz, G. Asboe-Hansen, New method for quantitative determination of uronic acids, *Anal. Biochem.* 54 (2) (1973) 484–489.
- [19] M. DuBois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28 (3) (1956) 350–356, doi:<http://dx.doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- [20] A. Llyod, N. Tudball, K. Dodgson, Infrared studies on sulphate esters III. O-sulphate esters of alcohols, amino alcohols and hydroxylated amino acids, *Biochim. Biophys. Acta* 52 (3) (1961) 413–419.
- [21] W. Claussen, Proline as a measure of stress in tomato plants, *Plant Sci.* 168 (1) (2005) 241–248, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.039>.
- [22] H.K. Lichtenthaler, C. Buschmann, Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy, *Curr. Protocols Food Anal. Chem.* (2001).
- [23] A. Allegre, J. Silvestre, P. Morard, J. Kallerhoff, E. Pinelli, Nitrate reductase regulation in tomato roots by exogenous nitrate: a possible role in tolerance to long-term root anoxia, *J. Exp. Bot.* 55 (408) (2004) 2625–2634, doi:<http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erh258> PubMed PMID: 15475378.
- [24] R.P. Singh, H. Srivastava, Regulation of glutamate dehydrogenase activity by amino acids in maize seedlings, *Physiol. Plant.* 57 (4) (1983) 549–554.
- [25] H. Elarroussi, N. Elmerissi, R. Benhima, I. Meftah El Kadmiri, N. Bendaou, A. Smouni, I. Wahby, Microalgae polysaccharides a promising plant growth biostimulant, *J. Algal Biomass Util.* (2016).
- [26] Z.H. Khan, M.M.A. Khan, T. Aftab, M. Idrees, M. Naeem, Influence of alginate oligosaccharides on growth, yield and alkaloid production of opium poppy (*Papaver somniferum* L.), *Front. Agric. China* 5 (1) (2011) 122–127, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s11703-010-1056-0>.
- [27] J. Castro, J. Vera, A. González, Moenne AJopgr, Oligo-carrageenans stimulate growth by enhancing photosynthesis, basal metabolism, and cell cycle in tobacco plants (var. Burley), *J. Plant Growth Regul.* 31 (2) (2012) 173–185.
- [28] S. Saucedo, R.A. Contreras, A. Moenne, Oligo-carrageenan kappa increases C and S assimilation, auxin and gibberellin contents, and growth in *Pinus radiata* trees, *J. For. Res.* 26 (3) (2015) 635–640, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s11676-015-0061-9>.
- [29] J. Silva, N. Dantas-Santos, D.L. Gomes, L.S. Costa, S.L. Cordeiro, M.S. Costa, N.B. Silva, M.L. Freitasll, K.C. Scortecilli, E.L. Leitelv, H.A.O. Rocha, Biological activities of the sulfated polysaccharide from the vascular plant *Halodule wrightii*, *Rev. Bras. Farmacogn.* 22 (1) (2012) 94–101.
- [30] K. Zhu, Y. Zhang, S. Nie, F. Xu, S. He, D. Gong, G. Wu, L. Tan, Physicochemical properties and in vitro antioxidant activities of polysaccharide from *Artocarpus heterophyllus* Lam. Pulp, *Carbohydr. Polym.* 155 (2017) 354–361, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.074> PubMed PMID: 27702522.
- [31] R. Rodriguez-Jasso, S. Mussatto, L. Pastrana, C. Aguilar, J. Teixeira, Chemical composition and antioxidant activity of sulphated polysaccharides extracted from *Fucus vesiculosus* using different hydrothermal processes, *Chem. Pap.* 68 (2) (2014), doi:<http://dx.doi.org/10.2478/s11696-013-0430-9>.
- [32] M.Fd.J. Raposo, R.M.S.C. De Moraes, B. de Moraes, a.m.J. Md Miranda, Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae, *Mar. Drugs* 11 (1) (2013) 233–252.
- [33] F. Bi, S. Iqbal, M. Arman, A. Ali, M.-u. Hassan, Carrageenan as an elicitor of induced secondary metabolites and its effects on various growth characters of

- chickpea and maize plants, *J. Saudi Chem. Soc.* 15 (3) (2011) 269–273, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2010.10.003>.
- [34] H. Siddiqui, S. Hayat, A. Bajguz, Regulation of photosynthesis by brassinosteroids in plants, *Acta Physiol. Plant.* 40 (3) (2018), doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-018-2639-2>.
- [35] S.D. Clouse, J.M. Sasse, Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development, *Annu. Rev. Plant Biol.* 49 (1) (1998) 427–451.
- [36] M. Idrees, M. Naeem, M. Alam, T. Aftab, N. Hashmi, Moinudin Khan MMA, L. Varshney, Utilizing the γ -irradiated sodium alginate as a plant growth promoter for enhancing the growth, physiological activities, and alkaloids production in *Catharanthus roseus* L, *Agric. Sci. China* 10 (8) (2011) 1213–1221, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s1671-2927\(11\)60112-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1671-2927(11)60112-0).
- [37] A. González, J. Castro, J. Vera, A.J. P.G.R. Moenne, Seaweed oligosaccharides stimulate plant growth by enhancing carbon and nitrogen assimilation, basal metabolism, and cell division, *J. Plant Growth Regul.* 32 (2) (2013) 443–448.

3. Synthèse de 1^{er} Article

Effet biostimulant des polysaccharides de microalgues sur les plantes de tomates : Croissance et répartition métabolique.

Les résultats de la présente étude ont montré que le traitement des plantes de la tomate par les PSs microalgues a amélioré le nombre de nœuds (NN), le poids sec des pousses (SDW) et la longueur des pousses (SS) de 75 %, 46,6 %, 25,26 % respectivement. De plus, le traitement aux PSs a entraîné une amélioration du contenu en caroténoïdes, chlorophylle, protéines, et des activités de la Nitrate Réductase (NR), de la NAD-Glutamate Dehydrogenase (NAD-GDH). 1 mg mL⁻¹ de *Porphyridium sp.* a augmenté significativement le contenu en caroténoïdes et l'activité NAD-GDH de 400 % et 200 % respectivement par rapport au témoin. De la même manière, *A. platensis* PS a amélioré l'activité de la chl a, chl b et NR de 90,1 %, 102,7 % et 88,34 % respectivement par rapport au témoin. En outre, il a été constaté que le traitement par PS a augmenté la teneur en protéines, avec 88,3 % sous 0,5 mg mL⁻¹ de traitement par PS de *D. salina*.

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par (Colla and Rouphael 2020; Ronga et al. 2019; Elarroussia et al. 2016), dans lesquelles ils ont constaté que les biostimulants PSs ont amélioré la croissance des plantes. Cette amélioration a été clairement démontrée en termes de poids et de taille des plantes, de nombre de feuilles, de longueur des racines, de teneur en chlorophylle et d'activité photosynthétique (Maroua Drira et al. 2021). Cette amélioration de la biomasse des plantes est favorisée par le potentiel biostimulant des PSs via la stimulation de l'activité photosynthétique, les activités des enzymes de la ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase et de la NAD(P)H-synthèse et l'amélioration de la biosynthèse des phytohormones, de l'activité d'absorption et l'assimilation de C, N et S (J. Yang et al. 2021; Castro et al. 2012).

L'augmentation de la croissance végétale et l'accumulation de biomasse en fonction des traitements des microalgues sont liées à l'augmentation de la biosynthèse de la chlorophylle (Mógor et al. 2018) (Faheed and Fattah 2008). Ces résultats sont en accord avec l'augmentation des pigments (chl a, chl b et caroténoïde) dans les feuilles traitées par les PSs.

L'amélioration de l'activité de la Nitrate Réductase (NR) et de la NAD-Glutamate Déshydrogénase (NAD-GDH) par les PSs microalgues a permis de stipuler que ces PSs ont la

capacité d'induire la voie de l'assimilation de l'azote. Dans l'assimilation du nitrate (NO_3^-), l'azote du NO_3^- est converti en nitrite (NO_2^-), une réaction catalysée par l'enzyme nitrate réductase. Ensuite, le nitrite est converti en ammoniac par l'enzyme nitrite réductase et finalement, l'ammonium est converti en acides aminés par les enzymes la glutamine synthétase GS et GOGAT (Taiz et al. 2017) et distribué dans la plante.

De manière générale, il est possible d'associer la plus grande croissance et l'accumulation de la masse des plantes de tomate à la stimulation de la synthèse des acides aminés et des pigments, favorisée par les traitements PSs. Les produits ayant une action stimulante sur les mécanismes de synthèse et de régulation des acides aminés, protéines et des enzymes de l'assimilation des nutriments favorisant la croissance et le développement des plantes (Nardi et al. 2016). Ainsi les mécanismes de synthèse et de régulation des hormones, des nucléotides et des polymères de la paroi cellulaire. Ils ont également un rôle dans le transport des nutriments dans la plante, principalement l'azote. Sans oublier les mécanismes de la tolérance de la plante aux stress abiotiques (Hildebrandt et al. 2015; Pratelli and Pilot 2014).

L'analyse métabolomique par GC-MS a également montré un changement dans les profils des lipides, des stérols et des alcanes. Certains précurseurs des stérols ont augmenté, comme le cholesta-6, 22, 24-triène, ce qui peut indiquer une augmentation de la biosynthèse des stérols et/ou des glycoalcoïdes stéroïdiens dans les plantes traitées. L'établissement du profil lipidique par GC-MS a montré que toutes les plantes traitées avec des polysaccharides bruts de microalgues présentaient des réarrangements du profil lipidique. Une diminution des stigmastérols et une accumulation de cholesta ont été observées. Certains stérols en quantités infimes, comme le campestérol chez *Arabidopsis thaliana*, sont des précurseurs de stéroïdes oxydés, agissant comme des hormones de croissance collectivement appelées brassinostéroïdes. Les BR ont plusieurs fonctions dans le métabolisme des plantes. Les BR régulent la photosynthèse en induisant la rubisco et l'anhydrase carbonique (Siddiqui, Hayat, and Bajguz 2018). La division et l'expansion cellulaires sont également régulées positivement par les BRs (Clouse and Sasse 1998). Jusqu'à présent, aucune étude n'a été réalisée sur l'impact des biostimulants sur les phytostérols des plantes. D'autre part, nous avons révélé que les alcanes à très longue chaîne ont chuté sous traitement PS. Les VLCA constituent, avec les acides gras à très longue chaîne et leurs dérivés, une cire de cuticule dans la feuille épidermique. Celle-ci a une fonction protectrice contre les stress abiotiques et biotiques.

En accord avec les travaux précédents utilisant les microalgues, grâce à leur composition et leurs effets sur la croissance, le rendement et la stimulation du métabolisme avec des améliorations biochimiques, les PSs microalgaux peuvent être considérées comme un biostimulant naturel, étant une nouvelle alternative biotechnologique pour la croissance des plantes d'une manière respectueuse de l'environnement.

CHAPITRE II



ARTICLE 2 :
L'EFFET BIOÉLICITEUR DES PSS MICROALGAUX
SUR L'INDUCTION DES VOIES DE LA DÉFENSE
DES PLANTES DE LA TOMATE, APPROCHES
BIOCHIMIAUES ET METABOLOMIAUES

1. Contexte

Les plantes poussent dans des environnements parfois compliqués et pour cela elles ont développé des systèmes immunitaires pour faire face à de multiples stress biotiques et abiotiques. La première phase de la résistance aux maladies consiste à détecter ponctuellement les molécules de signalisation (W. Zhang et al. 2018). Les plantes sentent les motifs moléculaires associés aux microbes (MAMP) qui sont des motifs moléculaires conservés partagés par des micro-organismes nocifs. Parallèlement, les plantes peuvent également identifier indirectement les agents pathogènes, connus sous le nom de "motifs moléculaires associés aux dommages" (DAMP) (De Lorenzo et al. 2011). Selon des études antérieures, les DAMPs et les MAMPs présentent des avantages pour l'immunité des plantes.

Les MAMPs ou DAMPs activent différentes voies de transduction du signal et l'expression des gènes de défense (Safaie-Farahani and Taghavi 2017), qui seront accompagnés par la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Smirnoff and Arnaud 2019) et d'oxyde nitrique (NO) (Gaupels et al. 2008), et la production de l'acide salicylique (SA) (Pieterse et al. 2012), d'acide jasmonique (JA) et d'éthylène (Ota et al. 2019). Chez *Arabidopsis*, l'infection par *Erysiphe orontii* a entraîné une induction de SA environ cinq fois supérieure (Wildermuth et al. 2001). Le SA s'est accumulé dans les feuilles d'*Arabidopsis* après le traitement des MAMPs et le mécanisme médié par le SA s'est développé comme une régulation cruciale de la défense déclenchée par les MAMPs (Tsuda et al. 2008). Le gène PR1 a été reconnu comme un gène marqueur de la voie de signalisation du SA, dont l'expression augmente avec l'activation de la voie du SA (van Hulten et al. 2006). Par exemple, l'acide oligogalacturonique (OG) est l'un des DAMPs végétaux les plus étudiés, qui peut déclencher un large éventail de défenses immunitaires dans différentes plantes (De Lorenzo et al. 2018). Les oligosaccharides de chitosan (COS), en tant que MAMPs représentatifs (Yin, Zhao, and Du 2010), se sont avérés avoir des effets immunitaires sur diverses maladies, telles que celles causées par *Fusarium sambucinum* (P. Li, Linhardt, and Cao 2016), *Phytophthora infestans* (van Aubel et al. 2018) et le *Southern rice black-streaked dwarf virus* (SRBSDV) (A. Yang et al. 2017).

L'induction de la résistance des plantes par les polysaccharides des macroalgues est une méthode efficace de contrôle des maladies et contre les contraintes environnementales qui est liée à l'activation ou à l'amélioration de plusieurs mécanismes de défense des plantes tels que la régulation positive de l'expression des gènes de défense impliqués dans la réponse à une large

gamme de stress abiotiques et biotiques, et l'induction du système antioxydant et la production de métabolites secondaires (Marwa Drira, Elleuch, et al. 2021). L'Alginate Oligosaccharide (AOS) est un hydrate de carbone biologique naturel extrait d'algues. Dans notre étude, *Arabidopsis thaliana* a été utilisé pour évaluer la résistance induite par l'AOS à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pst DC3000). La résistance a été considérablement améliorée à 25 mg/L dans le type sauvage (WT), montrant la diminution de l'indice de maladie et des colonies de bactéries, l'éclatement de ROS et NO, l'expression de transcription élevée des gènes de résistance PR1 et l'augmentation du contenu d'acide salicylique (SA). Ce qui implique que l'AOS induit la résistance à la maladie en injectant Pst DC3000 après trois jours de traitement en stimulant la voie de l'AS (C. Zhang et al. 2019).

Concernant les microalgues, malgré cette grande diversité des polysaccharides et leurs activités biologiques remarquables, immunomodulatrices, anti-inflammatoires (Mutanda et al. 2011), hypocholestérolémiques (Temraleeva et al. 2016), antimicrobiennes et antivirales (Hlima et al. 2021; Laroche 2022), leur exploitation comme des molécules bioactives, qui jouent le rôle d'un éliciteur de la défense des plantes, reste limitée dans deux études. La première menée par (EL Arroussi et al. 2018) dans laquelle ils ont constaté que l'application d'EPS de *Dunaliella salina* sur des plants de tomates (*Solanum lycopersicum*) a atténué le stress salin causé par la présence de NaCl. Tout récemment, (Marwa Drira, Mohamed, et al. 2021) ont évalué l'effet du prétraitement avec de l'EPS de *P. sordidum* pour atténuer les dommages causés par le champignon *Fusarium oxysporum* sur les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. La pulvérisation foliaire avec une solution contenant de l'EPS a réduit le développement des lésions nécrotiques et la gravité de la maladie causée par *F. oxysporum*. L'application d'EPS stimule les réponses de défense telles que la production de H₂O₂, l'accumulation de la phénylalanine ammonia-lyase et la régulation positive des gènes marqueurs liés à la défense.

Dans ce contexte cette étude décrit l'effet éliciteur des PSs microalgues sur les voies de la défense des plantes de la tomate.

L'étude il a été réalisé sur deux volets :

Volet 1. L'évaluation de l'effet des PS obtenus à partir de microalgues et de cyanobactéries « *D. salina* MS002, *P. tricornutum* MS023, *Porphyridium* sp. MS081, *Desmodesmus* sp, *D. salina* MS067 et *A. platensis* MS001 » sur les marqueurs biochimiques et métaboliques liés aux voies de défense des plants de tomates. Il s'agit des marqueurs concernant :

- Les activités enzymatiques des protéines PR (Glucanase et Chitinase), phénylalanine ammoniac lyase (PAL) et Peroxydase (POX). Le contenu en protéines, en H₂O₂ et en polyphénols.
- Les marqueurs lipidomiques générés par GC-MS, lipides, stérols, alcanes, les alcènes et autres métabolites.

Le deuxième volet est abordé dans le contexte du 3^{ème} article.



scientific reports

OPEN

Evaluation of microalgae polysaccharides as biostimulants of tomato plant defense using metabolomics and biochemical approaches

Farid Rachidi^{1,2}, Redouane Benhima¹, Yassine Kasmi¹, Laila Sbabou² & Hicham El Arroussi^{1,3✉}

Microalgal polysaccharides (PSs) may be an effective elicitor agent that can efficiently protect plants against biotic stresses. In this study, we investigated the effect of PS obtained from microalgae and cyanobacteria (*D. salina* MS002, *P. tricornutum* MS023, *Porphyridium* sp. MS081, *Desmodesmus* sp., *D. salina* MS067 and *A. platensis* MS001) on the biochemical and metabolomics markers linked to defense pathways in tomato plants. The phenylalanine ammonia lyase (PAL), chitinase, 1,3-beta-glucanase and peroxidase (POX) activities have been improved in tomato plants leaves treated by polysaccharides extracted from *P. tricornutum* (238.26%); *Desmodesmus* sp. (19.95%); *P. tricornutum* (137.50%) and *Porphyridium* sp. (47.28%) respectively. For proteins, polyphenols and H₂O₂, the maximum effect was induced by *D. salina* 067 (55.01%), *Porphyridium* sp. (3.97%) and *A. platensis* (35.08%) respectively. On the other hand, Gas Chromatography-mass spectrometry (GC-MS) metabolomics analysis showed that PSs induced the modification of metabolite profile involved in the wax construction of tomato leaves, such as fatty acids, alkanes, alkenes and phytosterol. PS treatments improved the accumulation of fatty acids C16:3, C18:2 and C18:3 released from the membrane lipids as precursors of oxylipin biosynthesis which are signaling molecules of plant defense. In addition, PS treatment induced the accumulation of C18:0 and Azelaic acid which is a regulator of salicylic acid-dependent systemic acquired resistance. However, molecular and metabolic studies can determine more precisely the mode of action of microalgal polysaccharides as biostimulants/elicitors plant defense.

Plants in their environment are exposed to diverse biotic and abiotic stresses¹. Traditionally, synthetic pesticides and fertilizers are almost indispensable for the control of plant diseases and crop production. The excessive use of these synthetic chemical products is of global concern, because of their harmful effect on human health and the environment (European Commission 2012)^{2,3}. In addition, the overuse of chemical products is the main cause of resistance development in pathogens⁴. In this context, the promotion of eco-friendly alternatives appeared necessary for the reduction of the use of chemicals in agriculture and hence of the attenuation of their environment effect^{5,6}.

In the last decades, the sustainable agriculture has gained increasing interest on integrated crop management strategy where a promote the use of alternatives tools such as crop rotation, planting time, tillage and the use of biological products^{3,7,8}. A lot of attention has been focused on the development of plant biostimulants to improve crop growth, yield and quality by enhancing plant nutrition, reducing abiotic stress impact and promoting plant growth^{7,9,10}. Detailed reports are available on the induction of defense resistance in plants via a variety of biological inducers such as plant extracts, essential oils, bacteria and fungus, algal extracts and polysaccharides¹¹. These elicitors have no direct toxic effect on pathogens and pests, but they have the ability to induce signaling

¹Green Biotechnology Center, MASCI (Moroccan Foundation for Advanced Science, Innovation & Research), Rue Mohamed Al Jazouli Madinat Al Irfane, 10 100 Rabat, Morocco. ²Microbiology and Molecular Biology Team, Center of Plant and Microbial Biotechnology, Biodiversity and Environment, Faculty of Sciences, Mohammed V University, 4 Avenue Ibn Battouta, B.P. 1014, Rabat, Morocco. ³Agrobiosciences Program, University Mohamed 6 polytechnic (UM6P), Benguerir, Morocco. ✉email: h.elarroussi@mascir.com

Strains	Biomass (g L ⁻¹)	PS (%/biomass)	Total sugars (%/PS)	Sulfate (%/PS)	Uronic acid (%/PS)	Protein (%/PS)	Amino acid (%/PS)	Beta Glucan (%/PS)
<i>A. platensis</i>	1.22	2.590 ± 0.40	17.275 ± 1.05	5.306 ± 0.37	3.602 ± 1.58	2.746 ± 0.21	0.206 ± 0.0	0.149
<i>D. salina</i> 002	1.13	4.103 ± 0.13	33.050 ± 0.92	11.541 ± 0.92	23.951 ± 2.62	4.202 ± 0.02	0.083 ± 0.0	0.008
<i>Porphyridium</i> sp.	0.6	5.529 ± 0.15	35.350 ± 0.05	10.427 ± 0.54	13.808 ± 5.45	2.701 ± 0.01	0.017 ± 0.0	0.108
<i>P. tricornutum</i>	0.45	12.70 ± 2.66	5.003 ± 0.00	6.751 ± 0.59	32.331 ± 3.14	22.068 ± 0.13	0.019 ± 0.0	0.698
<i>Desmodesmus</i> sp.	0.42	7.2 ± 0.6	5.04 ± 0.00	5.27 ± 0.10	42.865 ± 10.4	11.850 ± 0.08	0.196 ± 0.0	0.043
<i>D. salina</i> 067	0.91	6.17 ± 0.44	5.0 ± 0.00	4.051 ± 0.24	23.951 ± 5.15	15.744 ± 0.09	0.181 ± 0.0	0.037

Table 1. Biomass production and composition of polysaccharides extracted from Moroccan microalgae.

pathways related to plant defense against biotic and abiotic stresses¹, which makes them amenable as replacement for traditional agrochemicals in a sustainable crop production system. Algal polysaccharides are macromolecules with structural complexity linked to chemical groups with the high potential biological activities make algae polysaccharides an ideal bioresource of plant resistance inducers¹².

Microalgae are photosynthetic eukaryotic and prokaryotic microorganisms with great biological and biochemical diversity, which have a potential as a promising bio-resource for different applications such as pharmaceutical, nutraceutical, food and feed, aquaculture, bioenergy and the environment^{13–19}. In the agriculture field, the algal polysaccharide have a biostimulant activities of plant growth, nutrients uptake and biotic and abiotic stresses tolerance^{16,20–24}. Recently studies, have demonstrated the biostimulant effect of microalgal extracts on the seed germination, seedling growth and yields of Lettuce and tomato plants^{24–28}. However, until now, the use of microalgal extracts as biostimulants of natural plant defense mechanisms related to abiotic and biotic stresses is an undergoing initiation^{24,28,29}. In the same way²⁴, have demonstrated that *D. salina* exopolysaccharide have the potential to induce the metabolic and biochemical pathways related to natural plant defense in tomato plants under salt stress. Lipopolysaccharides and exopolysaccharides are essential structures maintained in pathogenic, non-pathogenic and saprophytic microorganisms, under the name of MAMPS/PAMPS (microbe-/pathogen-associated molecular patterns). These molecules are rapidly detected by the membrane receptors of the host plant, in order to induce various defense responses³⁰.

Divers studies have demonstrated the potential of different extracts and metabolites—among them polysaccharides—of microalgae as biostimulants and biofertilizers of plant growth and crop production^{12,26,29,31–34}. In the present study, we investigated polysaccharides Extracts of 6 Microalgae and Cyanobacteria species for their Bioelicitors effects on the different biochemical and metabolomics pathways related to the plants defense to biotic and abiotic stress of *Solanum lycopersicum* L. The aim of this research is to demonstrate the potential of microalgae polysaccharides as new bioactive materials for bioproduct development in agriculture.

Results

Microalgae culture and polysaccharides characterization. As shown in Table 1 microalgae growth differed between strains, *A. platensis* showed the fastest growth, followed by *D. salina* MS067, *D. salina* MS002, *Porphyridium* sp., *P. tricornutum*, and *Desmodesmus* sp. with the biomass production of 1.22, 1.13, 0.91, 0.60, 0.45 and 0.42 g L⁻¹ respectively (Table 1). The choice of these strains for our project was based on the adaptation and the feasibility of their culture at large-scale. The microalgae polysaccharide content was recorded as 12.7%, 5.52%, 4.10% and 2.58% for *P. tricornutum*, *Porphyridium* sp., *D. salina* 002 and *A. platensis* respectively, while their partial characterization indicated that they were composed of neutral sugars (5.0–35.350%), sulfates (4.051–11.541%), uronic acids (3.602–42.865%), proteins (2.701–22.068%), amino acids (0.017–0.206%) and β -glucans (0.008–0.698%). *P. tricornutum* exhibited the maximum production of polysaccharides (12.7%) composed of 32.3%, 6.75% and 0.698% of uronic acid, sulfate content and beta-glucan content respectively. Whereas *D. salina* and *Porphyridium* sp. polysaccharides exhibited the highest sulfate content with 11.5% et 10.4% respectively (Table 1, Supplementary Fig. S1).

Microalgal polysaccharides effect on tomato plants defense pathways. To investigate the effect of microalgae crude PSs, different enzymatic and biochemical markers were used in this study such as PRs proteins (Chitinase and 1,3- β -Glucanase) and PAL (Phenylalanine-Ammonia-Lyase) activities, ROS (H₂O₂) forms, peroxidase (POX) activity and polyphenols content.

Microalgal polysaccharides effect on protein content, PAL, chitinase and 1,3 β -glucanase activities. The results in Fig. 1a show that all PS treatments had a highly significant ($p < 0.05$) effect on protein content in treated plants compared to non-treated control plants. The maximum effect was induced by *D. salina* 067 polysaccharides with 55.01% improvement compared to the control.

The enzymatic activity of PAL is highly significant ($p < 0.05$) in plants treated with different PS extracts (Fig. 1b). The percentages of minimal and maximal improvement (82.46% and 238.26%) in treated plants were induced by Laminarin and *P. tricornutum* polysaccharides respectively. In the same way, the chitinase activity showed the high significant ($p < 0.05$) enhancement in treated plants compared to control plant (Fig. 1c). The chitinase activity induced by polysaccharides from *Desmodesmus* sp., *D. Salina* 067, *Porphyridium* sp., *P. tricornutum*, *D. salina* 002 and *A. platensis* was increased by 19.95%, 18.63%, 11.36%, 7.51%, 7.26% and 6.35% respectively compared to control plants (Fig. 1c). Results presented in Fig. 1d, shows significant ($p < 0.05$) effect

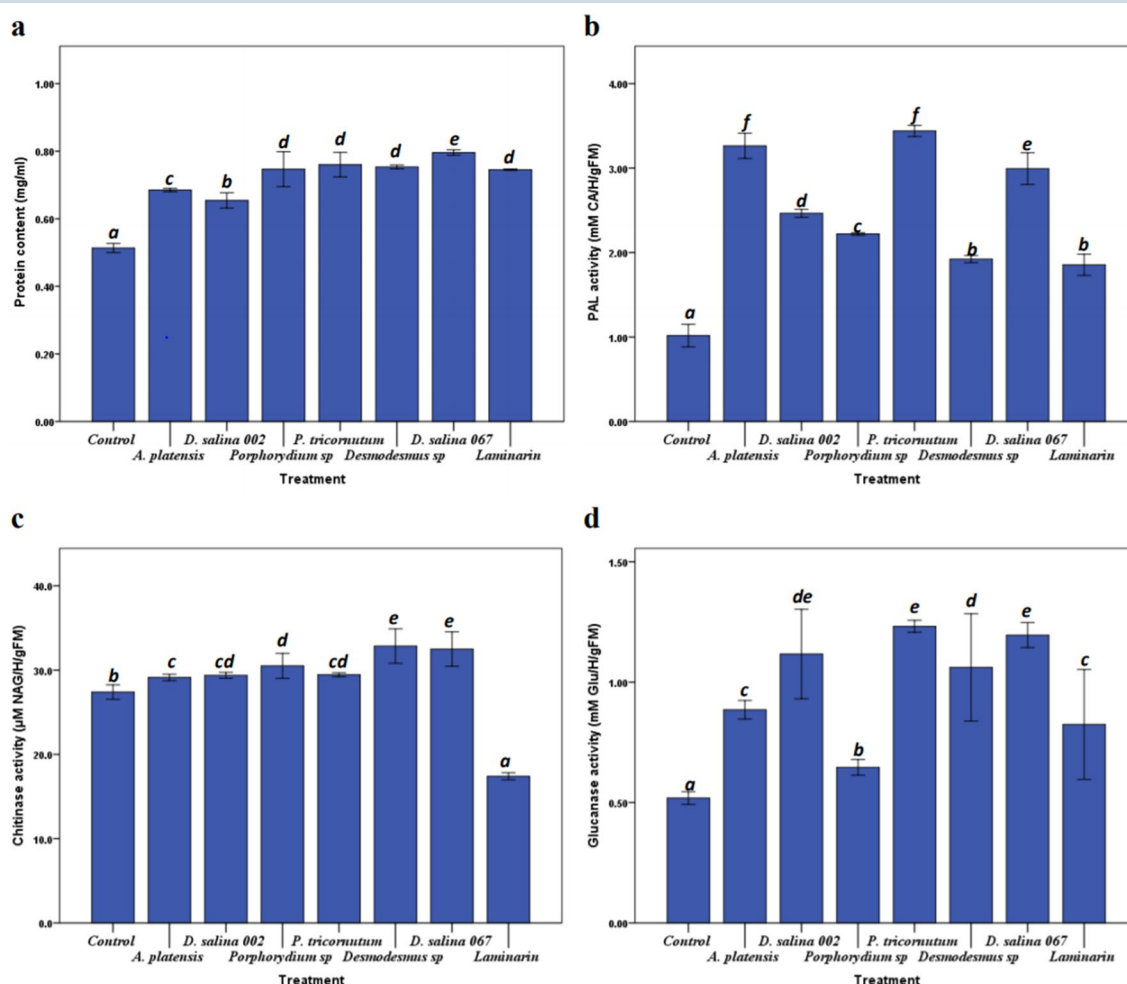


Figure 1. The effect of crude PS on protein content (a), PAL (b), chitinase (c) and β -1,3-Glucanase (d), activities. Tomato plants were injected with 1 mg mL^{-1} of PS. H_2O and Laminarin (1 mg mL^{-1}) were used as negative and positive controls respectively. Values are the mean ($\pm$ SE) of five replicates. Different letters indicate significant difference between treatments ($p < 0.05$) according to Turkey-test, One-way ANOVA.

of polysaccharides on 1,3- β -Glucanase activity compared to the control plants. It was also observed that the maximum percentage improvement (137.50%) was induced by *P. triocnutum* polysaccharides followed by *D. salina* MS067 and *D. salina* MS002, which had a highly significant ($p < 0.05$) effect compared to Laminarin-treated plants (positive control).

Microalgal polysaccharides effect on peroxidase activity, H_2O_2 and Polyphenols. The results presented in Fig. 2a, shows that the plants treated by PS of *Porphyridium* sp., *P. triocnutum*, *D. salina* 067 and *D. salina* MS002 had a very significant ($p < 0.05$) effect on peroxidase activity compared to controls plants. The maximum improvement of peroxidase activity was noted in plants treated by *Porphyridium* sp. polysaccharides with percentage difference of 41% compared to non-treated plants. The evaluation of the effect of microalgae polysaccharides on oxidative burst was estimated by the determination of the amount of H_2O_2 accumulated in tomato plants leaves. Figure 2b, shows that all PS treatments except that of *P. triocnutum*, had a significant ($p < 0.05$) effect on H_2O_2 content in tomato plants leaves. On the other hand, *A. platensis* PS treatment had a much higher effect on H_2O_2 content compared to the Laminarin treatment -positive control- and with a percentage improvement of 35.08% compared to control plants. While, the polyphenol compounds in tomato plants leaves showed little improvement in plant treated by microalgae polysaccharides compared to control plants (Fig. 2c).

GC-MS metabolomics analysis of tomato plants' response to microalgae polysaccharide treatment: For Metabolic fingerprinting, the GC-MS was used to identify metabolomic change in tomato plants under different microalgae polysaccharides treatment. The Fig. 3 shows a significant redistribution of several metabolites in treated plants such as lipids, sterols, alkanes, alkenes and other molecules. The lipids, sterols, alkanes and alkenes content in tomato leaves were improved by (31.22–77.79%), (79.40–97.11%), (8.20–27.75%) and (57.11–88.70) respectively compared to non-treated plants. It can be seen that the distribution of the metabolites was related to the nature of the polysaccharide. Also, the maximum biosynthesis of lipids, the

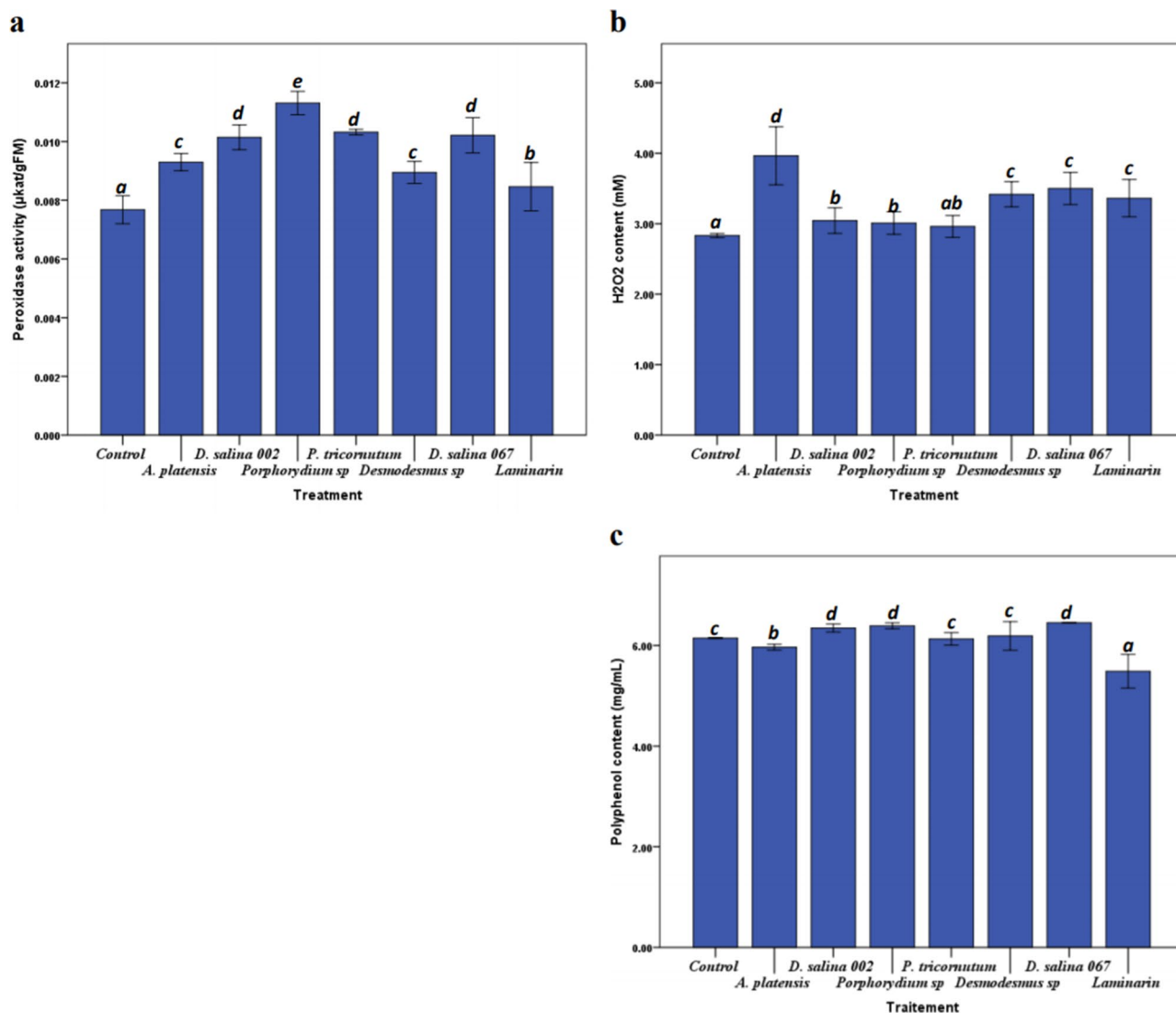


Figure 2. Peroxidase activity (a), H₂O₂ (b) and polyphenols content (c) in the tomato plants leaves after Polysaccharide treatment. Tomato plants were injected with 1 mg mL⁻¹ of PS, and H₂O or Laminarin (1 mg mL⁻¹) as a negative and positive controls respectively. Values are the mean (±SE) of five replicates. Different letters indicate significant difference between treatments ($p < 0.05$) according to Turkey-test, One-way ANOVA.

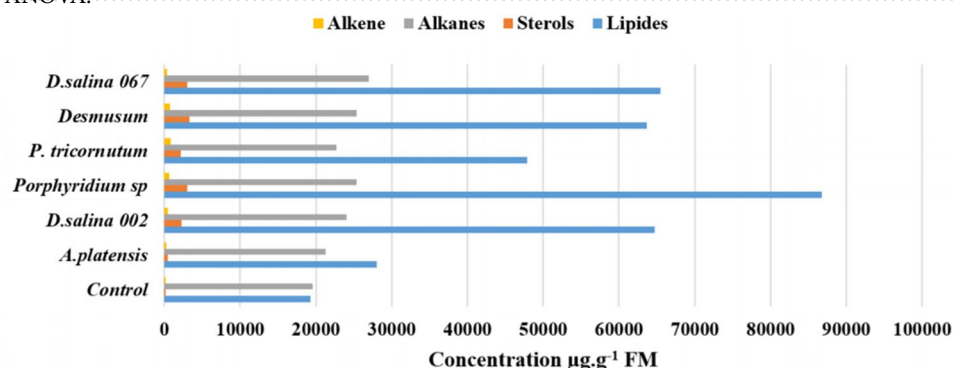


Figure 3. Metabolites profile of tomato plants leaves treated by polysaccharides. Tomato plants were injected with 1 mg mL⁻¹ of PS, and H₂O as Control.

sterols, alkanes and alkenes were induced by the PS extracts obtained from *Porphyridium* sp., *Desmodesmus* sp., *D. salina* 067 and *P. tricornutum* respectively (Fig. 3).

Microalgae polysaccharides effect on lipid and sterol profiles in tomato plants:. Lipid profile analysis using GC-MS revealed 23 FAMES dispersed over 3 categories of fatty acids namely: Very long chain fatty acids (VLCFA), unsaturated fatty acids (UFA) and saturated fatty acids (SFA). Fatty acids highly induced by the various PS treatments were linolenic acid (C18:3), palmitic acid (C16:0), roughanic acid (C16:3) and stearic acid (C18:0), with percentage of 50%, 30%, 5% and 10% respectively (Table 2). Meanwhile, VLCFAs included behenic acid (C22:0), tricosylic acid (C23:0), and lignoceric acid (C24:0) (Table 2).

Some changes in the fatty acid profile were also recorded after treatment with Microalgae PS (Table 2). PS treatment triggered the disappearance of 9-Hexadecenoic acid methyl esters which were present only in control plants, but induced the biosynthesis of new molecules such as Nonanoic acid, 9-oxo-, methyl ester, Pentanoic acid, 4-oxo-, methyl ester, Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-, methyl ester, Methyl 10-trans, 12-*cis*-octadecadienoate and Methyl 9-*cis*, 11-trans-octadecadienoate.

On the other hand, microalgae PS treatment induced a remodulation of the distribution of sterol metabolites in tomato plant leaves. Generally, there was a disappearance of Stigmastan-3,5,22-trien and Stigmasta-3,5-diene in all treated plants compared to control plants. PS treatment induced the synthesis of new sterol metabolites namely: Cholesta-3,5-diene; Stigmastan-6,22-dien, 3,5-dedihydro-; beta.-Sitosterol; Cholesta-6,22,24-triene, 4,4-dimethyl-; Stigmasteryl tosylate and Cholest-5-en-3-ol (3.beta.)-,nonanoate. The synthesis of these latter depends on the composition of the PS extract used. For example, stigmasteryl tosylate, was highly accumulated (1747.20 $\mu\text{g g}^{-1}$ FM) in plants treated with *Desmodesmus* sp. polysaccharides. Whereas, Stigmastan-6,22-dien, 3,5-dedihydro, Cholesta-6,22,24-triene, 4,4-dimethyl, Stigmastan-6, 22-dien, 3,5-dedihydro, Stigmastan-3,5,22-trien, and beta.-Sitosterol were induced in plants treated by *D. salina* 067, *Porphyridium* sp., *P. tricornutum*, *D. salina* 002 and *A. platensis* polysaccharides respectively (Table 2).

Microalgae polysaccharide effect on alkanes and alkenes profile. The results presented in Table 3 show that the effect of microalgae PS treatment on the profile of alkanes and alkenes in tomato plants. For Alkanes, heptadecane was accumulated to concentrations reaching 2866.68, 2673.91, 1743.36 and 1716.06 $\mu\text{g g}^{-1}$ of fresh biomass of the treated plants with crude polysaccharides of *Desmodesmus* sp., *Porphyridium* sp., *D. salina* MS067, *D. salina* MS002 respectively compared to control plants (351 $\mu\text{g g}^{-1}$). While a new biosynthesis of eicosane had been induced in plants treated by PS from *D. salina* MS067, *P. tricornutum*, *D. salina* MS002, *A. platensis*, and *Desmodesmus* sp. with 2590.71, 1622.30, 1034.08, 840.30 and 161.03 $\mu\text{g g}^{-1}$ of biomass plants respectively. Also, our results show synthesis of Very long chain alkane (VLCA), C25-C33 in plants treated with polysaccharides which were not observed in control plants. In the same way, PS treatment induced the accumulation of 7-Hexadecene and 1-Octadecene in the treated plants. The most synthesized alkene in treated plants was 1-Octadecene (503.18 $\mu\text{g g}^{-1}$), induced by PS from *Desmodesmus* sp., Followed by 9-Nonadecene (399.36 $\mu\text{g g}^{-1}$), then Z-8-Hexadecene (286 $\mu\text{g g}^{-1}$) and cetene (279.08 $\mu\text{g g}^{-1}$), these alkenes were induced respectively by *P. tricornutum*, *D. salina* 067 and *Porphyridium* sp.

Other metabolites. The results presented in Table 4, shows that the microalgae PS treatment induced the synthesis of new metabolites and the disappearance of other metabolites detected in untreated plants. All of the studied microalgae PS inhibited the biosynthesis of Isopropyl triacontyl ether, while they induced the synthesis of other molecules such as Neophytadiene, E-14-Hexadecenal, phenol, 4-methoxy-2-[2-(5-nitro-pyridinyl) diazenyl]- and Isopropyl octacosyl ether and others as shown in (Table 4).

Discussion

To further evaluate the effect of microalgae polysaccharides on plant tolerance against stress, a biochemical, enzymatic and metabolomics studies on treated plants compared to control plants were performed. In the present study, a bio-elicitor, laminarin, was used as a positive control for its potential to induce plant defense responses; improvement of resistance to viral, fungal and bacterial infections, induction of accumulation of salicylic acid (SA) and induces expressions of ethylene (ET)- and SA-dependent PR proteins^{35,36}. In general, it was observed in this study that certain polysaccharides treatments had a similar effect compared to laminarin, however, we see that other treatments have a highly significant effect on studied parameters. For instance, all the treatments exhibited great effect on chitinase, peroxidase, and polyphenols; whereas all treatments except *D. salina* 067 had great effect on PAL activity. On the other hand, polysaccharides extracted from *P. tricornutum* and *D. salina* induced significantly Glucanase activity; and *A. platensis* polysaccharides enhance H₂O₂ production. From these results, it can be concluded that microalgae PS can be good candidates for the induction of plant defense. The activities of PAL, POX, 1,3- β Glucanase and chitinase activities and H₂O₂ content are frequently studied in plant defense research and are known to correlate with the occurrence of induced resistance, as well as defending the host plant against microbial phytopathogens³⁷.

Our result showed a strong positive correlation between peroxidase (POX) and PAL activities in response to microalgae polysaccharides treatment (Fig. 4a,b). These enzymes are key defense proteins related to plants resistance to diseases³⁸. PAL, is the key enzyme of the phenylpropanoid synthesis pathway, and increase in PAL activity is accompanied by the biosynthesis of active metabolites such as Phytoalexins, lignins, flavonoids, phenolics compounds and salicylic acid³⁹⁻⁴¹. Another study has shown seaweeds alginoligosaccharides could induce the enzyme activities of PAL and POX in rice plants as defense against *Magnaporthe grisea*⁴². Similarly, the treatment of Olive and Tomato plants by Ulvan significantly induced PAL activities against *Verticillium* wilt and *lycopersicicum* respectively^{43,44}. Other studies concluded that there is a correlation and synergy between

		Control	<i>A. platensis</i>	<i>D. salina</i> 002	<i>Porphyridium</i> sp.	<i>P. tricornutum</i>	<i>Desmodesmus</i> sp.	<i>D. salina</i> 067
Lipids ($\mu\text{g g}^{-1}$)								
Azelaic acid	C9:0	41.92	146.66	197.80	119.48	147.91	200.17	167.70
Lauric acid	C12:0	97.49	395.19	563.56	478.36	322.19	409.64	431.97
Myristic acid	C14:0	73.63	326.23	453.98	439.97	355.99	457.66	402.26
Palmitic acid	C16:0	5843.54	6935.68	15,763.06	24,434.95	15,946.61	21,679.42	19,086.40
Roughanic acid	C16:3	1304.35	2578.48	4848.55	5445.68	2576.28	3408.04	4179.01
Margaric acid	C17:0	364.80	631.64	1183.71	2393.29	1046.90	1324.10	1375.93
heptadecatrien-oate	C17:3	0.00	238.68	4121.15	0.00	0.00	0.00	0.00
Stearic acid	C18:0	1586.44	1506.31	3697.84	9229.94	3559.71	5338.57	5703.57
Linoleic acid	C18:2	107.59	0.00	0.00	0.00	290.99	0.00	0.00
Linolenic acid	C18:3	9389.95	14,068.73	31,142.12	40,959.72	21,391.22	27,192.53	30,833.82
Nonadecylic acid	C19:0	0.00	0.00	285.90	0.00	0.00	0.00	0.00
Arachidic acid	C20:0	164.04	330.37	603.88	934.11	606.33	980.57	810.08
Eicosatrienoic acid	C20:3	0.00	175.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
heneicosylic acid	C21:0	0.00	0.00	0.00	244.97	127.76	0.00	0.00
Behenic acid	C22:0	92.25	220.70	357.39	588.86	408.30	678.46	511.46
Tricosylic acid	C23:0	0.00	70.66	102.65	0.00	117.95	181.00	133.78
Lignoceric acid	C24:0	69.81	190.21	431.75	747.03	448.26	722.36	632.84
Lipid derivatives ($\mu\text{g g}^{-1}$)								
9-Hexadecenoic acid, methyl ester		0.00	0.00	79.13	0.00	0.00	0.00	0.00
Nonanoic acid, 9-oxo-, methyl este		0.00	0.00	0.00	0.00	118.26	143.42	208.67
Pentanoic acid, 4-oxo-, methyl ester		142.98	213.71	0.00	0.00	0.00	961.30	0.00
Hexadeca-noic acid, 2-hydroxy-, methyl ester		0.00	0.00	930.06	0.00	0.00	0.00	1010.16
Methyl 10-trans,12-cis-octadecadi-enoate		0.00	0.00	0.00	0.00	395.57	0.00	0.00
Methyl 9-cis,11-trans-octadeca-dienoate		0.00	0.00	0.00	794.14	0.00	0.00	0.00
Total		19,278.79	28,029.14	64,762.54	86,810.50	47,860.24	63,677.24	65,487.65
Total ($\mu\text{g g}^{-1}$)								
VLCFA		162.06	481.56	891.79	1335.89	974.51	1581.82	1278.08
UFA		10,801.89	17,061.80	40,111.82	46,405.40	24,258.49	30,600.57	35,012.82
SFA		8171.86	10,272.07	22,749.74	38,275.07	22,113.41	30,390.14	27,977.91
Sterols ($\mu\text{g g}^{-1}$)								
Stigmas-tan-3,5,22-trien		55.70	0.00	1032.85	0.00	0.00	0.00	0.00
Stigmasta-3,5-diene		39.04	74.84	875.03	1023.03	710.37	1017.92	997.53
Cholesta-3,5-diene		0.00	29.23	366.53	639.52	368.08	0.00	551.78
Stigmastan-6,22-dien, 3,5-dedihydro-		0.00	151.18	0.00	0.00	1129.49	0.00	1447.17
beta.-Sitosterol		0.00	204.77	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cholesta-6,22,24-triene, 4,4-dimethyl-		0.00	0.00	0.00	1353.16	0.00	0.00	0.00
Stigmasteryl tosylate		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1747.20	0.00
Continued								

	Control	<i>A. platensis</i>	<i>D. salina</i> 002	<i>Porphyridium</i> sp.	<i>P. tricornutum</i>	<i>Desmodesmus</i> sp.	<i>D. salina</i> 067
Cholest-5-en-3-ol (3.β.)-, nonanoate	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	516.56	0.00
Total	94.75	460.02	2274.40	3015.71	2207.95	3281.69	2996.47

Table 2. Lipids profile of tomato plants leaves treated by microalgae polysaccharides.

the stimulation of PAL and POX activities and the induction of tomato resistance to *Fusarium oxysporum* f, the causative agent of wilt disease, after plant treatment by *Pseudomonas fluorescens* Pf1 isolates⁴⁵.

In response to a pathogen attacks, plants accumulate reactive oxygen species (ROS), the main chemical element of oxidative bursts⁴⁶. Faced with the oxidative burst induced by a high accumulation of H₂O₂, plants have mechanisms that allow them to keep the H₂O₂ levels in homeostasis. The latter is controlled by detoxifiers or scavenging enzymes including; SOD (Superoxide dismutase), CAT (Catalase), APX (Ascorbate peroxidase) and POX (peroxidase)^{47–49}. These enzymes coordinate the elimination of different ROS⁵⁰. This explains our result, which revealed a negative correlation between peroxidase activity and H₂O₂ accumulation (Fig. 4a,b). That is to say that in the first step, the PS treatment induced the synthesis of H₂O₂, then at a certain time, H₂O₂ levels reached a high concentration which induced the synthesis of POX, in our case, Guaiacol peroxidase, which is found in different cell compartment, capable of producing phenoxy compounds by the reduction of H₂O₂. The polymerization of phenoxy compounds lead to the formation of cell wall components such as lignin⁵¹. On the other hand, peroxidases are involved in other physiological processes, namely the synthesis of phytoalexins, the formation of suberin, cross-linking of cell wall components and the synthesis of nitrogen species reagents (RNS) and the induction of the hypersensitive response, which is the programmed death of the host cells in the site of infection, for the limitation of pathogen propagation and the induction of the pathogenesis related proteins⁵². The transformation of phenolic compounds by peroxidases also explains our results which we noted that the high accumulation of POXs -after microalgae polysaccharides treatment- accompanied by a low accumulation of phenolic compounds in treated plants (Fig. 2a,c).

glucanase (Glu) and chitinase (Chi) are PR proteins which have the first enzymatic attacks of the plant against pathogens by degrading β-1,3-glucan and chitin present in the fungal cell wall, thus stimulating host defense responses³⁸. These two enzymes intervene in the cases of the wounds and the infections by phytopathogens separately or in combination by reinforcing the defense of the plant against the stresses⁵³. Our results showed that there is a strong accumulation of PR Proteins; Chitinase and Glucanase with a highly significant positive correlation (Fig. 4a,b). This correlation explains why the PS treatments are able to induce both the acquired systemic resistance (SAR) and the induced systemic resistance (ISR). The accumulation of chitinase is accompanied by the overexpression of its gene (PR3) which occurs in the jasmonic acid and ethylene compounds linked to the ISR. The induction of glucanase is ensured by the overexpression of its gene (PR2). The latter, the SA-dependent marker gene, is involved in the induction of SAR^{54–56}. Several studies have shown that there is a great synergy between the accumulation of these two hydrolytic enzymes and the induction of plant defense by pathogens. The study done by⁵⁷, showed that treatment of tobacco plants with sulfated Fucan Oligosaccharides which are reported as elicitors of the local and systemic response against *Tobacco Mosaic Virus*, strongly induced the synthesis of Glucanase and Chitinase. In addition, the enhancement of Chitinase and Glucanase activities after treatment of tomato plants with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 induced their resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*⁴⁵.

The PCA analysis revealed that the first three components accounted for 43.4%, 21.6%, and 12.1% of the variance, for a total of 77% (Fig. 4a). We believe that the first two major components provided sufficient information to corroborate the key findings presented here. Generally, the correlation is positive between the different variables (Protein, PAL, Glucanase, Chitinase and Peroxidase) (Fig. 4a,b). Hierarchical clustering spawned two large groups; Group 1: which contains proteins, Chitinase PAL and H₂O₂; and Group 2: which contains Glucanase, Peroxidase and Polyphenols (Fig. 4c). PLS-DA analysis generated some specificity between the type of treatment used and the type of variable induced. In this sense, it was found that the protein level and the glucanase and PAL activities were induced more by polysaccharides extracted from *P. tricornutum* and *D. salina* 067. In addition, the enzymatic activities of peroxidase and chitinase and the Polyphenols content were stimulated more by the polysaccharide-based treatment of *Porphyridium* sp. and *D. salina* 002. However, it can be seen that the accumulating effect of H₂O₂ is induced by *A. platensis*. Polysaccharides extracted from *Desmodesmus* sp. have a similar effect on all studied variables (Fig. 4d). This moderation of induction of enzymatic activities by microalgal PSs has prompted us to hold the combination of treatments as a perspective for the study of their effect on plant defense pathways.

The analyses, ACP-Biplot, correlation and Heatmap clustering of the metabolic variables, reveal (1): the correlation of the variables studied; (2): the specificity between the metabolite induced vis-à-vis the treatment used; (3): treatments inducing similar biochemical parameters as well as metabolomics parameters. The variables chosen for this analysis were: C9:0 (Azelaic acid), C12:0 (Lauric acid), C14:0 (Muristic acid), C16:0 (Palmitic acid), C16:3 (Roughanic acid), C17:0 (Margaric acid), C18:0 (Stearic acid), C18:3 (Linolenic acid), C20:0 (Arachidic acid), C22:0 (Behenic acid), C23:0 (Tricosylic acid) C24:0 (Lignoceric acid), VLCFA, UFA, SFA, Total Lipid, Total Sterol, Total Alkane, and Total Alkene.

		Control	<i>A. platensis</i>	<i>D. salina</i> 002	<i>Porphyridium</i> sp.	<i>P. tricornutum</i>	<i>Desmodesmus</i> sp.	<i>D. salina</i> 067
Alkanes ($\mu\text{g g}^{-1}$)								
Heptadecane	C17	351.69	0.00	1716.06	2673.91	0.00	2866.68	1743.36
Octadecane	C18	31.56	0.00	234.35	0.00	1253.18	156.65	0.00
Eicosane	C20	0.00	840.30	1034.08	0.00	1622.30	161.03	2590.71
Heneicosane	C21	0.00	0.00	518.91	0.00	112.51	161.55	0.00
Docosane	C22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	155.86	0.00
Tricosane	C23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	177.99
Tetracosane	C24	35.77	709.66	0.00	1829.03	0.00	329.94	173.74
Pentacosane	C25	0.00	0.00	0.00	0.00	18.83	0.00	0.00
Hexacosane	C26	0.00	77.81	0.00	0.00	211.84	61.92	0.00
Heptacosane	C27	20.76	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Octacosane	C28	0.00	179.19	449.78	161.42	0.00	155.86	188.26
Nonacosane	C29	0.00	217.76	0.00	74.07	0.00	0.00	0.00
Triacontane	C30	0.00	141.34	483.66	0.00	0.00	0.00	325.46
Hentriacontane	C31	0.00	0.00	0.00	988.70	0.00	2034.48	388.44
Dotriacontane	C32	0.00	177.29	0.00	295.25	463.09	513.11	416.66
Tritriacontane	C33	0.00	0.00	0.00	0.00	257.45	0.00	0.00
Alkanes derivatives ($\mu\text{g g}^{-1}$)								
Trans-2,3-Epoxydecane		313.55	119.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1-Chloroeicosane		0.00	62.39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Hexadecane, 1-iodo-		0.00	0.00	211.69	0.00	0.00	0.00	0.00
Octadecane, 1-iodo-		0.00	0.00	637.95	0.00	0.00	0.00	0.00
Bis-siloxane		28.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cycloeicosane		0.00	0.00	0.00	603.16	0.00	0.00	0.00
Cyclotriacontane		0.00	0.00	0.00	0.00	44.20	0.00	0.00
Cyclotetrasiloxane, octamethyl-		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1587.31
Cyclopentasiloxane, decamethyl-		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	412.08
Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	160.65
-17-((2R,5R)-5-Ethyl-6-methylheptan-2-yl)-		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	113.94
Total		781.69	21,263.07	24,023.98	25,363.04	22,720.90	25,334.59	27,016.10
Alkenes ($\mu\text{g g}^{-1}$)								
7-Hexadecene		39.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1-Octadecene		54.51	118.82	351.31	0.00	124.67	503.18	0.00
1-Pentadecene		0.00	100.15	72.24	0.00	0.00	0.00	58.63
1-Tetradecene		0.00	0.00	0.00	127.38	112.57	0.00	0.00
Cetene		0.00	0.00	0.00	279.08	194.58	234.31	0.00
2-Dodecen-1-yl		0.00	0.00	0.00	196.61	0.00	0.00	0.00
9-Nonadecene		0.00	0.00	0.00	0.00	399.36	0.00	0.00
Z-8-Hexadecene		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	286.04
Total		93.91	218.97	423.54	603.06	831.18	737.49	344.67

Table 3. The effect of microalgal polysaccharides on the biosynthesis and profile of alkanes and alkenes in tomato plants leaves.

The results in (Fig. 5) show that in general the metabolomics variables are positively correlated with each other (Fig. 5a,b). Heatmap, in Fig. 5d, shows that the polysaccharide treatments from *Porphyridium* sp., *Desmodesmus* sp., *D. salina* 067 have a significant effect on the induction of the synthesis of different metabolites, followed by *D. salina* 002. On the basis of biochemical and metabolomics results, it can be seen that treatments based on *Porphyridium* sp., *P. tricornutum*, *Desmodesmus* sp. and *D. salina* 067 have a great potential to induce the different parameters studied.

Metabolites	Control	<i>A. platensis</i>	<i>D. salina</i> 002	<i>Porphyridium</i> sp.	<i>P. tricornutum</i>	<i>Desmodesmus</i> sp.	<i>D. salina</i> 067
Citric acid, trimethyl ester	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	293.84
2,4-Di-tert-butylphenol	25.54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	128.33
E,E,Z-1,3,12-Nonadecatriene-5,14-diol	59.39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Isopropyl triacontyl ether	101.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trim	0.00	70.54	0.00	0.00	73.48	80.41	104.24
Neophytadiene	0.00	406.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
alpha.-Tocospiro B	0.00	123.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Tris(2,4-di-tert-butylphenyl) phosphate	0.00	38.64	0.00	0.00	162.00	100.49	75.05
E-14-Hexadecenal	0.00	0.00	295.24	0.00	0.00	0.00	0.00
2-Nitroso-1-naphthol-4-sulfonic acid	0.00	0.00	0.00	157.36	0.00	0.00	0.00
phenol, 4-methoxy-2-[2-(5-nitro-pyridinyl)diazenyl]-	0.00	0.00	0.00	1439.15	831.34	1358.66	0.00
3H-indole, 2-methyl-3-phenyl-	0.00	0.00	0.00	203.07	0.00	0.00	0.00
Phenol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)	0.00	0.00	0.00	0.00	90.95	0.00	0.00
Diethyl Phthalate	0.00	0.00	0.00	0.00	91.48	0.00	0.00
1-(4-Fluorophenyl)-2-[(4-hydroxy-6-methylpyrimidin-2-yl)thio]ethan-	0.00	0.00	0.00	0.00	686.86	0.00	0.00
Methyl 2-octylcyclopropene-1-heptanoate	0.00	0.00	0.00	0.00	771.24	0.00	0.00
1,8-Dioxo-5-thiaoctane,8-(9-borabicyclo[3.3.1]non-9-yl)-3-(9- ⁻	0.00	0.00	0.00	0.00	138.55	0.00	0.00
4H-1,2,4-Triazole-3-thiol, 4-(2-phenylethyl)-5-(4-pyridyl)-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	111.78
2-Propenoic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)-, methyl ester	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	258.53
Carbonic acid, octadecyl 2,2,2-trichloroethyl ester	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	344.35
Isopropyl octacosyl ether	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	504.51
Cyclododecyne	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	359.98	0.00
Cyclooctene, 3-ethenyl-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	448.70	0.00
Methyl 9- <i>cis</i> ,11- <i>trans</i> -octadecadien	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	780.51	0.00
6-Nitro-2,3-dimethylpyrrolo[3,2- <i>g</i>]quinoline	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	93.51	0.00
Undec-10-ynoic acid, undec-2-en-1-yl ester	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	321.13	0.00
Protopine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1066.43	0.00
Dioncophyllin A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	89.98	0.00
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Total	186.26	639.19	295.24	1799.58	2845.89	4699.80	1526.78

Table 4. Effect of polysaccharides treatments on profile of others metabolites ($\mu\text{g g}^{-1}$) in tomato plants.

The cuticle is composed of cutin polyester and cuticular wax; it allows plants' resistance to biotic and abiotic stresses⁵⁸. Generally, the cutin polymer is formed primarily of esterified and oxygenated fatty acids (FA) linked to C16 and C18⁵⁹. Cuticular wax, which is composed of mixed complexes, contains mainly a variety of alkanes, primary and secondary alcohols, aldehydes, ketones and esters which are derived from very long chain fatty acids (C20–C34)⁶⁰. All this explains our study findings, a strong accumulation of two precursors (fatty acids, C16 and C18) of VLCFA (C20–C24) and VLCA (C24–C33), induced by microalgae polysaccharide treatments. The strain that induced the maximum synthesis of two precursor's palmitic acid C16:0 ($9.781 \mu\text{g mL}^{-1}$) and stearic acid C18:0 ($3.694 \mu\text{g mL}^{-1}$), was *P. creuntum*. Meanwhile, the appearance of VLCA (C24–C33), explains that VLCFAs (C25–C34), were transformed totally during the synthesis of VLCA (C24–C33).

Our results show that there is a positive correlation between the synthesis of (C16, C18), VLCFAs and VLCAs. This correlation is explained by the transformation of C16 and C18—through the elongation pathway—into VLCFAs⁶⁰. The latter undergo an acyl-reduction and a decarboxylation—via the VLCAs—for the transformants into wax esters and ketones respectively. Then the latter are transported to the cuticle⁶⁰. Among the main roles of the cuticle; it is a component that protects plants against desiccation and blocks the penetration of toxins and even pathogens^{61,62}. The work done by⁶³, showed that *Arabidopsis* plants exposed to water stress induced high synthesis content of cuticular wax accompanied with a very high accumulation of VLCAs, suggesting that the alkane biosynthesis plays an important role in abiotic stress tolerance. The cuticular permeability increases when the biosynthesis of VLCAs decreases⁶⁴. Our results are comparable to that of²⁹, who reported that *C. reinarditi* and *C. sorokiniana* polysaccharides significantly induced the synthesis of C16, C18, VLCFAs and VLCAs in tomato plants.

Plants, when infected by pathogens, trigger a series of metabolic redistributions that potentially contribute to induced tolerance or even increase sensitivity⁶⁵.

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are the primordial components of the plasma membrane. Their release is achieved by lipases after pathogen attack⁶⁶. These FAs play a major role in plant-pathogen interactions; acting directly as free fatty acids or as fatty acid-derivatives (oxilipins)⁶⁶.

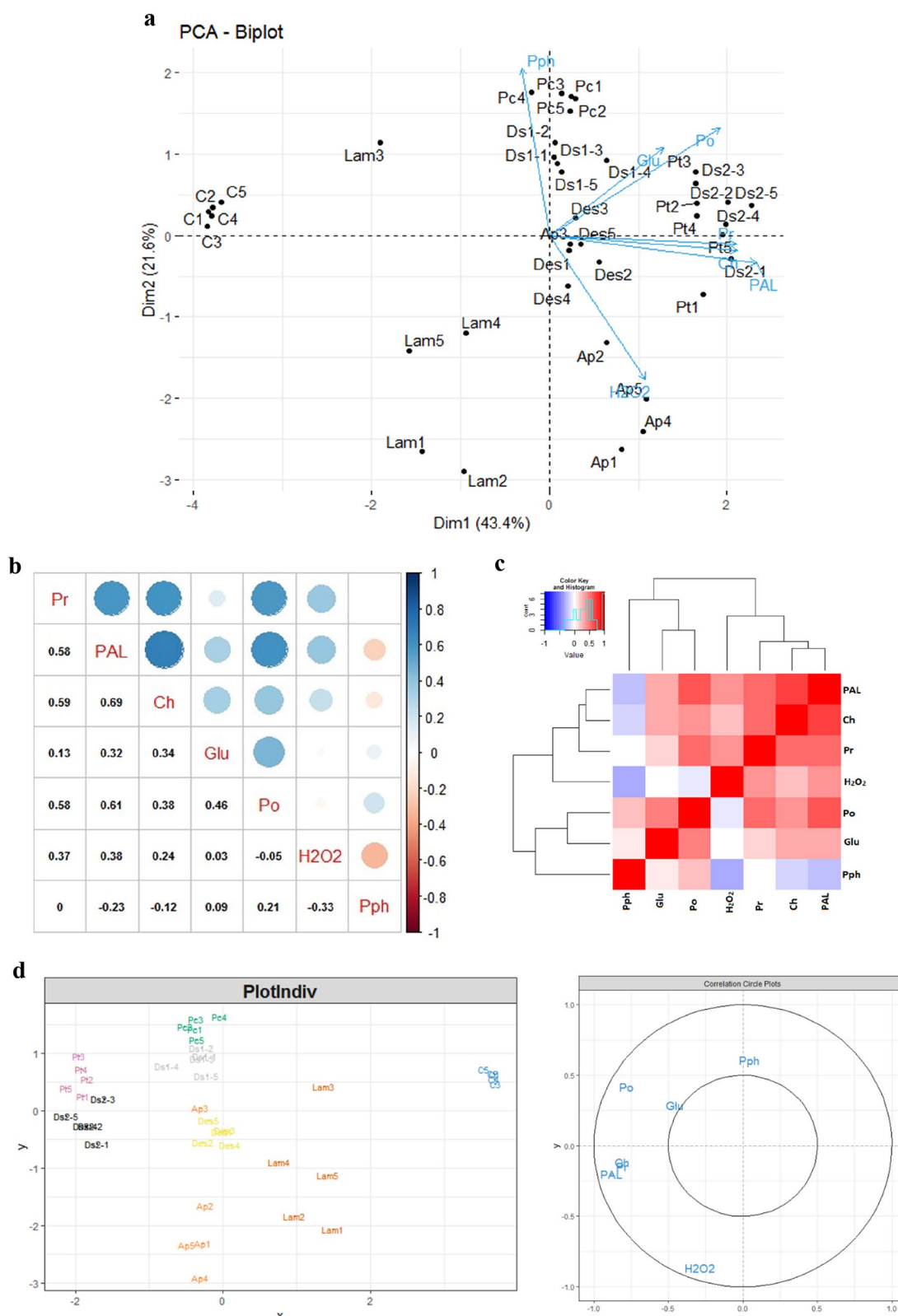
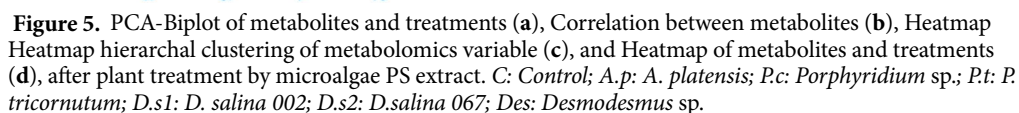


Figure 4. Biplot of principal component analysis of variables and treatments (a); Correlation between variables (b); Heatmap hierarchical clustering of studied variables (c); PLS-DA for biochemical variables and treatments (d). C: Control; A.p: *A. platensis*; P.c: *Porphyridium* sp.; Pt: *P. tricornutum*; D.s1: *D. salina* 002; D.s2: *D. salina* 067; Des: *Desmodesmus* sp.; Lam: Laminarin; Pr: protein; PAL: Phenyl-alanine amonia-lyase; Ch: Chitinase; Glu: Glucanase; PO: Peroxidase; Pph: Polyphenol.



In our study, increased synthesis of C18:2 as PUFAs in tomato plants after treatment with *Desmodesmus* sp. PSs, is similar to the results of⁶⁷ which showed that increase in C18:2 synthesis in avocado fruits elicits increased resistance to the fungal pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. In our results we also see a strong accumulation of PUFAs; Roughanic acid (C16:3) and Linoleic acid (C18:3) after treatment with different PSs treatments. The maximum values of these two FAs are (2.180 µg mL⁻¹) and (16.395 µg mL⁻¹) respectively, obtained at treatment with *Porphyridium* sp. Trienoic fatty acids, are PUFAs that play a crucial role in adapting plants to abiotic and biotic stress. A study by⁶⁸ showed that the high accumulation of linoleic acid (C18:3) in *Arabidopsis* leaves after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (avrRpm1), activates NADPH-Oxidase, which is responsible for the synthesis of reactive oxygen species ROS⁶⁸.

The strong accumulation of C18:3 in plants treated with PSs was accompanied by the accumulation of azelaic acid (AA, C9:0). Also, there was an induction of C18:2 synthesis in treated plants compared with control plants. Our results are similar to that of^{29,69}, who demonstrated that after 24 h of treatment with microalgae polysaccharides, leaf content of C18:1, C18:2 and C18:3 was increased, leading to an induced accumulation of azelaic acid. These three unsaturated octadecanoic are azelaic acid (AA) precursors. Contact of host plants with a pathogen induces their defragmentation from the plasma membrane by phospholipases. After this, AGs undergo oxidation at carbon-9 to synthesize AA (71–74). The latter has been shown to induce local and systemic acquired resistance (SAR) in *Arabidopsis* plants against *Pseudomonas syringae* via the induction of salicylic acid accumulation^{69,70}.

Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast⁷¹. Stigmasterol are phytosterols derived from β -sitosterol by the cytochrome P450 CYP710A1 via C22 desaturation⁶⁵. In our results, we observed that the sterol metabolites induced by the different PS extracts are Stigmasta-3,5-diene, Cholesta-3,5-diene and Stigmastan-6,22-dien, 3,5. The accumulation of stigmasterol was higher in plants treated with PS extracts compared to control plants. These results have been confirmed by the Wang's study⁷¹, who reported that phytosterols play a vital role in plant defense against pathogenic bacteria through nutrient flow regulations from the cytoplasm to the apoplastic space. During the invasion of plants by pathogenic bacteria, the virulence factors of the bacterium block the expression of AtCYP710A1 gene (gene responsible for transformation of β -Sitosterol into Stigmasterol), thus repression of the production of stigmasterol., all its going to induce a reduction of flow of nutrients from cytoplasm to the host cell's apoplast⁷¹.

Conclusion

In general, microalgae polysaccharides have a bio-elicitor effect on certain biochemical and metabolic pathways of tomato plant defense. In this study PS treatment induced the accumulation of ROS (H₂O₂) and the antioxidant activity of (POX). PS treatments also improved PAL activity, a key enzyme in the activation of the phytoalexin pathway. Pathogenesis-related proteins, such as β -1,3-Glucanase and Chitinase, which are key protein markers for plant defense against biotic stresses were also induced. Moreover, metabolomics study revealed that PS treatment induced the modification of metabolite profiles in tomato plant leaves. Induced metabolites included C18:2 and C18:3 and Azelaic acid which is a regulator of salicylic acid-dependent systemic acquired resistance. On the other hand, treated plants by PS exhibited higher accumulation of C16:0 and C18:0, VLCFAs and VLCAs which are metabolites linked to the strengthening of the cuticle by wax synthesis in order to inhibit the penetration of toxins from pathogens. These metabolites are also involved in the synthesis of sphingolipid complexes, the basal unit of the membrane lipid bilayer. Finally, PSs also induced the accumulation of sitosterol and stigmasterol derivatives. Sitosterol and stigmasterol play a key role in regulating nutrient flow to the apoplast, making plants resistant to pathogens. Meanwhile, Principal Component Analysis (PCA) showed that PSs from *P. tricornutum* MS023 and *D. salina* MS067 significantly improved chitinase and PAL activities and proteins content. Whereas, the PS treatments of *Porphyridium* sp. MS081 and *D. salina* MS002 enhanced the POX and β -1,3-glucanase activities and Polyphenols content. On the basis of biochemical and metabolomics results, it can be seen that treatment with polysaccharides obtained from *Porphyridium* sp., *P. tricornutum*, *Desmodesmus* sp. and *D. salina* 067 have a great potential to induce the different studied parameters. This moderation of induction of enzymatic activities by microalgal PSs has prompted us to hold the combination of treatments as a perspective for the study of their effect on plant defense pathways.

Our results show that polysaccharide treatments based on microalgae can be used as a biotechnological alternative in sustainable agriculture to protect plants against pathogens and abiotic stresses and to also minimize the excessive use of chemical pesticides.

Materials and methods

Microalgae culture conditions and growth measurements. Microalgae strains used in this study (freshwater: *A. platensis* MS001, seawater: *D. salina* MS002, *P. tricornutum* MS023, *Porphyridium* sp. MS081, *Desmodesmus* sp. and *D. salina* MS067) were maintained in the microalgae collection at MAScIR (Moroccan Foundation for Advanced Science, Innovation and Research). These strains were cultivated in Walne's medium with pH 8.2 at 25 °C for seawater strains and *A. platensis* in Zarrouk medium at pH 9 and 30 °C. All cultures were grown in 500 mL Erlenmeyer's in orbital shaker at 130 rpm with continuous illumination (150 ± 10 µmol m⁻² s⁻¹). The biomass was harvested after 24 days of culture by centrifugation at 4200 rpm for 10 min and rinsed twice with a ammonium formate solution of 30 g L⁻¹. The biomass is stored at -20 °C.

Polysaccharides production and partial characterization. 1 g of dry microalgae biomass powder was suspended in 40 mL of distilled water and incubated at 90 °C for 2 h with stirring. The mixture was centrifuged at 4000 rpm for 15 min. After recovering the supernatant, the extraction process was repeated twice, and then the supernatants were mixed with two volumes of absolute ethanol, stirred vigorously and left overnight at 4 °C. The precipitated polysaccharides were recovered in the pellet by centrifugation at 11,000 rpm for 10 min. The PS

pellet was washed three times with absolute ethanol and lyophilized⁷². The total neutral sugar and uronic acids contents of the crude PS were determined according to Blumenkrantz and DuBois methods respectively^{73,74}. Sulfate content in crude PS was determined by the barium chloride-gelatin method⁷⁵. The protein content was determined according to the Bradford method using crystalline bovine serum albumin (BSA) as standard⁷⁶.

Microalgae polysaccharides effect on tomato plant defense. *Bioassays for tomato growth and treatments.* In this set of experiments, we used *Solanum lycopersicum* L. Var. *Jana F1* (tomato). Seeds (purchased from "Syngenta Morocco") were surface-disinfected using sodium hypochlorite solution (1%) containing 10 μ L of Tween-20 for 20 min and then rinsed with sterile water.

Sterile seeds were germinated on Murashige and Skoog (MS) + agar medium in magenta boxes, in the dark for 4 days and in the light for 3 days and the seedlings were transplanted into 12 cm diameter pots containing a mixture of sandy soil/peat (60/40, w/w). The tomato seedlings were grown in a phytotron at 26 °C, 16 h/8 h Light/dark cycle and 240 μ mol m⁻² s⁻¹ illumination intensity.

Plants were irrigated every day with 10 mL of water, alternated twice a week with a nutrient solution containing: 8 μ M MnCl₂, 0.5 μ M CuSO₄·5H₂O, 1.4 μ M ZnSO₄, 46 μ M H₃BO₃, 0.25 μ M Na₂MoO₄·2H₂O, 0.6 μ M Fe-EDTA, 4.1 mM KNO₃, 0.9 mM K₂SO₄, 1 mM MgSO₄·7H₂O and 1.5 mM KH₂PO₄⁷⁷.

The polysaccharide treatments were prepared with a ratio of 0.1% PS in distilled water. The pH was adjusted to 6 using HCl or NaOH diluted to 1 M.

The injection was performed using a microsyringe above the cotyledon leaves with a volume of 10 μ L of the 0.1% PS solution. 30 days after transplantation, the plants were injected with 10 μ L of 1 mg mL⁻¹ of microalgae polysaccharides, 10 μ L of Laminarin diluted to 1 mg mL⁻¹ as the positive control) and 10 μ L of distilled water (dH₂O) for the negative control. 24 h after treatment, leaves were harvested according to treatment groups and grinded in liquid nitrogen. The samples were then stored at -80 °C.

Biochemical and enzymatic parameters. Extraction and enzyme activity assay. 100 mg of the tomato plant leaf biomass was homogenized in 1 mL of 100 mM Tris-HCl (pH 8.5) containing 14 mM of β -mercaptoethanol. The mixture was centrifuged at 13,000 rpm and 4 °C for 30 min. The supernatant, which contains the proteins was collected. Protein assay is determined according to Bradford method by using Bovine Serum Albumin (BSA) for the standard curve⁷⁶.

The activity of phenylalanine ammonia-lyase was determined according to the modified methods previously described by Mozzetti and EL Modafar^{78,79}.

The chitinase activity was determined according to modified Pegg method⁸⁰.

Glucanase activity based on Chandrasekaran method⁸¹. The ground biomass was homogenized in 2 mL of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7) containing 1% v/v of polyvinylpyrrolidone. The homogenate was centrifuged at 12,000 rpm for 15 min at 4 °C. The supernatant was recovered in 1.5 mL Eppendorf tubes and stored at -20 °C. The reaction mixture contained 50 μ L of the enzymatic extract, 50 μ L of laminarine (10 mg mL⁻¹) prepared in 50 mM of sodium acetate buffer, (pH 5.0) and incubated at 37 °C for 1 h on a heat block. The reaction was stopped by the addition of 1.5 mL of dinitrosalicylic acid (DNSA) and the mixture was incubated at 100 °C for 5 min on a heat block. Absorbance was measured at 530 nm and 1,3-glucanase activity was calculated using the standard glucose curve. The activity of Glucanase was expressed as μ M N-Acetylglucosamine H⁻¹ g⁻¹ FM.

The POX activity was carried out, following the method described by Chakraborty⁸². The substrate was prepared with 5 mL of 1% guaiacol, 5 mL of 0.3% H₂O₂ mixed in 50 mL of 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5). The reaction mixture was prepared with 2.95 mL of the substrate and 0.05 mL of the enzyme extract and the absorption change was measured at 470 nm for 3 min. POX activity was determined by the increase in the absorbance due to guaiacol oxidation and expressed as change in the absorption of the reaction mixture min⁻¹ mg⁻¹ of protein (E = 26.6 mM⁻¹ cm⁻¹) μ kat g⁻¹ FM.

The H₂O₂ determination according to Sanders method⁸³. Tomato plants were harvested, immediately grinded in liquid nitrogen and stored at -80 °C until H₂O₂ determination assay. The frozen grinded leaf biomass (150 mg) was directly homogenized in 1 mL solution containing 0.25 ml Trichloroacetic acid (TCA) (0.1% (w:v)), 0.5 mL KI (1 M) and 0.25 ml 10 mM potassium phosphate buffer (10 mM, pH adapted to studied tissue) at 4 °C for 10 min. At the same time, for every sample, a control was prepared with H₂O instead of KI for tissue coloration background. Good care was taken to protect samples and solutions from light. The homogenate was centrifuged at 12,000 rpm for 15 min at 4 °C. H₂O₂ content was measured at 350 nm using a UV/VIS spectrophotometer. A calibration curve obtained with H₂O₂ standard solutions prepared in 0.1% TCA was used for quantification.

The total phenolic content in tomato leaf extracts was determined by using Folin-Ciocalteu reagent⁸⁴.

Metabolomics analysis. To investigate the effect of microalgae polysaccharides on the redistribution of metabolites in tomato plants, GC-MS metabolomics analysis in this study according to Kamthan method⁸⁵ with some modifications. The metabolites analyzed are lipids, alkanes, alkenes, sterols and other metabolites.

300 mg of frozen leaf biomass was added to glass vials with cap. 10 μ L of internal standard, Dodecane (0.75 g mL⁻¹) was added to each tube, to which 4 mL of chloroform and methanol mixture with a ratio of (v/v; 2/1) was also added. The mixture was vortexed and incubated at 85 °C for 2 h (2 h on heat block), vortexed and then incubated at 60 °C in an ultrasound bath for). After this, 1 mL of H₂O was added to the vials and the mixtures were thoroughly vortexed. The organic phase after phase shift was recovered by using a separating funnel and dried by evaporation with nitrogen gas. For acid transesterification, 500 μ L of Methanol/sulfuric acid (6%, v/v) was added to the dried organic phase residue. The mixture was incubated on a heat block for 2 h at 85 °C, and then for 1 h in an ultrasound bath. After that, the nitrogen gas was used to drying the mixture, then 250 μ L

and 750 µL of H₂O and Chloroform respectively was added to the mixture. The lower phase was then collected using a separating funnel.

For the metabolomic analysis of volatiles compounds, the gas chromatography (GC) (Agilent 7890A Series) coupled to mass spectrometry (MS) was used in this study. 4 µL of the samples were injected into the 123-BD11 column (15 m × 320 µm × 0.1 µm) by 1/4 split mode using helium as carrier gas at 3 mLmin⁻¹. The temperature was 230 and 150 °C in ion source and quadrupole respectively, and oven temperature program was started at 30 °C and finished at 360 °C. The NIST 2014 MS Library was used for molecules identification.

Statistical analysis. The R software (R Core Team 2013)⁸⁶ was used to statistical analysis, graphical generation and corrplot and ggplot (Hadley Wickham 2016)⁸⁷ packages integration. To determine the overall biochemical and metabolomics parameters variation, we used The Principal Component Analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) were used studied the variation of metabolomic and biochemical parameters. The correlation between treatment and variables were studied by prcomp function and MixOmics package. The statistical analysis was studied using SPSS, one-way ANOVAs by Tukey HSD test.

Received: 23 April 2020; Accepted: 1 December 2020

Published online: 13 January 2021

References

- Xin, Z. *et al.* A disease resistance elicitor laminarin enhances tea defense against a piercing herbivore Empoasca (Matsumurasca) onukii Matsuda. *Sci. Rep.* **9**, 814 (2019).
- Durango, D., Pulgarin, N., Echeverri, F., Escobar, G. & Quiñones, W. Effect of salicylic acid and structurally related compounds in the accumulation of phytoalexins in cotyledons of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Molecules* **18**, 10609–10628 (2013).
- Dayan, F. E., Cantrell, C. L. & Duke, S. O. Natural products in crop protection. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 4022–4034 (2009).
- da Cruz Cabral, L., Pinto, V. F. & Patriarca, A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **166**, 1–14 (2013).
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R. & Polasky, S. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* **418**, 671–677 (2002).
- Baulcombe, D. Reaping benefits of crop research. *Science* (80-) **327**, 761 (2010).
- Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A. & Brown, P. H. Biostimulants in plant science: a global perspective. *Front. Plant Sci.* **7**, 2049 (2017).
- Wiesel, L. *et al.* Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Front. Plant Sci.* **5**, 655 (2014).
- Kocira, S. *et al.* Modeling biometric traits, yield and nutritional and antioxidant properties of seeds of three soybean cultivars through the application of biostimulant containing seaweed and amino acids. *Front. Plant Sci.* **9**, 388 (2018).
- du Jardin, P. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* **196**, 3–14 (2015).
- Walters, D. R., Ratsep, J. & Havis, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J. Exp. Bot.* **64**, 1263–1280 (2013).
- Stadnik, M. J. & de Freitas, M. B. Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. *Trop. Plant Pathol.* **39**, 111–118 (2014).
- Chiaiese, P., Corrado, G., Colla, G., Kyriacou, M. C. & Roupheal, Y. Renewable sources of plant biostimulation: microalgae as a sustainable means to improve crop performance. *Front. Plant Sci.* **9**, 1782 (2018).
- Bagwell, C. E. *et al.* Discovery of bioactive metabolites in biofuel microalgae that offer protection against predatory bacteria. *Front. Microbiol.* **7**, 516 (2016).
- Shi, P., Geng, S., Feng, T. & Wu, H. Effects of *Ascophyllum nodosum* extract on growth and antioxidant defense systems of two freshwater microalgae. *J. Appl. Phycol.* <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1287-z> (2017).
- Renuka, N., Guldhe, A., Prasanna, R., Singh, P. & Bux, F. Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnol. Adv.* **36**, 1255–1273 (2018).
- Rosenberg, J. N. *et al.* Comparative analyses of three *Chlorella* species in response to light and sugar reveal distinctive lipid accumulation patterns in the Microalga *C. sorokiniana*. *PLoS One* **9**, e92460 (2014).
- Eustance, E., Wray, J. T., Badvipour, S. & Sommerfeld, M. R. The effects of limiting nighttime aeration on productivity and lipid accumulation in *Scenedesmus dimorphus*. *Algal Res.* **10**, 33–40 (2015).
- Becker, E. W. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* **25**, 207–210 (2007).
- Zou, P. *et al.* Polysaccharides derived from the brown algae *Lessonia nigrescens* enhance salt stress tolerance to wheat seedlings by enhancing the antioxidant system and modulating intracellular ion concentration. *Front. Plant Sci.* **10**, 48 (2019).
- Li, Z., Shi, J., Hu, D. & Song, B. A polysaccharide found in *Dendrobium nobile* Lindl stimulates calcium signaling pathway and enhances tobacco defense against TMV. *Int. J. Biol. Macromol.* **137**, 1286–1297 (2019).
- Khompata, K., Pettongkhao, S., Kuyyoguy, A., Deenamo, N. & Churngchow, N. Enhanced resistance to leaf fall disease caused by phytophthora palmivora in rubber tree seedling by *Sargassum polycystum* extract. *Plants* **8**, 168 (2019).
- Cook, J., Zhang, J., Norrie, J., Blal, B. & Cheng, Z. Seaweed extract activates innate immune responses in *Arabidopsis thaliana* and protects host against bacterial pathogens. *Mar. Drugs* **16**, 221 (2018).
- Arroussi, E. L. *et al.* *Dunaliella salina* exopolysaccharides: a promising biostimulant for salt stress tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum*). *J. Appl. Phycol.* **30**, 2929–2941 (2018).
- Faheed, F. & Fattah, Z. Effect of *Chlorella vulgaris* as bio-fertilizer on growth parameters and metabolic aspects of lettuce plant. *J. Agric. Soc. Sci.* **4**, 165–169 (2008).
- Garcia-Gonzalez, J. & Sommerfeld, M. Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *J. Appl. Phycol.* **28**, 1051–1061 (2016).
- Barone, V. *et al.* Root morphological and molecular responses induced by microalgae extracts in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J. Appl. Phycol.* <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1283-3> (2017).
- Wuang, S. C., Khin, M. C., Chua, P. Q. D. & Luo, Y. D. Use of spirulina biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. *Algal Res.* **15**, 59–64 (2016).
- Farid, R. *et al.* Effect of microalgae polysaccharides on biochemical and metabolomics pathways related to plant defense in *Solanum lycopersicum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **188**, 225–240 (2019).

30. Blainski, J. M. L. *et al.* Exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* induce biochemical and physiological alterations in tomato plant against bacterial spot. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 4741–4753 (2018).
31. Michalak, I. *et al.* Evaluation of supercritical extracts of algae as biostimulants of plant growth in field trials. *Front. Plant Sci.* **7**, 1591 (2016).
32. Ronga, D. *et al.* Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. *Agronomy* **9**, 192 (2019).
33. Dineshkumar, R. *et al.* Microalgal liquid biofertilizer and biostimulant effect on green gram (*Vigna radiata* L.) an experimental cultivation. *Biomass Convers. Biorefinery* <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00857-0> (2020).
34. Mutale-joan, C. *et al.* Screening of microalgae liquid extracts for their bio stimulant properties on plant growth, nutrient uptake and metabolite profile of *Solanum lycopersicum* L. *Sci. Rep.* **10**, 2820 (2020).
35. Vera, J., Castro, J., Gonzalez, A. & Moenne, A. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. *Mar. Drugs* **9**, 2514–2525 (2011).
36. Ménard, R. *et al.* β -1,3 glucan sulfate, but not β -1,3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathway in tobacco and arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 3020 (2004).
37. Jiang, J., Li, J. & Hua, D. Effect of calcium nutrition on resistance of tomato against bacterial wilt induced by *Ralstonia solanacearum*. *Eur. J. Plant Pathol.* **136**, 547–555 (2013).
38. Jin, L., Cai, Y., Sun, C., Huang, Y. & Yu, T. Exogenous L-glutamate treatment could induce resistance against *Penicillium expansum* in pear fruit by activating defense-related proteins and amino acids metabolism. *Postharvest Biol. Technol.* **150**, 148–157 (2019).
39. Dixon, R. A. *et al.* The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* **3**, 371–390 (2002).
40. Zhang, Z. *et al.* Multiple pre-harvest treatments with acibenzolar-S-methyl reduce latent infection and induce resistance in muskmelon fruit. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* **130**, 126–132 (2011).
41. Singh, R., Rastogi, S. & Dwivedi, U. N. Phenylpropanoid metabolism in ripening fruits. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **9**, 398–416 (2010).
42. Zhang, S. *et al.* Elicitor activity of alginoligosaccharide and its potential application in protection of rice plant (*Oryza sativa* L.) against *Magnaporthe grisea*. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **29**, 1–7 (2015).
43. Ama, I. *et al.* Seaweed polysaccharides as bio-elicitors of natural defenses in olive trees against verticillium wilt of olive. *J. Plant Interact.* **13**, 248–255 (2018).
44. Modafar, C. E. *et al.* Induction of natural defence accompanied by salicylic acid-dependant systemic acquired resistance in tomato seedlings in response to bioelicitors isolated from green algae. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* **138**, 55–63 (2012).
45. Vellaisamy, R., Thiruvengadam, R. & Ramasamy, S. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with pseudomonas fluorescens Pfl and *Fusarium oxysporum* f. sp lycopersici. *Plant Soil* **239**, 55–68 (2002).
46. Baxter, A., Mittler, R. & Suzuki, N. ROS as key players in plant stress signaling. *J. Exp. Bot.* **65**, 1229–1240 (2013).
47. Barna, B., Fodor, J., Harrach, B. D., Pogany, M. & Kiraly, Z. The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. *PPB* **59**, 37–43 (2012).
48. Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**, 405–410 (2002).
49. Niu, L. & Liao, W. Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium. *Front. Plant Sci.* **7**, 230 (2016).
50. Kumar, V., Khare, T. & Kishor, P. Na⁺ and Cl[−] ions show additive effects under NaCl stress on induction of oxidative stress and the responsive antioxidative defense in rice. *Protoplasma* **251**, 1149–1165 (2014).
51. Misra, N., & Gupta, A. K. Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings. *J. Plant Physiol.* **163**(1), 11–18 (2006).
52. Almagro, L. *et al.* Class III peroxidases in plant defence reactions. *J. Exp. Bot.* **60**, 377–390 (2009).
53. Wu, C. T., Leubner-Metzger, G., Meins, F. J. & Bradford, K. J. Class I beta-1,3-glucanase and chitinase are expressed in the micro-pylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiol.* **126**, 1299–1313 (2001).
54. Pieterse, C. M., van Wees, S. C., Hoffland, E., van Pelt, J. A. & van Loon, L. C. Systemic resistance in Arabidopsis induced by bio-control bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**, 1225–1237 (1996).
55. Pieterse, C. M. J. *et al.* A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1571–1580 (1998).
56. Derksen, H., Rampitsch, C. & Daayf, F. Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Sci.* **207**, 79–87 (2013).
57. Klarzynski, O. *et al.* Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **16**, 115–122 (2003).
58. Kim, H., Choi, D. & Suh, M. C. Cuticle ultrastructure, cuticular lipid composition, and gene expression in hypoxia-stressed Arabidopsis stems and leaves. *Plant Cell Rep.* **36**, 815–827 (2017).
59. Heredia, A. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim. Biophys. Acta* **1620**, 1–7 (2003).
60. Raffaele, S., Leger, A. & Roby, D. Very long chain fatty acid and lipid signaling in the response of plants to pathogens. *Plant Signal. Behav.* **4**, 94–99 (2009).
61. Ziv, C., Zhao, Z., Gao, Y. G. & Xia, Y. Multifunctional roles of plant cuticle during plant-pathogen interactions. *Front. Plant Sci.* **9**, 1088 (2018).
62. Reina-Pinto, J. J. & Yephremov, A. Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiol. Biochem.* **47**, 540–549 (2009).
63. Kosma, D. K. *et al.* The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **151**, 1918–1929 (2009).
64. Bourdenx, B. *et al.* Overexpression of Arabidopsis ECERIFERUM1 promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol.* **156**, 29–45 (2011).
65. Griebel, T. & Zeier, J. A role for β -sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions. *Plant J.* **63**, 254–268 (2010).
66. Walley, J. W., Kliebenstein, D. J., Bostock, R. M. & Dehesh, K. Fatty acids and early detection of pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**, 520–526 (2013).
67. Madi, L., Wang, X., Kobiler, I., Lichter, A. & Prusky, D. Stress on avocado fruits regulates $\Delta 9$ -stearoyl ACP desaturase expression, fatty acid composition, antifungal diene level and resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* attack. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **62**, 277–283 (2003).
68. Yaeno, T., Matsuda, O. & Iba, K. Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *Plant J.* **40**, 931–941 (2005).
69. Yu, K. *et al.* A feedback regulatory loop between G3P and lipid transfer proteins DIR1 and AZI1 mediates azelaic-acid-induced systemic immunity. *Cell Rep.* **3**, 1266–1278 (2013).
70. Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J. & Greenberg, J. T. Priming in systemic plant immunity. *Science* **324**, 89–91 (2009).
71. Wang, K., Senthil-Kumar, M., Ryu, C.-M., Kang, L. & Mysore, K. S. Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. *Plant Physiol.* **158**, 1789–1802 (2012).
72. Gu, C. & Pan, S. The comparison and analysis of three extraction methods for polysaccharides in purslane. *J. Food Nutr. Res.* **2**, 401–405 (2014).
73. Blumenkrantz, N. & Asboe-Hansen, G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* **54**, 484–489 (1973).

74. Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* **168**, 167 (1951).
75. Lloyd, A. G., Tudball, N. & Dodgson, K. S. Infrared studies on sulphate esters. III. O-sulphate esters of alcohols, amino alcohols and hydroxylated amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* **52**, 413–419 (1961).
76. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
77. Claussen, W. Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Sci.* **168**, 241–248 (2005).
78. Mozzetti, C., Ferraris, L., Tamietti, G. & Matta, A. Variation in enzyme activities in leaves and cell suspensions as markers of incompatibility in different Phytophthora-pepper interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **46**, 95–107 (1995).
79. El Modafar, C., Tantaoui, A. & El Boustani, E.-S. Differential induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in date palm roots in response to inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. albedinis and to elicitation with fungal wall elicitor. *J. Plant Physiol.* **158**, 715–722 (2001).
80. Pegg, G. F. & Vessey, J. C. Chitinase activity in *Lycopersicon esculentum* and its relationship to the in vivo lysis of *Verticillium albo-atrum* mycelium. *Physiol. Plant Pathol.* **3**, 207–222 (1973).
81. Murugesan, C., Belachew, S., Yoon, E. & Chun, S. Expression of β -1,3-glucanase (GLU) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) genes and their enzymes in tomato plants induced after treatment with *Bacillus subtilis* CBR05 against *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *J. Gen. Plant Pathol.* **83**, 7–13 (2016).
82. Chakraborty, N., Ghosh, S., Chandra, S., Sengupta, S. & Acharya, K. Abiotic elicitors mediated elicitation of innate immunity in tomato: an ex vivo comparison. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **22**, 307–320 (2016).
83. Junglee, S., Urban, L., Huguette, S. & Lopez, F. Optimized assay for hydrogen peroxide determination in plant tissue using potassium iodide. *Am. J. Anal. Chem.* **5**, 730–736 (2014).
84. Ainsworth, E. A. & Gillespie, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* **2**, 875–877 (2007).
85. Datta, A., Kamthan, A., Kamthan, M., Chakraborty, N. & Chakraborty, S. A simple protocol for extraction, derivatization, and analysis of tomato leaf and fruit lipophilic metabolites using GC-MS. *Protoc. Exch.* <https://doi.org/10.1038/protex.2012.061> (2012).
86. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (2013).
87. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (Springer, New York, 2016).

Acknowledgements

Special thanks for the financial support of MESRSFC and CNRST for the realization of this project under the best conditions (Grant Number: PPR2).

Author contributions

H.E.A. conceived the experiments, F.R., R.B. and Y.K. conducted the experiments, H.E.A., L.S., K.Y. and F.R. analyzed the results. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78820-2>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to H.E.A.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

3. Synthèse de 2^{ème} Article

Dans cette étude, nous examinons l'effet des PS obtenus à partir de microalgues et de cyanobactéries (*D. salina* MS002, *P. tricornutum* MS023, *Porphyridium* sp. MS081, *Desmodesmus* sp., *D. salina* MS067 et *A. platensis* MS001) sur les marqueurs biochimiques et métabolomiques liés aux voies de défense des plants de tomates.

Les activités de la phénylalanine ammoniac lyase (PAL), de la chitinase, de la 1,3-bêta-glucanase et de la peroxydase (POX) ont été améliorées dans les feuilles de tomate traitées par des polysaccharides extraits de *P. triocnutum* (238,26%) ; *Desmodesmus* sp. (19,95%) ; *P. triocnutum* (137,50%) et *Porphyridium* sp. (47,28%) respectivement. Cet effet stimulant significatif sur l'activité de la phénylalanine ammoniac lyase (PAL) induit par les PSs, indique une régulation positive de la voie phénylpropanoïde, conduisant à la production de molécules toxiques contre les pathogènes (D. K. Großkinsky, van der Graaff, and Roitsch 2014). Dans notre étude, les plantes traitées avec des polysaccharides ont montré une augmentation significative de l'activité β -1,3-glucanase, qui est l'une des protéines liées à la pathogénèse, regroupées dans la famille PR-2 qui décompose les composants de la paroi cellulaire des pathogènes. L'induction des protéines PR est une conséquence de l'activation des voies de défense de la plante, qui limitent l'entrée ou la poursuite de la propagation du pathogène (Sheikh et al. 2014).

Pour les protéines, les polyphénols et H₂O₂, l'effet maximal a été induit par *D. salina* 067 (55,01%), *Porphyridium* sp. (3,97%) et *A. platensis* (35,08%) respectivement. L'un des signes les plus courants de stress est la production d'une espèce réactive de l'oxygène (ROS) comme H₂O₂. Il a été démontré que les EPS de microalgues peuvent atténuer la toxicité des ROS dans les plantes en augmentant l'activité enzymatique antioxydante sur les ROS. Ce mécanisme peut être expliqué par le fait que les EPS peuvent interagir avec les récepteurs de la membrane plasmique en tant que molécules de signalisation, conduisant ainsi à l'activation d'une série de réactions biochimiques. Dans son étude, (EL Arroussi et al. 2018) a démontré que l'application d'EPS de *D. salina* augmentait l'accumulation de proline et les activités enzymatiques antioxydantes de la catalase (CAT), de la peroxydase (POD) et du superoxyde dismutase (SOD) chez des plantes soumises à un stress salin. (Farid et al. 2019) ont également rapporté que le traitement avec des polysaccharides de *C. vulgaris* a stimulé l'activité enzymatique de l'Ascorbate Peroxidase (APX) dans des plants de tomate. Dans la même étude, les

polysaccharides de microalgues extraits de *C. reinhardtii* et *C. sorokiniana* ont significativement augmenté l'activité POD.

D'autre part, l'analyse métabolomique par chromatographie en phase gazeuse couplée de et spectrométrie de masse (GC-MS) a montré que les PS induisent la modification du profil des métabolites impliqués dans la construction de la cire des feuilles de la tomate, tels que les acides gras, les alcanes, les alcènes et le phytostérol. Les traitements aux PS ont amélioré l'accumulation des acides gras C16:3, C18:2 et C18:3 libérés par les lipides membranaires comme précurseurs de la biosynthèse des oxylipines qui sont des molécules de signalisation de la défense des plantes. De plus, le traitement PS a induit l'accumulation de C18:0 et d'acide azélaïque qui est un régulateur de la résistance systémique acquise dépendant de l'acide salicylique. Ces résultats sont similaires à ceux de (Farid et al. 2019). Il a constaté que les polysaccharides induisaient des voies biochimiques liées à la défense des plantes. Cette induction s'observe par la modification de la composition des lipides (PUFA, acide stéarique, acide palmitique et en AGTL), la concentration en stérols végétaux et l'activation de la β -1,3-glucanase, de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), les enzymes antioxydants (APX et POD) et des enzymes lipoxygénases liées aux réactions de défense dans les plantes ayant subi un stress (Farid et al. 2019). Les microalgues sont des micro-organismes photosynthétiques qui produisent plusieurs molécules bioactives et qui font l'objet d'une attention considérable dans les communautés scientifiques et industrielles. Aujourd'hui, de nombreux biostimulants végétaux, dont des extraits d'algues et des polysaccharides, sont utilisés en agriculture. Cependant, les microalgues n'ont pas été largement exploitées dans ce domaine comme source potentielle de biostimulants végétaux. L'alginate ou les oligosaccharides d'alginate sont les glucides d'algues les plus décrits dans la littérature comme des éliciteurs puissants. A titre d'exemple, le traitement par pulvérisation d'alginate dans la tomate a induit la production temporaire d'espèces réactives de l'oxygène, a activé la défense antioxydante et a augmenté le niveau d'expression des gènes appartenant aux voies SA-, JA- et ET occasionnant une inhibition de la croissance d'*Alternaria solani* (Dey et al. 2019). En outre, il a été démontré que les alginates de *B. bifurcata* et de *F. spiralis* stimulent les défenses naturelles du palmier dattier par l'induction de l'activité PAL et la production de composés phénoliques (Bouissil et al. 2020). De même, l'application foliaire de κ -carraghénane sur des tomates a réduit la sévérité de la tache foliaire causée par *Septoria lycopersici* via l'activation de la défense antioxydante et la modulation du protéome du chloroplaste (Mani et al. 2021). Récemment, (Marwa Drira,

Elleuch, et al. 2021) ont prouvé le potentiel des exopolysaccharides produits par *Porphyridium sordidum* pour atténuer la sévérité du *Fusarium oxysorum* dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Ces auteurs ont démontré que les applications foliaires d'EPS activent la production de H₂O₂ et améliorent les activités des gènes marqueurs liés à la défense tels que PAL, SOD, POD, CYP et PR1. Le chitosan, un dérivé désacétylé de la chitine, peut renforcer les défenses des plantes par divers mécanismes, notamment en piégeant les espèces réactives de l'oxygène (ROS), en régulant à la hausse les activités antioxydantes et en activant la voie octadécanoïde qui conduit à la production d'acides gras phytoprotecteurs (El Hadrami et al. 2010).

CHAPITRE III



ARTICLE 3 :
L'ETUDE DES VOIES DE DÉFENSE DE LA TOMATE
INDUITES PAR LES POLYSACCHARIDES DE
MICROALGUES VIA : LA RÉGULATION DES GÈNES
LIÉS À LA PATHOGENÈSE, L'ANALYSE DES VOIES
LIPIDOMIQUES ET L'INTERACTION ENTRE LES
HORMONES VÉGÉTALES

1. Contexte

Ce 3^{ème} article présente la continuité du deuxième article. Il portera sur l'effet des PSs microalgues sur les voies moléculaires, les voies de biosynthèses des métabolites et l'interaction entre les hormones dépendantes de la défense des plantes. L'objectif de ce 2^{ème} volet est d'approfondir notre étude, par l'évaluation de l'effet des PS obtenus à partir de trois souches microalgales, « *D. salina*, *Porphyridium sp* et *P. tricornutum* » sur les voies de défense des plants de la tomate, ceci grâce à :

- L'analyse transcriptomique par Rt-PCR des gènes dépendants de la pathogenèse, les gènes MAPKs (1-7) responsable de transduction du signal de récepteur transmembranaire vers les effecteurs d'expression des gènes, les gènes PR (PR1, Glucanase et Chitinase dant leurs deux formes, acide et base), le gène de PAL, le gène Lipoxygenase (Lox) et les deux gènes d'inhibiteurs des protéases (PI1 et PI2);
- L'analyse des voies de biosynthèse des métabolites (métabolisme de l'acide linoléique (LAM), biosynthèse des acides gras insaturés (BUFA), biosynthèse des acides gras (FAB), biosynthèse de la cutine, de la subérine et de la cire (CSWB), biosynthèse des brassinostéroïdes (BrB), élongation des acides gras (FAE), dégradation des acides gras et métabolisme de l'acide alpha-linolénique (aLAM),), les résultats générés par GC-MS et traitement des résultats par metaboanalysis.05 ;
- La biosynthèse et l'interaction entre les 9 hormones «SA, JA, tZ, GA4, IAA, DHZ, GA1, ABA et iP ». Les résultats sont générés par L'UHPLC-MS. Pour les phytohormones, l'analyse est faite seulement pour les plantes traitées par les polysaccharides provenant de *P. tricornutum*.

2. 3^{ème} Article

Microalgae Polysaccharides-Induced tomato defense pathways by Regulating Pathogenesis-Related Genes, Lipidomic Pathway Analysis and Plant Hormones Cross-Talk

Farid Rachidi^{a,b}, Karim Rabeh^b, Laila Sbabou^b AASFAR Abderrahim^a, Hicham El Arroussi^{a*}

^a Green Biotechnology Center, MASCIIR (Moroccan Foundation for Advanced Science, Innovation & Research)- Rue Mohamed Al Jazouli – Madinat Al Irfane, 10 100 Rabat – Morocco).

^b Microbiology and Molecular Biology Team, Center of Plant and Microbial Biotechnology, Biodiversity and Environment, Faculty of Sciences, Mohammed V University, Rabat, 4 Avenue Ibn Battouta B.P. 1014 RP, Rabat. Morocco

*Corresponding author:

2.1. Abstract

Tomato plants were treated with microalgal Polysaccharides (PSs) to study the expression of Pathogenesis-Related Genes for improved plant defense. RT-PCR Transcriptomic analysis revealed that PSs treatment of tomato leaves upregulated the expression of MAPK1 and MAPK2 genes. MAPK4 was significantly overexpressed in leaves treated with PSs from *Porphyridium sp* and *P. tricornutum*. The PSs' effects on the induced genes was "specie-specific"; MAPK3, MAPK5, and MAPK6 were induced by *D. salina*-PSs, whereas MAPK7 was induced by *P. tricornutum*-PSs. PR1 and the acidic forms of Glucanase and Chitinase were upregulated by *Porphyridium sp*- PSs. Additionally, *D. salina*-PSs and *P. tricornutum*-PSs significantly induced the overexpression of the basic forms of Glucanase and Chitinase. PI1 gene in plants treated with *D. salina* and *P. tricornutum* PSs was upregulated. The lipidomic pathway analysis, using MetaboAnalyst-5.0, revealed that *Porphyridium sp* treatment significantly induced several pathways including; Linoleic Acid Metabolism (LAM), Biosynthesis of Unsaturated FA (BUFA), Fatty acid Biosynthesis (FB), Cutin, Suberine and Wax Biosynthesis (CSWB), Brassinosteroid Biosynthesis (BrB), Fatty Acid Elongation (FAE), and Fatty acid degradation and, except alpha-Linolenic acid metabolism (aLAM) pathway. *D. salina*-PSs significantly induced the LAM, BUFA, FB and CSWB pathways. *P. tricornutum*-PSs induced the LAM, BrB, FB and BUFA pathways. Phytohormone profiling, using UHPLC-MS, also showed that treatment of tomato leaves with *P. tricornutum*-PSs induced a highly significant accumulation of: tZ and GA4 and significantly reduced SA, GA1, IAA and DHZ synthesis. The treatment had no significant effect on the synthesis of JA, ABA and iP.

These results indicate that Microalgae PSs treatment induces the expression of Pathogenesis-Related Genes and regulates Lipidomic Pathway and hormones cross-talk. Thus, microalgae polysaccharides are a promising biotechnological alternative bioresource for the development of biostimulants and bioelicitors contributing to plant protection, crop yield and productivity and minimizing chemical use in agriculture.

Key words: Plant Defense; Bioelicitor; Polysaccharides Microalgae; Genes expression, Rt-PCR; Metabolomics GC-MS; Metabolomic pathway analysis; Phytohormones; *Solanum lycopersicum L.*

2.2. Introduction

Plants in their environment are exposed to various phytopathogens. To confront diseases, plants have developed several defense mechanisms. These mechanisms start with a constitutive defense including physical barriers such as waxy epidermal cuticles and rigid cell walls. In addition to physical barriers plants respond to pathogens with inducible defenses, which are activated by a diverse variety of elicitors such as peptides, lipids and carbohydrates (Doughari 2015). Elicitors are either exogenous, from pathogens containing β -glucans and chitosan (from fungi) and lipopolysaccharides and flagellin (from bacteria), or endogenous elicitors from the plants' oligogalacturonides and cutin monomers (Wiesel et al. 2014). The induction of defense responses begins with the perception and recognition of Microbe- or Pathogen-Associated Molecular Patterns (MAMPs/PAMPs) by transmembrane Pattern Recognition Receptors (PRRs) of the host cell, resulting in PAMP-Triggered Immunity (PTI) (Jones and Dangl 2006). NOD-like receptors (NLRs) specifically recognise the effectors of the pathogen and induce Effector-Triggered Immunity (ETI), which usually acts inside the cell (Jones and Dangl 2006)(Dangl, Horvath, and Staskawicz 2013).

After pathogen perception, a transient activation of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) signalling cascades through a phosphorylation and dephosphorylation phenomena, allowing the signal to switch from MAPKKK to MAPKK and then MAPKs, in order to transduce extracellular stimuli into intracellular responses in plants (Pedley and Martin 2005). The MAPKs cascades transduce extracellular stimuli into multiple cellular responses; the accumulation of ROS, phytoalexins and a range of endogenous signaling molecules, including jasmonic acid (JA), ethylene (ET) and salicylic acid (SA), auxin (IAA), abscisic acid (ABA) and other phytohormones (W. Truman et al. 2007)(W. M. Truman et al. 2010)(Ton, Flors, and Mauch-Mani 2009)(Mishra, Sharma, and Misra 2012).

Reducing the negative impact of plant diseases on crop yield and productivity by treating them with elicitors in the absence of/or before pathogen establishment is an effective strategy in current agricultural management (García-Mier et al. 2013). This strategy serves as an ecological alternative that reduces the harmful effects of agricultural chemical inputs on the environment (Rachidi et al. 2021).

Several studies have reported the beneficial effects of various extracts as inducers of plant resistance namely; plant, bacterial, fungal, macroalgal, microalgal, and polysaccharide extracts.

Polysaccharides, due to their biochemical diversity and different biological activities, are a promising bioresource for the development of bioelicitors of plant resistance to biotic stress (Rachidi et al. 2021; Oleg I Yakhin et al. 2017; Wiesel et al. 2014; Kocira et al. 2018; Stadnik and Freitas 2014).

Macroalgal polysaccharides such as ulvans, alginates, fucans, laminarins and carrageenans, are known bioelicitors of plant resistance against pathogens (Stadnik and Freitas 2014)(Vera et al. 2011). Tomato leaves treated with *Bifurcaria bifurcata* alginates overaccumulated polyphenols and exhibited higher Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) enzyme activity (Aitouguinane et al. 2020). The treatment of apples with ulvans and oligoulvans from *ulva lactuca* enhanced their resistance to *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*, this resistance was accompanied by the induction of antioxidant enzyme (catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and peroxidase (POD)) and PAL activities, and increased polyphenol and lignin synthesis in the fruits (Abouraïcha et al. 2015). *Hypnea musciformis* carrageenan also induced the overexpression of genes involved in SA and JA dependent signalling pathways and contributed to the resistance of tobacco to mosaic virus infection (Ghannam et al. 2013).

Microalgae can produce a range of polysaccharides with diverse physicochemical properties and biological activities (Wan et al. 2021; H. Li et al. 2018). Microalgal polysaccharides have been studied for their potential application as plant biostimulants (Rachidi et al. 2020; 2021; Mutale-joan et al. 2020; El-Naggar et al. 2020). A study by Rachidi et al (Rachidi et al. 2021), showed that the polysaccharides extracted from *Phaeodactylum triocnutum*, *Desmodesmus* sp. and *Porphyridium* sp. have a significant effect on the activities of the enzymes PAL, chitinase, β -1,3 glucanase and POD in tomato leaves (Rachidi et al. 2021). In addition, GC-MS metabolomic analysis revealed that polysaccharides induced changes in the profile of metabolites, such as fatty acids, alkanes and phytosterols in tomato leaves (Rachidi et al. 2021). In the same, *Porphyridium sordidum* exopolysaccharides (EPS) had a significant effect on PAL and H₂O₂ accumulation in *Arabidopsis thaliana* infected by *Fusarium oxysporum*. Investigation on defense-related genes revealed the up-regulation of SOD, POD, Pathogenesis-related protein 1 (PR-1) and Cytochrome P450 monooxygenase (CYP), while CAT and Plant defensin 1.2 (PDF1.2) were not induced. These results suggest that EPS may induce *A. thaliana*'s defense responses against *F. oxysporum*, through the activation of the Salicylic Acid pathway (Marwa Drira, Elleuch, et al. 2021).

The present study is the second part of the previously published study on "the biostimulant effect of microalgae PSs on tomato plant defense - metabolomics and biochemical aspects" (Rachidi et al. 2021). This study aims to investigate the effect of microalgae PSs derived from *D.salina*, *Porphyridium sp* and *P.tricornutum* on tomato plant defense responses: (i) gene regulation, (ii) metabolic pathways and (iii) phytohormone regulation. The first part focusses on the effect of Polysaccharides derived from the three microalgal species on the expression of defense genes; genes related to the MAPKS signal transmission cascade (MAPK1-7), AS pathway dependent defense genes (PR1, PR2a, PR2b, PR3a and PR9b), AJ pathway dependent defense genes (PAL, LOX, PI1 and PI2). The second part consists in studying the effect of PSs on the biosynthetic pathways of FA, UFA, Brassinosteroides, cutin, suberin and wax. The third part comes to evaluate the effect of *P.tricornutum* Polysaccharides on the biosynthesis of phytohormones (Salicylic Acid (SA), Jasmonic Acid (JA), Gibberellin Active 1 and 4 (GA1 and GA4), Indol-3-Acetic Acid (IAA), Absciscic Acid (ABA), Dihydrozeatin (DHZ), IsoPenteniladenine (iP) and t-Zeatin).

2.3. Material and methods

2.3.1. Growth and treatments of tomato plants

The choice of the three microalgal species (*D. salina*, *Porphyridium sp* and *P. tricornutum*) was based on the results obtained in the previous study (Rachidi et al. 2021). Transcriptomic and metabolomic pathway analysis were studied on all three PSs. PSs derived from *P. tricornutum* exhibited the highest elicitor effects on tomato plants and were selected for hormone profiling.

Solanum lycopersicum L. Var. Jana F1 (tomato) was used in the present study. Seeds (purchased from "Syngenta Morocco") were surface-disinfected using sodium hypochlorite solution (1%) containing 10 µL Tween-20 for 20 min, and then rinsed with sterile water. Sterile seeds were germinated on Murashige and Skoog (MS) + agar medium in magenta boxes in the dark for 4 days, and in the light for 3 days. The seedlings were transplanted into 12 cm diameter pots containing a mixture of sand soil/peat (60/40, w/w). The tomato seedlings were grown in a phytotron at 26 °C, 16 h/8 h Light/dark cycle and 240 µmol m⁻² s⁻¹ illumination intensity (Rachidi et al. 2021). Plants were irrigated every day with 10 mL of water, alternated twice a week with a nutrient solution containing: 8 µM MnCl₂, 0.5 µM CuSO₄·5H₂O, 1.4 µM ZnSO₄, 46 µM H₃BO₃, 0.25 µM Na₂MoO₄·2H₂O, 0.6 µM Fe-EDTA, 4.1 mM KNO₃, 0.9 mM K₂SO₄, 1 mM MgSO₄·7H₂O and 1.5 mM KH₂PO₄ (Rachidi et al. 2021).

The pH was adjusted to 6 using HCl or NaOH diluted to 1 M. Microalgae PS solution (4mL, 1mg.mL⁻¹ PS) was applied to tomato leaves by spraying. Control plants were sprayed with distilled water (d. H₂O). The leaves were harvested 24 h after treatment, according to treatment groups and grinded in liquid nitrogen. The samples were then stored at – 80 °C (Rachidi et al. 2021).

2.3.2. Metabolomics analysis

To investigate the effect of microalgae polysaccharides on the synthesis of fatty acids in tomato plants, GC–MS metabolomics analysis was carried out according to the method described by Kamthan (Datta et al. 2012) with some modifications (Rachidi et al. 2021).

300 mg of frozen leaf biomass was added to glass vials with caps. Internal standard Dodecane (10 µL volume and 0.75 g mL⁻¹ density) was added to each tube, to which 4 mL chloroform/methanol (v/v; 2/1) was also added. The mixture was vortexed and incubated at 85 °C for 2 h (2 h on a heat block, vortexed and then incubated at 60 °C in an ultrasound bath for 1 h). Then, 1 mL H₂O was added to the vials and the mixtures were thoroughly vortexed. The organic phase after phase shift was recovered using a separating funnel and dried by evaporation with nitrogen gas. For acid transesterification, 500 µL Methanol/Sulfuric acid (6%, v/v) was added to the dried organic phase residue. The mixture was incubated on a heat block for 2 h at 85 °C, and then for 1 h in the ultrasound bath. The nitrogen gas was used to dry the mixture, then 250 µL and 750 µL of H₂O and Chloroform respectively was added to the mixture. The lower phase was then collected using a separating funnel (Rachidi et al. 2021).

Gas chromatography (GC) (Agilent 7890A Series) coupled to mass spectrometry (MS) was used in this study. 4 µL of the samples were injected into the 123-BD11 column (15 m × 320 µm × 0.1 µm) by 1/4 split mode using helium as carrier gas at 3 mL.min⁻¹. The temperature was 230 and 150 °C in ion source and quadrupole respectively, and oven temperature program was started at 30 °C and finished at 360°C. The NIST 2014 MS Library was used for molecules identification (Rachidi et al. 2021).

2.3.3. Metabolic Pathway Analysis

Analysis of relevant pathways affected by polysaccharide treatments based on the induced metabolites was performed by Metaboanalyst5.0 pathway analysis using the *Arabidopsis*

thaliana pathway library. The metabolic pathway analysis in this study was based on 20 metabolites. The determination of the identification code (IC) of the metabolites was done in the Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG) (<https://www.genome.jp/kegg/>). The data_SCV generated by Kegg was processed by the Metaboanalyst program (<https://www.metaboanalyst.ca/>), in order to determine the biosynthetic pathways induced by the PS treatments compared to the control.

2.3.4. Gene expression analysis Rt-PCR

Tomato plants, *Var. Jana F1* (tomato), grown as described previously (Rachidi et al. 2021), were used to study the expression of MAPK(1-7), PR1(Pr1b1), PR2(a), PR2(b), PR3(a), PR9(b), PI I, PI II, LOX, and PAL genes (Table 1), after treatment with microalgae polysaccharides. Gene expression was monitored 24h after PS treatment and was compared with the expression of the same genes in untreated plants.

Transcription analysis of the sixteen genes. Seven MAPK (1-7), five PRs genes SA signaling pathway dependent (PR1(Pr1b1), PR2(a), PR2(b), PR3(a) and PR9(b)) and five genes JA/ETH signalling pathway dependent (PI I, PI II, LOX and PAL)). Total RNA from tomato leaves was extracted using the Qiagen RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined with a NanoDrop™ 2000c Spectrophotometers and Qubite fluorometer 4. Residual traces of DNA were removed by treatment with RNase-free DNase I (Qiagen, Hilden, Germany) and gDNA wipeout buffer x7. Real-time qRT-PCR was performed at two steps. The total volume of the RT mix was 20 µl per reaction and it was performed by Quiagen QuantiTect Reverse Transcription Kit according to the manufacturer's instructions. Gene-specific primers (**Table 1**) were used for the transcription analysis, and the gene encoding actin (ACTIN) was used as reference gene for normalization. Expression of all genes was measured by quantitative reverse transcriptase PCR (RT-qPCR), using Applied Biosystems® QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System and kit (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, cat.no 204143). Melt curve analysis was conducted to assess specific amplification. Transcript levels were quantified in six replicates for each treatment, each one consisted of three independent biological replicates and two technical replicates. Data analysis was carried out with relative quantification, using the equation $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen 2001), and data normalization was carried out using the expression levels of the reference genes.

Table 1. Primers used in RT-qPCR in tomato experiments

Encoding protein	Accession	Primers	Defense pathway	Tm-F (°C)	Tm-R (°C)	P.S (°C)
MAPK1	NM_001247082.2	For: TCCTGAATACCAGCGCATGTGA Rev: CCCGGACGGAATGCACACA		62.06	62.89	116
MAPK2	NM_001247426.1	For: CATGCCCTTACCGAGGAACAAA Rev: ATCCAACAGCAAACGAGCGA		60.88	60.60	105
MAPK3	NM_001247431.2	For: ATGTTGACGCTCGACCCTACT Rev: AAGAGAACGGGATGGGGCAG		61.23	61.92	115
MAPK4	NM_001246838.1	For: AGGTTCACCGGAGGAGTCTG Rev: TCAAGGGCTAAAGGGGACACA		60.90	61.05	132
MAPK5	NM_001247337.2	For: TCCAATCATGGGGGTCTGT Rev: TTCAAAGCGGCACAAACGATG		60.54	60.60	126
MAPK6	NM_001247731.2	For: TCATGGGGGTCTGTTATGTTTCAGT Rev: TCCGAGTTCACAGCAGCACA		61.64	62.03	129
MAPK7	NM_001246968.2	For: GACCCAACCCGTCGAATTACA Rev: GGGACAAATCGGCTCATCGT		60.34	60.46	90
PR1(Pr1b1)	Y08804.1	For: AAATCCACGTAAGGCGGCTC Rev: AGGAGATTGCATGTCTGTGTAT	SA signaling pathway	60.74	60.29	118
PR2(a)	NM_001247869.2	For: TGAAAGGAGGGGCGAGGAACA Rev: CTTTGGCCTCTGGTCAGGTTT		61.07	60.48	140
PR2(b)	NM_001247876.2	For: GGATGGAACACGCGAGATGG Rev: GCAGGAACCTTGAAATGGGGCA		61.15	61.44	139
PR3(a)	NM_001247475	For: CCATCCCCTAAAGATACAGCAGC Rev: TCGGACCCATCCCACATTCAA		60.81	61.46	94
PR9(b)	NM_001247474	For: CCATCTGGCGCTGACCAAG Rev: ACTGCCGTGACCACATTCCA		61.11	62.05	93
PI I	K03290.1	For: CGGTTCTTCACTCTTTACAAC Rev: GCCCATCAATTTCTTTTCGTGCC	JA/ETH signalling pathway	60.74	61.47	120
PI II	NM_001247698.1	For: AAAAAGGCCAAATGCTTGACCC Rev: GTGGTACATCCGGTGGGATAAA		61.33	62.31	106
LOX	NM_001247927.2	For: TGGGCTGAAATGGAACACCA Rev: TGTGGGACGATTTGGGAGGT		60.41	61.13	132
PAL	M83314.1	For: GCGAAGGGGATTTCGGATGAA Rev: TGCTGAATGTGGCAATGTGTG		60.18	60.00	129
Actin	U60481.1	For: GGTTTACAATTACCGACTCACGG Rev: TAGGGGCATCATCACCAGCA	Reference gene	61.09	60.99	130
FEI- α	X14449.1	For: GCCCAAGAGGGCATCAGACA Rev: ACCAGTCTCAACGCGACCA		62.20	61.50	100

MAPK : Mitogen-Activated Protein kinase ; PR1 : anti fongic; PR2(a): β -1.3-Glucanase acid; PR2(b): β -1.3-Glucanase basic; PR3(a): Chitinase acid; PR9(b): Chitinase basic; PI I and II: Proteinase inhibitors I and II ; Lox : Lipoxygenase ; PAL : Phenylalanine Ammonia Lyase ; FEI- α : Elongation factor alpha; PS: Product size.

2.3.5. Quantification of Plant Hormones

The effect of *P. tricornutum* polysaccharide treatments on phytohormone biosynthesis was carried out on tomato plant leaves according to the protocol described by Seo (Seo, Jikumaru, and Kamiya 2011). 300mg of tomato leaves biomass was suspended in 80% methanol-1% acetic acid containing internal standards and mixed by shaking during one hour at 4°C. The extract was kept a -20°C overnight and then centrifuged. The supernatant was dried in a vacuum evaporator and dissolved in 1% acetic acid and passed through an Oasis HLB (reverse phase) column as described in Seo et al (2011). For GAs, IAA, ABA, SA and JA quantification, the dried eluate was dissolved in 5% acetonitrile-1% acetic acid, and the hormones were separated using an autosampler and reverse phase UHPLC chromatography (2.6 μ m Accucore RP-MS

column, 100 mm length x 2.1 mm i.d.; ThermoFisher Scientific) with a 5 to 50% acetonitrile gradient containing 0.05% acetic acid, at 400 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ over 14 min.

For CKs, the extracts were additionally passed through an Oasis MCX (cationic exchange) and eluted with 60% methanol- 5% NH_4OH to obtain the basic fraction containing cytokines. The final eluate was dried and dissolved in 5% acetonitrile-1% acetic acid and cytokines were separated with a 5 to 50% acetonitrile gradient over 7 min. The hormones were analyzed with a Q-Exactive mass spectrometer (Orbitrap detector; ThermoFisher Scientific) by targeted Selected Ion Monitoring (SIM). The concentrations of hormones in the extracts was determined using embedded calibration curves and the Xcalibur 4.0 and TraceFinder 4.1 SP1 programs. The internal standards for quantification of each of the different plant hormones were the deuterium-labelled hormones, except for JA, for which the compound dhJA was used.

2.3.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences between two treatments were tested by multiple t tests of Two-way ANOVA. All the values were expressed as mean $\pm$ standard error. Three biological replicates per condition were used in this experiment and three independent technical replicates were done for each protocol. The statistical comparison test used was Dunnett with a confidence interval of 95%. P-value below 0.05 indicates statistically significant differences between treatments and the respective control group. Graphpad™ Prism 9 was used to perform the principal component analysis (PCA) and PCA biplot with confidence ellipses (0.95). The Kaiser rule (eigenvalue>1) was used to select the principal components used for the PCA.

2.4. Results

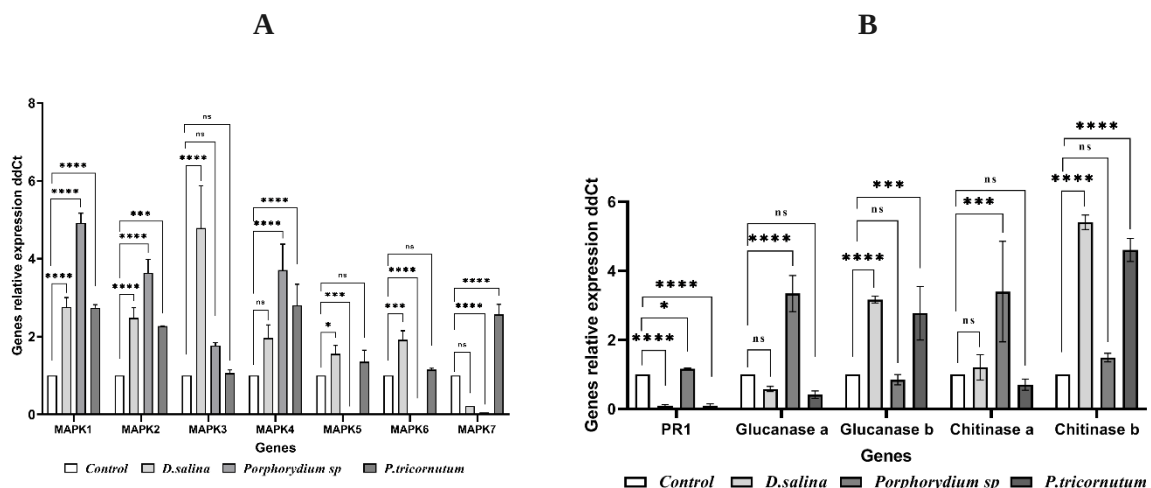
2.4.1. Tomato plant defense Gene expression analysis

Relative gene expression tests of 16 genes : genes related to the MAPKS signal transmission cascade (MAPK1-7), AS pathway dependent defense genes (PR1, PR2a, PR2b, PR3a and PR9b), AJ pathway dependent defense genes (PAL, LOX, PI1 and PI2) were performed on tomato (*S.lycopersicum*. *Jana F1*) leaves treated with microalgal PSs extracted from *D.salina*, *Porphyridium sp* and *P.tricornutum* at 24H after treatment.

Fig. 1A, Presents the expression level of MAPKs genes involved in transmitting the signal from PRR membrane receptors to nuclear factors. The different microalgal species induced the significant overexpression of MAPK1 and MAPK2 genes compared to the control. MAPK4

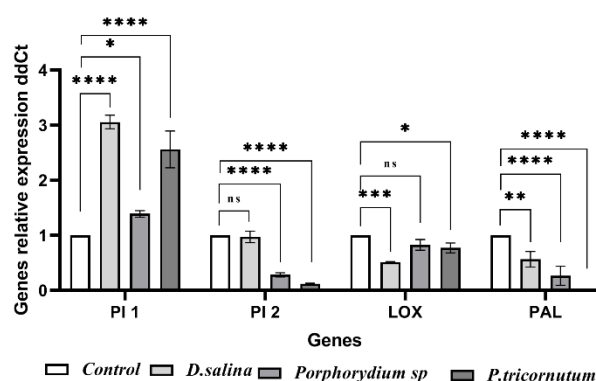
was also significantly overexpressed in leaves treated with PSs from *Porphorydium sp* and *P.tricornutum*. The PSs' effects on the induced genes was "specie-specific" ; MAPK3, MAPK5, and MAPK6 were induced by *D. salina*-PSs, whereas MAPK7 was induced by *P.tricornutum*-PSs. PR1 and the acidic forms of Glucanase and Chitinase were upregulated by *Porphorydium sp*- PSs. On the other hand, *Porphorydium sp* polysaccharides significantly lowered the expression of the MAPK5, MAPK6 and MAPK7 genes (**Fig. 1A**).

The genes encoding the PRs proteins of the Salicylic Acid (SA) pathway-dependent immune response were moderately induced by PSs treatments (Figure 1B). PRs proteins ; PR1 and the acidic forms of Glucanase and Chitinase were highly overexpressed by the treatment with *Porphorydium sp*. PSs., while *D. salina* and *P. tricornutum* PSs significantly induced the overexpression of the basic forms of Glucanase and Chitinase. The PR1 gene was downregulated after treatment with *D. salina* and *P.tricornutum* PSs (**Fig. 1B**). **Fig. 1C**, shows the effect of polysaccharide extracts on defense genes linked to the jasmonic acid pathway. Plants treated with *D. salina* and *P. tricornutum* PSs exhibited a highly significant overexpression of PI1 gene. A significant decrease in the expression of PI2 and PAL, was induced by *Porphorydium sp* and *P.tricornutum* PSs. LOX was significantly reduced by *D. salina* PSs (**Fig. 1C**).



C

Figure 1. Relative expression genes in tomato plants after treatment with PS microalgae. Expression of defense signaling genes encoding MAPK1-7(A); pathogenesis related protein 1 (PR1), pathogenesis related protein SA dependent (Glucanase a and b, Chitinase a and b) (B); and pathogenesis related protein JA dependent (LOX, PAL, PI1 and PI2) (C) in tomatoes during polysaccharides microalgae treatment. The expression of genes was analyzed at 24h after treatment in control and PSs treated plants. Values with “*” are significantly different ($p < 0.05$). (Mean $\pm$ S.E., $n = 3$; (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)).



2.4.2. Metabolomic Analysis

Fig. 2 A, B and C, Shows a comparative analysis of microalgal PS effects on the profile and concentration of metabolites in control and PS-treated plants. The results were obtained via PLS-DA analysis. Only metabolites with VPI scores >1 were considered. Metabolites accumulated in high concentrations (red colour) were (Arachidic acid, Oleic acid, Hentriacontane, Tricosane), (Arachidic acid, Oleic acid, Norlinolenic acid, Behenic acid, Bovinic acid), and (Arachidic acid, Myristic acid, Heptadecane, Tetracosanoic, Alpha-linolenic acid) in plants treated with *D.salina*; *Porphyridium sp* and *P.tricornutum* PSs respectively. On the other hand, (Linoleic acid), (Brassinolid, Linoleic acid, Capsicosid) and (Brassinolid) were in low concentration (blue colour) in plants treated with *D.salina*; *Porphyridium sp* and *P.tricornutum* PS respectively.

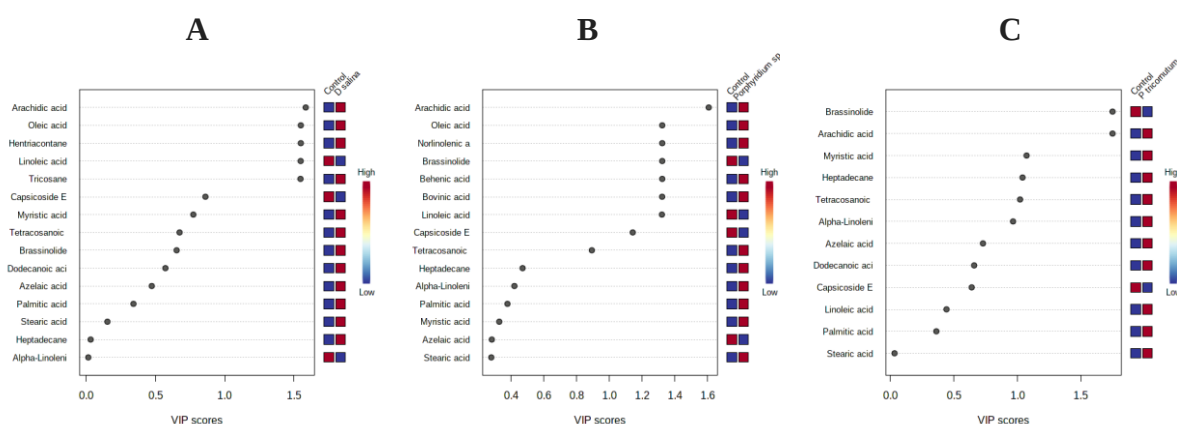


Figure 2. Important metabolites in response to PSs treatment identified by partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) in. Fitting top metabolites according to the VIP (variable importance in projection) score in In control plants and plants treated with PSs are shown. Colored boxes indicate the relative concentrations (red, up-regulation; green, down-regulation) of the corresponding metabolite in each group.

2.4.3. Metabolic Pathway Analysis

In general, eight biosynthetic pathways were induced by the three PS treatments namely; Linoleic acid metabolism, biosynthesis of unsaturated GA, biosynthesis of fatty acids, biosynthesis of cutin, suberin and wax, biosynthesis of brassinosteroids, elongation of fatty acids, degradation of fatty acids, and metabolism of alpha-linolenic acid. Based on the p-value ($p < 0.05$), *Porphorydium sp.* PS treatment significantly induced all pathways (linoleic acid metabolism, biosynthesis of unsaturated FA, fatty acid biosynthesis, cutin, suberine and wax biosynthesis, brassinosteroid biosynthesis, fatty acid elongation, fatty acid degradation and alpha-Linolenic acid metabolism), except the alpha-Linolenic acid metabolism pathway. P-values for the induced pathways were (0; 0; 3.11E-07; 3.84E-06; 4.90E-06; 0.032053; 0.032053; 0.384) respectively. *D.salina* PSs significantly induced the pathways; Linoleic acid metabolism, Biosynthesis of unsaturated FA, Fatty acid biosynthesis and Cutin, suberine and wax biosynthesis with p-values (0; 1.39E-07; 7.77E-07; 1.51E-06) respectively. *P.tricornutum* PSs induced the linoleic acid metabolism, brassinosteroid biosynthesis, fatty acid biosynthesis, and the biosynthesis of unsaturated FA (0; 0; 7.98E-06; 0.00031577) respectively. See (Table 2).

Table 2. The PSs microalgae effect on metabolic pathway enrichment analysis based on p-value less than 0.05.

	Control vs D.salina				Control vs Porphorydium sp				Control vs P.tricornutum			
	Total Cmpd	Hits	Raw p	FDR	Total Cmpd	Hits	Raw p	FDR	Total Cmpd	Hits	Raw p	FDR
Linoleic acid metabolism	4	1	0	0	4	1	0	0	4	1	0	0
Biosynthesis of unsaturated FA	22	6	1.39E-07	5.57E-07	22	6	3.84E-06	7.69E-06	22	5	0.00031577	0.00063154
Fatty acid biosynthesis	56	5	7.77E-07	2.07E-06	56	5	4.90E-06	7.84E-06	56	4	7.98E-06	2.13E-05
Cutin, suberine and wax biosynthesis	18	2	1.51E-06	3.03E-06	18	3	3.11E-07	8.29E-07	18	1	0.0737	0.0737
Brassinosteroid biosynthesis	26	1	0.055008	0.088013	26	1	0	0	26	1	0	0
Fatty acid elongation	23	1	0.089892	0.10273	23	1	0.032053	0.036632	23	1	0.0737	0.0737
Fatty acid degradation	37	1	0.089892	0.10273	37	1	0.032053	0.036632	37	1	0.0737	0.0737
alpha-Linolenic acid metabolism	28	1	0.98314	0.98314	28	1	0.384	0.384	28	1	0.062669	0.0737

The total Cmpd is the total number of compounds in the pathway; the hit is the matched number. The p-value is originally 314 calculated from the enrichment analysis; the -lg(p-value) is the p-value adjusted by logarithm operation based on 10; the FDR is the p-value 315 adjusted using False Discovery Rate results from the pathway analysis.

2.4.4. Phytohormones profiling

Analysis of phytohormone profiles in plant leaves treated with or without microalgal PSs, using UHPLC-MS (Q-Exactive, ThermoFisher Scientific) (Fig. 3). The phytohormones : Gebirline

Actif 1 et 4 (GA1 et GA4), Indol-3-Acetic Acid (IAA), Abscicic Acid (ABA), Jasmonic Acid (JA), Salicylic Acid (SA), DiHidroZeatine (DHZ), IsoPenteniladenine (iP) and t-Zeatine (tZ) were detected across all samples (**Fig. 3A and B**). Certain acid hormones (IAA, ABA then JA) were abundantly synthesized, whereas, other acid phytohormones such as SA, GA4, and GA1 and basic hormones (iP, DHZ and tZ) were detected in minimal concentrations (**Fig. 3A and B**). *P. tricornutum* PSs induced a highly significant accumulation of the phytohormones tZ and GA4 compared to control plants (treated only with H₂O) (**Fig. 3B**). However, *P. tricornutum* PSs caused a highly significant reduction of IAA and DHZ synthesis and a moderately significant reduction of GA1 and SA (**Figure 3A and B**). The treatment had no significant effect on the synthesis of JA, ABA, and iP.

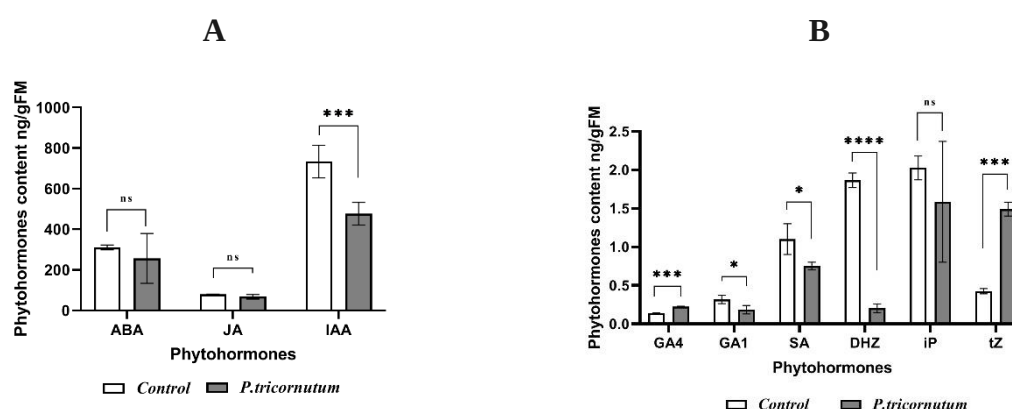


Figure 3. Phytohormones content in tomato plants after treatment with PS microalgae. The hormones induction was analyzed at 24h after treatment in control and PSs treated plants. Values with “*” are significantly different ($p < 0.05$). (Mean $\pm$ S.E., $n = 3$); (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

2.5. Discussion

2.5.1. Gene expression analysis

The studied microalgal PSs induced MAPK1 and MAPK2. MAPK3,2 and 6 were induced only by *D. salina* and *Porphyridium sp* PSs, whereas *P. tricornutum* PSs induced MAPK4 and MAPK7. These results indicate that the different microalgal PSs induced the transmission of defense signals through the MAPKs cascade. This induction is accompanied by an overexpression of SA dependent defense PR genes, especially PR1 and the acidic forms of Glucanase and Chitinase which were induced by *Porphyridium sp*. In contrast, the basic forms of Glucanase and Chitinase were induced by *D. salina* and *P. tricornutum*. Concerning the JA dependent plant defence pathway, the different microalgal PSs induced the reduction of the

expression of genes generally specific to this pathway (Lox, PAL, and PI2) except PI2 which was upregulated.

These results indicate that the transport of the defense signals from the outer part of the membrane to the Transcriptional factors is carried out by the MAPKS cascade via the SA dependant defence pathway after the activation of the PRS genes (PR1, Glucanase and Chitinase), especially by *Porphorydium* sp. PSs. Therefore, these PS treatments have the potential to reduce the expression of JA-related defense genes (Lox, PAL and PI2). Melech-Bonfil et al 2011 (Shujuan Zhang et al. 2018) demonstrated that SlMAPK3 (*S.lycopersicum* MAPK3) is primarily and positively involved in the regulation of tomato resistance to *B.cinerea* via the control of ROS, SA and JA defense signaling pathways. The authors showed that SlMAPK3 increases the expression of SA-related defence genes (SlPR1, SlPAD4 and SlEDS1) but reduces the expression of JA-dependent genes (SlLOX, SlPI1 and SlPI2). Our results correlate with the study by (Meng and Zhang 2013), which revealed that one of the first signalling pathways that regulates the expression of defense genes after plant infection by pathogens is the activation of MAPK cascades. Another study conducted by (Guo et al. 2021), indicated that SlMAPK3, as a primordial upstream signalling kinase, with a direct regulatory effect on downstream transcription factors (SlERF1 and SlPti5) to induce the expression of PR genes (SlPR1, SlPR5 and SlCHI9), as an immune response induced by yeast cell wall components in cherry tomato. Studies have shown that MAPK1/2/3 have the potential to mediate both the resistance of tomato plant to bacterial wilt (Y. Chen et al. 2009) and tomato fruit resistance to *B. cinerea* disease (Zheng et al. 2014). Several studies have shown the role of *S. lycopersicum* MAPKS (SlMAPK) in tomato defense against biotic stresses. SlMPK1, SlMPK2 and SlMPK3 play important roles in the system-mediated response to herbivory insects by regulating jasmonic acid (JA) biosynthesis and the expression of JA-dependent defense genes in tomato (Kandoth et al., 2007). In addition, SlMPK2 and SlMPK3 are involved in tomato defense mechanisms against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Mayrose, Bonshtien, and Sessa 2004; Melech-Bonfil and Sessa 2011).

A study by (Andargie and Li 2016) demonstrated that after a 24H infection of rice plants by the biotrophic rice smut fungus (*U. virens*) induced a high expression of SA dependent defense PRs genes namely PR1, PR2 and PR5. Salicylic acid-primed defense response in octoploid strawberry 'Benihoppe' leaves induced resistance against *Podosphaera aphanis* through enhanced accumulation of proanthocyanidins and the upregulation of pathogenesis-related

genes (Feng et al. 2020). The same study demonstrated that pre-treatment and inoculation of strawberry plants 'Benihoppe' with SA and *Podosphaera aphanis* respectively induced an antagonistic regulation of the SA and JA signalling pathways. This regulation is represented by an increase in the expression of SA-responsive genes (in particular PR1, PR2, PR3 and PR5) compared to a decrease in the expression of JA-responsive genes (FaJAR1, FaAOS and FaLOX2).

2.5.2. Metabolic Pathway Analysis

The differential metabolite pathway map indicates that some essential metabolites were significantly enhanced in response to PS treatment.

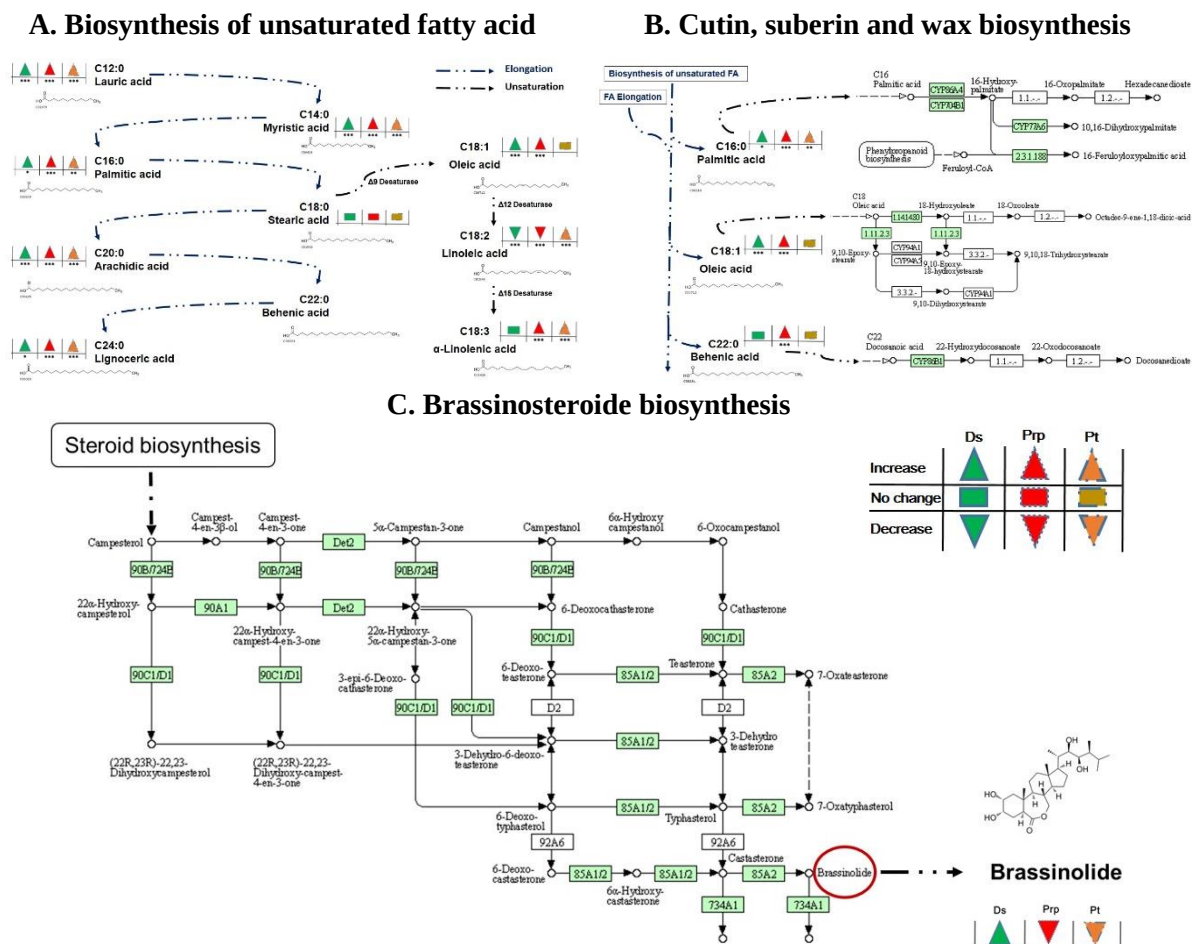


Figure 4. Summary scheme showing the main PSs treatment-induced changes detected at the metabolite levels. Biosynthesis of unsaturated FA pathway (A); Cutine, suberine and wax biosynthesis pathway (B); Brassinosteroide biosynthesis pathway (C). Statistically differentially regulated metabolite are displayed in bold. The triangles orientation (Upwards orientation, Up-regulation; Downwards, Dawn-regulation) and rectangles (No-change) indicate the variations in metabolites of control and treated plants. Green, red and orange indicate *de D.salina* (Ds), *Porphorydium sp* (Prp) and *P. tricornutum* (Pt) treatments respectively. Asterisks indicate statistically significant metabolites (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). All pathways were obtained from MetaboAnalyst online database (available online: <http://www.metaboanalyst.ca>).

2.5.3. UFA biosynthesis pathway

The UFA biosynthetic pathway is significantly induced by all three- PS treatments; *D.salina*, *Porphorydium* sp and *P. tricornutum* (**Table 2**). The metabolites detected and involved in this pathway are ; Oleic acid (C18:1), Linoleic acid (C18:2) and alpha Linolenic acid (C18:3). *D. salina*; *Porphorydium* sp and *P. tricornutum* significantly induced the metabolites: (C18:1); (C18:1 and 18:3) and (C18:2 and 18:3) respectively (**Fig. 4A**).

C18:1 (oleate), C18:2 (linoleate) and C18:3 (α -linolenate) are the three most dominant unsaturated fatty acid components with 18 carbon atoms (C18) in most Plants (M. He et al. 2020). These molecules have potentialities closely associated with abiotic and biotic stresses, they also play a regulatory role in plant defense (Lim et al. 2017). C18 UFAs play regulatory roles in plant defense (Lim et al. 2017). 18:1 is involved in crosstalk between salicylic acid (SA) and JA signalling pathways against pathogen invasion (M. He et al. 2020). Unsaturated fatty acids (UFAs) are coming into the limelight as one of the general defense systems against various biotic and abiotic stresses. C18 UFAs serve as intrinsic antioxidants and precursors of various bioactive molecules [typically the stress hormone, jasmonic acid (JA)], and stocks of extracellular barrier constituents such as cutin and suberin (M. He et al. 2020).

2.5.4. Cutine, suberine and wax biosynthesis pathway

As mentioned in the results section, the cutin, suberin and wax pathways were significantly induced by *D. salina* and *Porphorydium* sp. PS treatments (**Table 2**). The precursor metabolites detected in these pathways were Palmitic acid (C16:0), (C18:1) and Behenic acid (C22:0). According to (**Fig. 4B**), (C16:0) is involved in the synthesis of hexadecandioate, 10,16-dihydroxypalmitate and 16-feruloyloxypalmitate. C18:1 is the precursor of the synthesis of Octadec-9-ene-1,18-dioic-acid and 9,10,18-trihydroxystearate, whereas C22:0 is involved in the synthesis of docosandioate (**Fig. 4B**). All these molecules are common monomers of cutin and suberin (Pollard et al. 2008). (C16:0), (C18:1) and (C22:0) were highly induced by (*D.salina*), (*D.salina* and *Porphorydium* sp.), and (*Porphorydium* sp.) PSs treatments, respectively. The cuticle usually consists of cutin and wax (epicuticular and intracuticular wax). The cutin polymer typically consists of esterified C16 and C18 hydroxy and epoxy ω , medium chain fatty acids, and some glycerols (Heredia, 2003). Cuticular wax is a complex mixture of very long chain fatty acids (C20-C40) and their derivatives which include alkanes, aldehydes, primary and secondary alcohols, ketones and esters. Depending on the species, secondary metabolites such as flavonoids and triterpenoids are part of wax components (Serrano et al.

2014). The cuticle is a physical barrier against many abiotic stresses, xenobiotics and pathogens. In addition, the different cuticular wax transformations induce various reactions that lead to resistance to necrotrophs (Serrano et al. 2014).

2.5.5. Brassinosteroïde biosynthesis pathway

The brassinosteroid biosynthetic pathway was significantly induced by microalgal PSs (**Table 2**). Brassinolide, the product molecule of the brassinosteroid pathway (**Fig. 4C**) was detected in significant concentrations. Brassinolide is synthesized from campesterol. This biosynthesis is ensured by the passage of the campesterol side chain through a series of hydroxylations, combined with reduction, oxidation and epimerization cycles (**Fig. 4C**) (Thomas 2016)(Srivastava 2002). The accumulation of Brassinolides was highly significant in leaves treated with *D. salina* PSs whereas *Porphyridium sp* and *P. tricornutum* PSs, significantly reduced its biosynthesis.

Brassinosteroids (BRs), in addition to their role as a growth hormone, have important functions in the regulation of plant defense (Anwar et al. 2018). They are modulators of plant defense responses to pathogen attacks, improve plant resistance against plant diseases, increase the efficiency of immunity triggered by pathogen-associated molecular patterns (PAMP), and serve as mediators between different defense signaling cascades including phytohormone signalling, DELLA proteins, pattern recognition receptor (PRR)-triggered innate immunity and interaction with plant pathogens. BRs also regulate sulphur metabolism and nitric oxide production and therefore affect plant immune responses (Kohli et al. 2019). Treatment of cucumber, tobacco, tomato and cotton with BR at low concentrations significantly increased their resistance to viral and fungal pathogens (Bajguz and Hayat 2009; Y. Song et al. 2021). Brassinosteroids play an essential role in biotic stress tolerance by activating enzymes, biotic resistance genes, antioxidants, hormones, transcriptional factors, and signaling pathways to reduce biotic stress damage (Anwar et al. 2018).

2.5.6. Phytohormones profiling

As illustrated in (**Fig. 3**), tZ (t-Zeatine) and GA4 (Geberlic acid 4) were significantly induced, whereas the microalgal PS treatment significantly reduced SA biosynthesis accompanied by a non-significant effect on AJ synthesis. Several studies have shown that cytokinin phytohormones play a role in modulating the plant responses to various pathogens, (hemi)biotrophic and necrotrophic (J. Choi et al. 2010). Plant cytokinins induced the resistance

in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*), by minimizing the growth of *Pst* ten-fold compared to control plants (J. Choi et al. 2010). The exogenous application of cytokinin enhanced trans-Zeatin (t-Zeatin) concentration and modulated the SA-dependent signalling pathway to induce resistance against *Pst* (J. Choi et al. 2010). The latter corresponds with the present study where tZ synthesis was accompanied by reduced SA synthesis.

The antagonistic effect and the complete interaction network of cytokinins with other immunity-relevant phytohormones is not yet understood (D. K. Großkinsky, van der Graaff, and Roitsch 2014). Studies have shown that this interaction can be antagonistic or complementary between cytokinins, SA and JA. For example, the study by **Grosskinsky et al.** (D. K. Großkinsky et al. 2011) reported that cytokinin defense mechanisms in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) were under salicylic acid dependent transcriptional regulation. In contrast, the cytokinin-mediated resistance of *N. tabacum* to *Pst* were essentially independent of SA.

In this study, the overexpression of PR1, glucanase b and chitinase b, accompanied by tz synthesis, is concomitant with a study by (Veselova et al. 2021), where the exogenous application of zeatin to wheat plants induced the up-regulation of SA-dependent genes (PR1 and PR2), which enhanced the resistance of wheat to *S. nodorum*. Our results are also similar to the findings of (B. Li et al. 2021), where exogenous application of Cytokinin to *Arabidopsis* plants enhanced the expression levels of defense-related genes but not salicylic acid (SA), resulting in higher resistance to *B. cinerea*. Another study by (Argueso et al. 2012) showed that the susceptibility of *Arabidopsis* to the biotrophic oomycete *Hpa Noco2* was reduced after the plants' treatment with high concentrations ($>10\ \mu\text{M}$) of Cytokinin. The treatment also induced an overexpression of defense genes.

Polysaccharides have a different mode of action compared classical elicitors, especially on the interaction of hormones (Rachidi et al. 2021). After treatment of tomato plants with PSs, the induction of PRs genes, PRs proteins, biosynthetic pathways of metabolites, ROS and polyphenols, is modulated by enhanced synthesis of tZeatin, reduced SA synthesis, and the inhibition of JA synthesis. Thus, the present study opens a new promising avenue to polysaccharide bioelicitors' mode of action in the induction of plant defense mechanisms.

2.5.7. PCA analysis and correlation

The proportion of variance has a commensurate percentage of two principal components which reaches 72.24% which means that the two components represent and explain the majority of the variables studied (**Fig. 6B**). The PCA analysis presented in (**Fig. 5A and B**), shows that the polysaccharide treatment originating from *Porphorydium sp* induced the majority of the variables, namely sterols, lipids, alkanes, MAPKs (1,2 and 4) and proteins PR, PR1, Glucanase a and Chitinase a. A second group containing LOX, MAPK7 and tZ and phytohormones is strictly induced by the original *P.tricornutum* treatment. While *D.salina* highly induced Glucanase b, Chitinase B, MAPK (3,5 and 6), PI(1 and 2) and PAL. (**Fig. 6C**), presents the Pearson r correlation between the different variables studied: three groups with a positive and significant correlation are seen. **i)**, between MAPK (1-7) and (Glucanase b, Chitinase b, PI1, Lipids, Steroids, GA4 and tZ). **ii)**, between (PR1, Glucanase a, Chitinase a, PI2, Lox, PAL) and (PR1, Glucanase a, PI2, Lox, PAL, Lipid, Sterol, Alkanes and all phytohormones except GA4 and tZ). **iii)**, between (Glucanase b, hitinase b, PI1) and (MAPK1-7, Glucanase b, hitinase b, PI1, Lipi, Sterols, Alkanes, GA4 and tZ). A positive and significant correlation was also noticed between the different hormones except GA4 and tz.

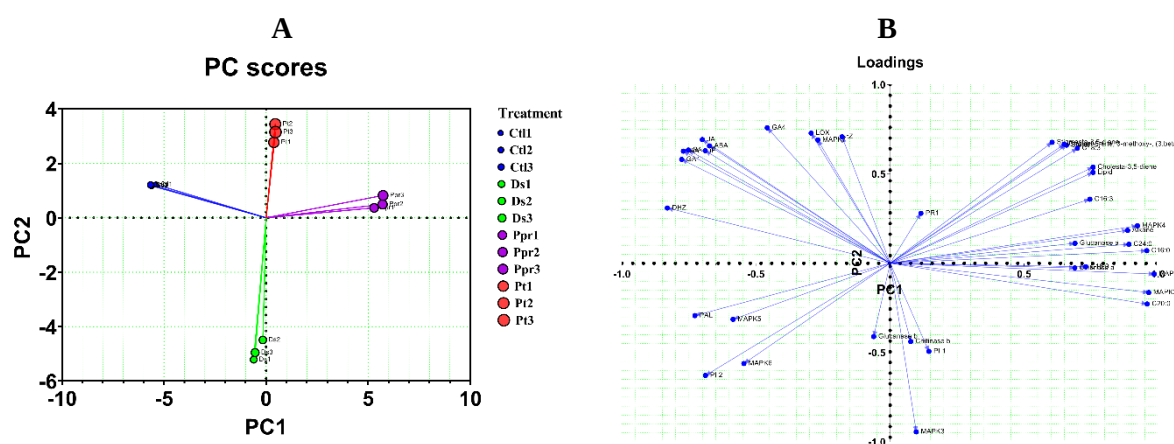


Fig. 5. Principal component analysis (PCA); scores for treatments (A) and loadings different variables (B) in tomato leaves after treatment with PSs. Graphpad™ Prism 9 was used to perform the principal component analysis (PCA) analysis.

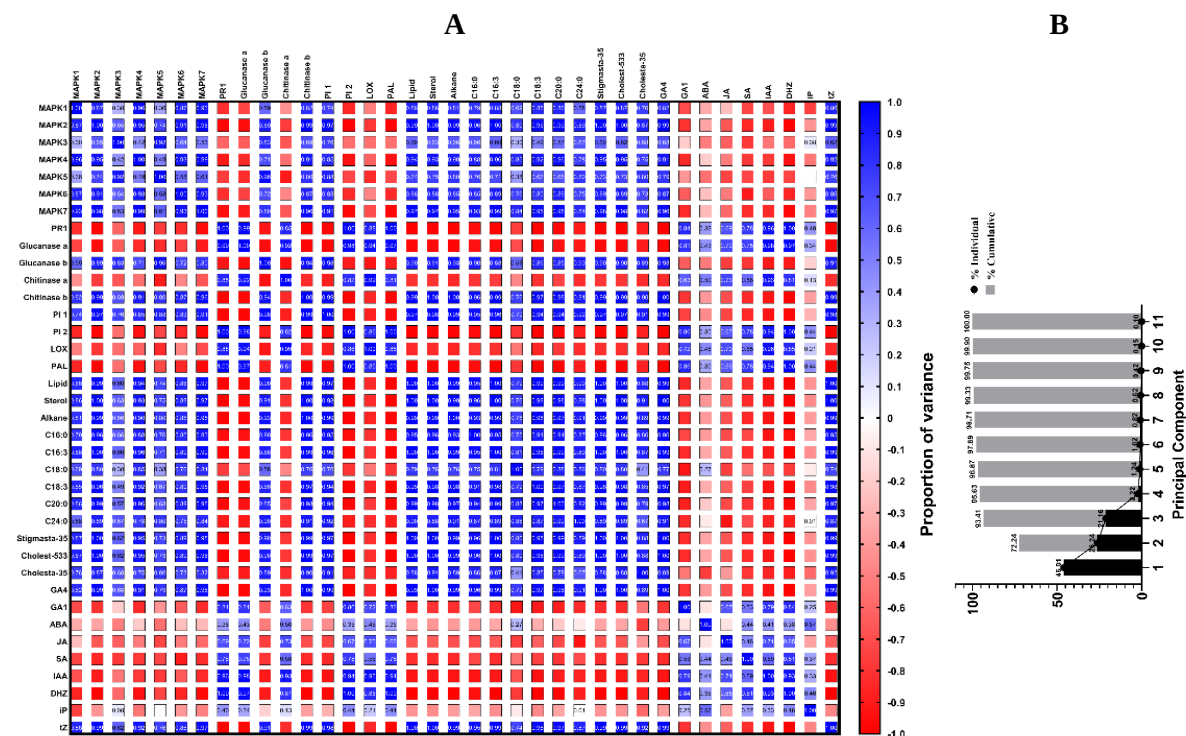


Fig. 6. Graphical Pearson correlation matrix of all variables induced after treatment of tomato plant with PSs treatment. Pearson correlation r-values were determined using GraphPad Prism 9. Colors are added for better visualization. The colors span from dark blue to dark red, where dark blue denotes a r value of 1, and dark red indicates a r value of -1.

2.6. Conclusion

Microalgal polysaccharides can be a biotechnological alternative, which allows the induction of defense mechanisms in plants, thereby increasing their resistance to pathogenic attacks. Treatment of tomato plants with microalgae PSs induced different genes related to plant defense; MAPKS responsible for signal transduction, genes dependent on the SA pathway, and genes dependent on on JA pathway, especially PI1. In addition, PSs exhibited significant effects on the lipidic metabolite biosynthetic pathways: Linoleic acid metabolism, biosynthesis of unsaturated GA, biosynthesis of fatty acids; biosynthesis of cutin, suberin and wax, biosynthesis of brassinosteroids, elongation of fatty acids, degradation of fatty acids, and metabolism of alpha-linolenic acid. Microalgal PSs derived from *P. tricornutum* also modified plant hormone signaling pathways, which was confirmed by the increase in tZ and GA4 levels, and the reduction in IAA, DHZ, GA1 and SA levels. *P. tricornutum* had no significant effect on JA, ABA and iP biosynthesis.

These results indicate that Microalgae PSs treatment induces the expression of Pathogenesis-Related Genes and regulates Lipidomic Pathway and hormones cross-talk. Thus, microalgae

polysaccharides are a promising biotechnological alternative bioresource for the development of biostimulants and bioelicitors contributing to plant protection, crop yield and productivity and minimizing chemical use in agriculture.

Funding

The authors would like to thank the Ministry of Higher Education and the MAScIR Foundation, Morocco, for providing financial support, materials and the platform for this project.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors highly acknowledge The MAScIR foundation, Morocco for providing materials and their financial support to complete this project. The correction of the english language is assured by Chanda, my warmest thanks to Miss J.M. Chanda for her time and her enormous effort.

2.7. References

- Doughari, J. (2015).** An overview of plant immunity. *J. Plant Pathol. Microbiol*, 6(11), 10-4172.
- Wiesel, L., Newton, A. C., Elliott, I., Booty, D., Gilroy, E. M., Birch, P. R., & Hein, I. (2014).** Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in plant science*, 5, 655.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006).** The plant immune system. *nature*, 444(7117), 323-329.
- Dangl, J. L., Horvath, D. M., & Staskawicz, B. J. (2013).** Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, 341(6147), 746-751.
- Truman, W., Bennett, M. H., Kubigsteltig, I., Turnbull, C., & Grant, M. (2007).** Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proceedings of the national academy of sciences*, 104(3), 1075-1080.
- Ton, J., Flors, V., & Mauch-Mani, B. (2009).** The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in plant science*, 14(6), 310-317.
- Pedley, K. F., & Martin, G. B. (2005).** Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. *Current opinion in plant biology*, 8(5), 541-547.

- Truman, W. M., Bennett, M. H., Turnbull, C. G., & Grant, M. R. (2010).** Arabidopsis auxin mutants are compromised in systemic acquired resistance and exhibit aberrant accumulation of various indolic compounds. *Plant physiology*, 152(3), 1562-1573.
- Mishra, A. K., Sharma, K., & Misra, R. S. (2012).** Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants. *Journal of plant interactions*, 7(2), 95-120.
- García-Mier, L., Guevara-González, R. G., Mondragón-Olguín, V. M., del Rocío Verduzco-Cuellar, B., & Torres-Pacheco, I. (2013).** Agriculture and bioactives: achieving both crop yield and phytochemicals. *International journal of molecular sciences*, 14(2), 4203-4222.
- Rachidi, F., Benhima, R., Kasmi, Y., Sbabou, L., & Arroussi, H. E. (2021).** Evaluation of microalgae polysaccharides as biostimulants of tomato plant defense using metabolomics and biochemical approaches. *Scientific reports*, 11(1), 1-16.
- Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A., & Brown, P. H. (2017).** Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in plant science*, 7, 2049.
- Wiesel, L., Newton, A. C., Elliott, I., Booty, D., Gilroy, E. M., Birch, P. R., & Hein, I. (2014).** Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in plant science*, 5, 655.
- Kocira, S., Szparaga, A., Kocira, A., Czerwińska, E., Wójtowicz, A., Bronowicka-Mielniczuk, U., ... & Findura, P. (2018).** Modeling biometric traits, yield and nutritional and antioxidant properties of seeds of three soybean cultivars through the application of biostimulant containing seaweed and amino acids. *Frontiers in plant science*, 388.
- Stadnik, M. J., & Freitas, M. B. D. (2014).** Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. *Tropical Plant Pathology*, 39(2), 111-118.
- Vera, J., Castro, J., Gonzalez, A., & Moenne, A. (2011).** Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. *Marine drugs*, 9(12), 2514-2525.
- Aitouguinane, M., Bouissil, S., Mouhoub, A., Rchid, H., Fendri, I., Abdelkafi, S., ... & Delattre, C. (2020).** Induction of natural defenses in tomato seedlings by using alginate and oligoalginates derivatives extracted from Moroccan brown algae. *Marine drugs*, 18(10), 521.
- Abouraïcha, E., El Alaoui-Talibi, Z., El Boutachfaiti, R., Petit, E., Courtois, B., Courtois, J., & El Modafar, C. (2015).** Induction of natural defense and protection against *Penicillium*

expansum and *Botrytis cinerea* in apple fruit in response to bioelicitors isolated from green algae. *Scientia Horticulturae*, 181, 121-128.

Ghannam, A., Abbas, A., Alek, H., Al-Waari, Z., & Al-Ktaifani, M. (2013). Enhancement of local plant immunity against tobacco mosaic virus infection after treatment with sulphated-carrageenan from red alga (*Hypnea musciformis*). *Physiological and molecular plant pathology*, 84, 19-27

Drira, M., Elleuch, J., Ben Hlima, H., Hentati, F., Gardarin, C., Rihouey, C., ... & Fendri, I. (2021). Optimization of exopolysaccharides production by *porphyridium sordidum* and their potential to induce defense responses in *Arabidopsis thaliana* against *Fusarium oxysporum*. *Biomolecules*, 11(2), 282.

Zhang, S., Wang, L., Zhao, R., Yu, W., Li, R., Li, Y., ... Shen, L. (2018). Knockout of *SlMAPK3* Reduced Disease Resistance to *Botrytis cinerea* in Tomato Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi:10.1021/acs.jafc.8b02191

Meng, X., & Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual review of phytopathology*, 51, 245-266.

Chen, Y. Y., Lin, Y. M., Chao, T. C., Wang, J. F., Liu, A. C., Ho, F. I., & Cheng, C. P. (2009). Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene-, salicylic acid-and mitogen-activated protein kinase-related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. *Physiologia Plantarum*, 136(3), 324-335.

Zheng, Y., Hong, H., Chen, L., Li, J., Sheng, J., & Shen, L. (2014). LeMAPK1, LeMAPK2, and LeMAPK3 are associated with nitric oxide-induced defense response against *Botrytis cinerea* in the *Lycopersicon esculentum* fruit. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(6), 1390-1396.

Guo, J., Sun, K., Zhang, Y., Hu, K., Zhao, X., Liu, H., ... & Wang, Y. (2021). *SlMAPK3*, a key mitogen-activated protein kinase, regulates the resistance of cherry tomato fruit to *Botrytis cinerea* induced by yeast cell wall and β -glucan. *Postharvest Biology and Technology*, 171, 111350.

Mayrose, M., Bonshtien, A., & Sessa, G. (2004). LeMPK3 is a mitogen-activated protein kinase with dual specificity induced during tomato defense and wounding responses. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 14819-14827.

Melech-Bonfil, S., & Sessa, G. (2011). The *SlMKK2* and *SlMPK2* genes play a role in tomato disease resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Signaling & Behavior*, 6(1), 154-156.

He, X., Wang, C., Wang, H., Li, L., & Wang, C. (2020). The function of MAPK cascades in response to various stresses in horticultural plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 952.

Andargie, M., & Li, J. (2016). Arabidopsis thaliana: a model host plant to study plant–pathogen interaction using rice false smut isolates of *Ustilaginoidea virens*. *Frontiers in plant science*, 7, 192.

Feng, J., Zhang, M., Yang, K. N., & Zheng, C. X. (2020). Salicylic acid-primed defence response in octoploid strawberry ‘Benihoppe’ leaves induces resistance against *Podosphaera aphanis* through enhanced accumulation of proanthocyanidins and upregulation of pathogenesis-related genes. *BMC plant biology*, 20(1), 1-18.

Xin, Z., Cai, X., Chen, S., Luo, Z., Bian, L., Li, Z., ... & Chen, Z. (2019). A disease resistance elicitor laminarin enhances tea defense against a piercing herbivore *Empoasca* (Matsumurasca) onukii Matsuda. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.

He, M., Qin, C. X., Wang, X., & Ding, N. Z. (2020). Plant unsaturated fatty acids: Biosynthesis and regulation. *Frontiers in Plant Science*, 11, 390.

He, M., Qin, C. X., Wang, X., & Ding, N. Z. (2020). Plant unsaturated fatty acids: Biosynthesis and regulation. *Frontiers in Plant Science*, 11, 390.

Lim, G.-H., Singhal, R., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2017). Fatty Acid– and Lipid-Mediated Signaling in Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 505–536. doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035406

Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., & Ohlrogge, J. B. (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in plant science*, 13(5), 236-246.

Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., L’Haridon, F., & Métraux, J. P. (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in plant science*, 5, 274.

Thomas, B., Murphy, D. J., & Murray, B. G. (2016). *Encyclopedia of applied plant sciences*. Academic Press.

Srivastava, L. M. (2002). *Plant growth and development: hormones and environment*. Elsevier.

Anwar, A., Liu, Y., Dong, R., Bai, L., Yu, X., & Li, Y. (2018). The physiological and molecular mechanism of brassinosteroid in response to stress: a review. *Biological Research*, 51.

Kohli, S. K., Bali, S., Khanna, K., Bakshi, P., Sharma, P., Sharma, A., ... & Bhardwaj, R. (2019). A current scenario on role of Brassinosteroids in plant defense triggered in response to biotic challenges. *Brassinosteroids: Plant Growth and Development*; Springer: Singapore, 367-388.

- Bajguz, A., & Hayat, S. (2009).** Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant physiology and biochemistry*, 47(1), 1-8.
- Song, Y., Zhai, Y., Li, L., Yang, Z., Ge, X., Yang, Z., ... & Ren, M. (2021).** BIN2 negatively regulates plant defence against *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis* and cotton. *Plant biotechnology journal*, 19(10), 2097-2112.
- Choi, J., Huh, S. U., Kojima, M., Sakakibara, H., Paek, K.-H., & Hwang, I. (2010).** The Cytokinin-Activated Transcription Factor ARR2 Promotes Plant Immunity via TGA3/NPR1-Dependent Salicylic Acid Signaling in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 19(2), 284–295. doi:10.1016/j.devcel.2010.07.011
- Großkinsky, D. K., van der Graaff, E., & Roitsch, T. (2014).** Absciscic acid–cytokinin antagonism modulates resistance against *Pseudomonas syringae* in tobacco. *Phytopathology*, 104(12), 1283-1288.
- Großkinsky, D. K., Naseem, M., Abdelmohsen, U. R., Plickert, N., Engelke, T., Griebel, T., ... & Roitsch, T. (2011).** Cytokinins mediate resistance against *Pseudomonas syringae* in tobacco through increased antimicrobial phytoalexin synthesis independent of salicylic acid signaling. *Plant Physiology*, 157(2), 815-830.
- Veselova, S. V., Nuzhnaya, T. V., Burkhanova, G. F., Rumyantsev, S. D., Khusnutdinova, E. K., & Maksimov, I. V. (2021).** Ethylene-Cytokinin Interaction Determines Early Defense Response of Wheat against *Stagonospora nodorum* Berk. *Biomolecules*, 11(2), 174.
- Li, B., Wang, R., Wang, S., Zhang, J., & Chang, L. (2021).** Diversified Regulation of Cytokinin Levels and Signaling During *Botrytis cinerea* Infection in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 12, 584042. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.584042>
- Argueso, C. T., Ferreira, F. J., Eppe, P., To, J. P. C., Hutchison, C. E., Schaller, G. E., ... Kieber, J. J. (2012).** Two-Component Elements Mediate Interactions between Cytokinin and Salicylic Acid in Plant Immunity. *PLoS Genetics*, 8(1), e1002448. doi:10.1371/journal.pgen.1002448
- Rachidi, F., Benhima, R., Kasmi, Y. et al (2021).** Evaluation of microalgae polysaccharides as biostimulants of tomato plant defense using metabolomics and biochemical approaches. *Sci Rep* 11, 930 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78820-2>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta CT$ method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Seo, M., Jikumaru, Y., & Kamiya, Y. (2011).** Profiling of hormones and related metabolites in seed dormancy and germination studies. In *Seed Dormancy* (pp. 99-111). Humana Press.

3. Synthèse de 3^{ème} Article

L'induction de la résistance des plantes par les polysaccharides des macroalgues est une méthode efficace de contrôle des maladies et de protection contre les contraintes environnementales, qui est liée à l'activation ou à l'amélioration de plusieurs mécanismes de défense des plantes tels que la régulation positive de l'expression des gènes de défense impliqués dans la réponse à une large gamme de stress abiotiques et biotiques, et l'induction du système antioxydant et la production de métabolites secondaires (Maroua Drira et al. 2021).

L'analyse transcriptomique par Rt-PCR des feuilles de tomates traitées avec des PSs de microalgues a montré une régulation positive des gènes MAPK1 et MAPK2. MAPK4 a subi une surexpression très importante par les PSs de *Porphyridium sp* et *P.tricornutum*. On constate également qu'il existe une spécificité entre le traitement et le gène induit : MAPK3, MAPK5, MAPK6 sont induits par *D. salina* et MAPK7 est spécifiquement induit par *P. tricornutum*. Chez les plantes, les cascades MAPK ont été identifiées dans la transduction des signaux, notamment la division cellulaire, les réponses hormonales, le développement et la résistance aux maladies. La cascade MAPK se compose également de trois parties : MAPKKK, MAPKK et MAPK. 89 MAPKKKs, 5 MAPKKs et 16 MAPKs peuvent être trouvés dans la tomate (*Solanum lycopersicum*) (X. He et al. 2020). Dans une cascade de signalisation MAPK classique, MAPKKK est activé par des récepteurs stimulés de la membrane plasmique et transmet des signaux en aval (Wang et al. 2014). MAPKKK active MAPKK en phosphorylant le motif conservé S/T-XXXXX-S/T (S/T est une sérine/thréonine, et X est un acide aminé arbitraire) dans MAPKK (Rodriguez, Petersen, and Mundy 2010). Ensuite, MAPKK active MAPK en phosphorylant le motif TXY (T est une thréonine, Y est une tyrosine, et X est un acide aminé quelconque) dans MAPK (Taj et al. 2010). Grâce à la phosphorylation étape par étape, la cascade MAPK peut transmettre et amplifier les signaux aux protéines en aval et activer l'expression des gènes de résistance (Hamel et al. 2006). Les MAPK régulent l'expression de nombreux gènes par la phosphorylation de protéines, en particulier la phosphorylation de nombreux facteurs de transcription (Morris 2001) (Shuqun Zhang and Klessig 2001). Les cascades MAPK sont impliquées dans de multiples réponses de défense, y compris la signalisation des hormones de défense des plantes, la génération de ROS, l'activation des gènes de défense et la mort des cellules de la réponse hypersensible (HR) (Meng and Zhang 2013).

Plusieurs études ont été faites afin de savoir l'implication des MPKs dans la défense chez *S. lycopersicum* (SIMPK). Kandoth et al. (2007) ont constaté que les SIMPK1, SIMPK2 et SIMPK3, ont joué un rôle primordial dans la régulation de la biosynthèse de la JA et l'expression des gènes de défense dépendants du JA dans la tomate contre les insectes. SIMPK2 et SIMPK3 ont participé à la résistance de la tomate aux *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Mayrose, Bonshtien, and Sessa, 2004 ; (Melech-Bonfil and Sessa 2011). SIMPK1 et SIMPK2 ont été activés par SIMKK2 et SIMKK4. Ils sont surexprimés dans les feuilles de la tomate, et induisent la mort cellulaire en assurant la réponse contre *Pseudomonas syringae* pv (Pedley and Martin 2004). De plus, deux cascades MAPK, MEK2-WIPK et MEK1-NTF6, ont été impliquées dans la résistance aux maladies méditées par Pto chez la tomate en régulant l'expression de NPR1, un régulateur clé de la résistance systémique acquise (Ekengren et al. 2003).

PR1 et les formes acides de la Glucanase et de la Chitinase sont régulées à la hausse par *Phytophthora* sp. D'autre part, *D. salina* et *P. tricornutum* induisent très significativement la surexpression des formes basiques de la Glucanase et de la Chitinase. Les plantes traitées par les PSs de *D. salina* et *P. tricornutum* ont été observées comme ayant une régulation positive du gène PI1. NPR1 est le régulateur principal de la SAR méditée par le SA chez les plantes (Bhattacharya and Goswami 2020). Les β -1,3-glucanases végétales sont un groupe de protéines PR appartenant à la famille PR-2, tandis que les chitinases appartiennent à la famille PR-4. Les principaux composants de la paroi cellulaire de nombreux champignons phytopathogènes, dont *A. solani*, sont la chitine et le glucane. On pense donc que les β -1,3-glucanases et les chitinases jouent toutes deux un rôle antifongique en hydrolysant la paroi cellulaire fongique, ce qui a pour effet de désintégrer la cellule fongique. En outre, il a été démontré que les β -1,3-glucanases et les chitinases ont des effets indirects via la formation d'éliciteurs oligosaccharidiques, qui induisent en outre l'expression d'autres protéines PR (Dey et al. 2019; Rachidi et al. 2021). Notre résultat est comparable à ceux de (Dey et al. 2019). Le traitement des plantes de la tomate par l'alginate de sodium a induit la résistance aux pathogène, *A. solani*. Cette résistance est accompagnée par une surexpression des gènes dépendant de la voie de l'AS (NPR1 et Pr2). Aussi le traitement de tabac par carraghénane a induit la résistance contre *Septoria lycopersici*, virus de la mosaïque du tabac par la surexpression de gènes liés à la défense codant pour les protéines PR (Ghannam et al. 2013).

L'analyse des voies lipidomiques avec MetaboAnalyst-5. 0 a révélé que le traitement par *Porphyridium sp* induit significativement toutes les voies : métabolisme de l'acide linoléique (LAM), biosynthèse des acides gras insaturés (BUFA), biosynthèse des acides gras (FAB), biosynthèse de la cutine, de la subérine et de la cire (CSWB), biosynthèse des brassinostéroïdes (BrB), élongation des acides gras (FAE), dégradation des acides gras et métabolisme de l'acide alpha-linolénique (aLAM), à l'exception de la voie du métabolisme de l'acide alpha-linolénique. *D. salina* a induit de manière significative les voies LAM, BUFA, FB et CSWB. Enfin, *P. tricornutum*, a induit LAM, BrB, FB et BUFA. Sharma, N., et al. (N. Sharma et al. 2022) ont constaté que les BRS ont des propriétés antifongiques, antivirales et anti-ecdystéroïdes ; ce qui en fait des substituts potentiels des fongicides, pesticides et herbicides chimiques. De plus, les RB agissent comme des composés stéroïdiens non toxiques et sans danger pour l'environnement et qui ont le potentiel de moduler les réponses des plantes contre les stress abiotiques et biotiques (N. Sharma et al. 2022). les BRs sont impliquées dans la transduction des signaux, en particulier dans la régulation de la cascade de la protéine kinase activée par des agents mitogènes (MAPK), qui intervient à son tour dans le contrôle du développement, de la mort cellulaire et de la perception des signaux des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) (Ahanger et al. 2018).

L'UHPLC-MS a montré que le traitement par les PSs a induit une accumulation très significative des phytohormones tZ et GA4. D'autre part, il a induit une réduction hautement significative de la synthèse d'IAA et DHZ et une réduction modérément significative pour GA1 et SA. Le traitement n'a pas d'effet significatif sur la synthèse de JA, ABA et iP. L'étude de (Klarzynski et al. 2003) a révélé que le fucane induit la résistance du tabac au virus de la mosaïque du tabac via l'activation de certains marqueurs de résistance systémique acquise (SAR), tels que l'accumulation d'acide salicylique et l'expression du gène PR1. La combinaison des résultats, Protéines PRS, gènes PRs on peut constater que les polysaccharides des microalgues induisant les voies de défense dépendantes de L'AS. Mais le contenu en phytohormone AS est significativement réduite par le traitement PSs. Cette réduction est accompagnée par une amélioration significative de tZ. En plus de leur rôle comme hormone de croissance les cytokinines (tZeatine et iP) interviennent dans l'immunité des plantes (D. Großkinsky et al. 2013). Les PSs ont induit significativement la réduction de iP et l'amélioration tZ (trans-zéatine). Ce n'est que récemment qu'il a été démontré que les cytokinines jouent un rôle important dans l'immunité des plantes. Des niveaux accrus de

cytokinines telles que la trans-zéatine, qui sont considérées comme très actives, ont induit une résistance contre des agents pathogènes principalement (hémi-)biotrophes dans différentes espèces végétales (D. Großkinsky et al. 2013). L'étude menée par Großkinsky, D. et al (2013) a montré que l'infection de *Nicotiana tabacum* par l'agent pathogène microbien (hémi) biotrophe *Pseudomonas syringae* a induit une synthèse hautement significative de tZ. La même étude a montré qu'il y a aussi une amélioration de l'AS. Ce n'est pas le cas pour notre étude où l'AS est réduit après traitement par PSs. Dans l'étude de Sheikh, A. H., et al. (Sheikh et al. 2014), le traitement de *Nicotiana tabacum* par *Agrobacterium tumefaciens* a induit la résistance au *Pseudomonas syringae*, via l'induction l'expression des gènes tZeatine, PR1, gènes de la voie de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) du tabac comme MEK2, WIPK (wound-induced protein kinase) et SIPK (salicylic acid-induced protein kinase) (Sheikh et al. 2014). La réduction de l'AS par les polysaccharides est accompagnée par une inhibition de l'acide jasmonique. L'effet antagoniste et le réseau complet d'interaction des cytokinines avec d'autres phytohormones pertinentes pour l'immunité ne sont pas encore compris (D. K. Großkinsky, van der Graaff, and Roitsch 2014). Des études ont montré que cette interaction peut être antagoniste ou complémentaire entre les cytokinines, SA et AJ. Par exemple, l'étude citée par Grosskinsky et al, (D. K. Großkinsky et al. 2011) a révélé que chez *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), le mécanisme de défense par les cytokinines est sous régulation transcriptionnelle dépendante de l'acide salicylique. En revanche, la résistance de *N. tabacum* au Pst, médiée par les cytokines, est essentiellement indépendante du SA.

Suite à ces résultats, on peut constater que les polysaccharides ont un mode d'action différent des éliciteurs classiques, surtout au niveau de l'interaction des hormones. Donc, on peut dire qu'après traitement des plantes de la tomate par les PSs, l'induction des gènes PRs et les protéines PRs est assurée, par une forte synthèse de tZeatine, la réduction de la synthèse de l'AS et l'inhibition de l'AJ. Ainsi, une nouvelle piste prometteuse est ouverte pour étudier et analyser le mode d'action des biostimulants.

CHAPITRE IV



DISCUSSION GÉNÉRALE

Dernièrement l'agriculture mondiale affronte divers challenges à savoir ; (i) Assurer la nourriture a une population qui ne cesse d'augmenter ; (ii) Préserver la qualité et la sécurité de la production alimentaire ;(iii) Le changements climatique ; (iv) Les stress biotiques et abiotiques et (v) L'utilisation intensive des produits phytosanitaires. Pour faire face à ces défis, les comités scientifiques et industriels sont préoccupés pour trouver des alternatives biotechnologiques durables et respectueuses à l'environnement. Ces temps derniers, les microalgues sont exploitées dans l'agriculture comme une alternative stratégique pour le développement des biofertilisants, des biostimulants et des agents de contrôle biologique durables (Junior et al 2022). Les biostimulants et les bioéliciteurs sont des approches agricoles parmi d'autre, qui assurent une production qualitative et quantitative, une protection des cultures et une réduction de l'utilisation des intrants chimiques. Biostimulant selon Yakhin et al (2016a), est tout « *produit principalement basé sur des matières premières naturelles, utilisé à très petites doses pour la modification des processus physiologiques et biochimiques des plantes dans le but de réaliser plus complètement le potentiel génétique de leur productivité en raison de changements dans le statut hormonal, l'activation des processus métaboliques, l'augmentation de l'efficacité de la nutrition, la stimulation de la croissance des plantes, la stimulation de la tolérance des plantes au stress abiotique, le développement et le renforcement de la capacité à résister aux effets négatifs de divers facteurs de stress* » (O I Yakhin, Lubyantov, and Yakhin 2016). Le bioéliciteur peut être défini comme "une substance organique pour les facteurs de stress qui, lorsqu'elle est appliquée en petite quantité à un système vivant, induit ou améliore la biosynthèse de composés spécifiques qui jouent un rôle important dans l'adaptation des plantes à des conditions stressantes", l'élicitation "est l'induction ou l'amélioration de la biosynthèse de métabolites due à l'addition de traces d'éliciteurs". (Halder, Sarkar, and Jha 2019). Les biostimulants offrent une approche potentiellement nouvelle pour la régulation/modification des processus physiologiques des plantes afin de stimuler la croissance, d'atténuer les limitations induites par le stress et d'augmenter le rendement (Oleg I Yakhin et al. 2017).

Les microalgues comme microorganismes photosynthétiques sont très diversifiés et renferment une multitude de produits bioactifs. Les microalgues suscitent l'intérêt des industries agrochimiques et des agriculteurs, en raison de leurs propriétés de biostimulants et de biofertilisants. Les biostimulants des microalgues pourraient être utilisés dans la production végétale pour une durabilité de l'agriculture. Dans le monde entier, les biostimulants a base de

microalgues restent largement inexploitées (Ronga et al. 2019), de sorte que notre travail met en lumière certaines des recherches actuelles et des priorités de développement futur. Les expérimentations conduites dans le cadre de cette thèse visaient à étudier les effets biostimulants/bioéliciteurs des PSs microalgaux chez la tomate (*S. lycopersicum.L*). Dans ce contexte, les objectifs généraux de ces travaux de thèse, consistent à étudier l'effet des PSs microalgaux sur :

- *La biostimulation de la croissance, la réduction et l'assimilation de l'azote et la distribution des métabolites*
- *La bioélicitation des voies biochimiques, métabolomiques et transcriptomiques, dépendantes de la défense des plantes*

1. Les polysaccharides microalgaux comme biostimulant de la croissance, la réduction et l'assimilation de l'azote et du profil métabolique

Parmi les fonctions primordiales des biostimulants, on trouve, la stimulation de la croissance des plantes, l'augmentation de l'efficacité de la nutrition et l'activation des processus métaboliques (du Jardin, 2015 et Yakhin et al 2016).

1.1. La biostimulation de la croissance

Dans notre étude, le traitement des plantes de la tomate par les PSs microalgaux en conditions contrôlées a montré que les PSs d'*A. platensis*, *D. salina* et *Porphorydium sp.*, ont amélioré le nombre de nœuds, le poids sec des pousses et la longueur des pousses de 75 %, 46,6 %, 25,26 % respectivement. De plus, ce traitement a montré une amélioration du contenu en caroténoïdes, en chlorophylle et en protéines. 1 mg mL⁻¹ de *Porphorydium sp.* a augmenté significativement le contenu en caroténoïdes de 200 % par rapport au témoin non traité. De la même manière, PSs de *A. platensis* a amélioré l'activité chl a et chl b avec 90,1 %, 102,7 % respectivement par rapport au témoin. Ces résultats montrent bien que la PSs microalgaux, ont un effet bénéfique chez la tomate en stimulant les mécanismes de la croissance. Cet effet des PSs avait déjà été observé chez la tomate après l'apport d'extraits de microalgues comme biostimulants par traitement des semences et pulvérisation foliaire pour la culture (K.V., Behera, and P. 2020). Ce dernier a constaté que le traitement des grains par les extraits totaux des microalgues avec des concentrations allant de 20 à 60%, ont induits un pourcentage de germination plus rapide en 3 jours par rapport aux graines non traitées. Il a constaté aussi que les graines traitées par les

extraits microalgaux ont également montré une amélioration de la longueur des pousses, la longueur et le poids des racines. Ainsi, une amélioration de la teneur en chlorophylle et en biomasse fraîche et sèche ont également été obtenues (K.V., Behera, and P. 2020). Ces extraits microalgaux ont montrés le contenu en carbohydrates et en protéines de 40% et 26,18% respectivement. Selon K.V et al (2020) ces concentrations en carbohydrates et en protéines, pourraient potentiellement agir comme précurseurs de composés bioactifs pour stimuler la croissance des plantes. Une autre étude menée par Kim et al (2018), a montré que les extraits de *Chlorella fusca* ont stimulé la croissance et la qualité de la ciboulette chinoise et de l'épinard dans une ferme biologique. Cette amélioration de la croissance est présentée par l'augmentation de la largeur des feuilles et le poids frais de la ciboulette chinoise et une augmentation significative de l'épaisseur, le nombre de feuilles, le poids frais et le rendement des épinards traités par apport aux non traités (Kim et al. 2018). Par ailleurs, Garcia-Gonzalez et Sommerfeld (2016) ont évalué les propriétés de la microalgue *Acutodesmus dimorphus* en tant que biofertilisant et/ou biostimulant. Dans des conditions de serre, l'application foliaire de l'extrait d'algues à une concentration de 3,75 g mL⁻¹ sur des plants de tomates a provoqué une augmentation du nombre de branches et de fleurs par plante (Garcia-Gonzalez and Sommerfeld 2016).

1.2. La stimulation de la réduction et l'assimilation de l'azote

La voie de la réduction et l'assimilation de l'azote inorganique chez les plantes est un processus à forte intensité énergétique qui est étroitement coordonné avec la photosynthèse dans les feuilles. Ce processus est assuré par des enzymes et passe par plusieurs étapes ; l'absorption de nitrate ; la réduction du nitrate en nitrite par la nitrate réductase ; la réduction de nitrite en ammoniac par la nitrite réductase. L'ammoniac peut provenir de la réduction des nitrates, de l'absorption d'ammoniac ou de la photorespiration. L'assimilation de l'ammoniac est assurée par la voie de la glutamine synthétase/glutamate synthétase. Dans des conditions d'approvisionnement abondant en ammoniac ou de production interne élevée d'ammoniac par des réactions cataboliques, l'assimilation est assurée par la glutamate déshydrogénase (GDH) (Mahboobi, Yücel, and Öktem 2002). Dans cette étude, le traitement des plantes de la tomate par les PSs a montré une amélioration du contenu en protéines, et de l'activité de la Nitrate Réductase (NR), de la NAD-Glutamate Déshydrogénase (NAD-GDH). 1 mg mL⁻¹ de *Porphyridium sp.* a augmenté significativement l'activité NAD-GDH de 200 % par rapport au témoin. De la même manière, les PSs d'*A. platensis* ont amélioré l'activité de NR de 88,34 %

par rapport au témoin. En outre, il a été constaté que la teneur en protéines, qui atteint 88,3 % chez les plantes traitées par 0,5 mg mL⁻¹ de PSs proviennent de *D.salina*. Nos résultats sont en accord avec ceux de Puglisi et al. (2020). Ce dernier a constaté que le traitement des plantes de laitue par l'extrait de *S. quadricauda* a stimulé significativement la croissance des plantules de laitue, agissant principalement au niveau des pousses, du poids sec, de la chlorophylle, des caroténoïdes et des protéines. Il a aussi induit une augmentation des activités enzymatiques de la glutamate synthase (GOGAT), de la glutamine synthase (GS), qui sont des enzymes clés associées au métabolisme d'assimilation de l'azote (Puglisi et al. 2020; Kang et al. 2021; Gupta et al. 2012). Aussi Schiavon et al (2008) a montré que l'activité d'un certain nombre d'enzymes impliquées dans la réduction et l'assimilation de l'azote (nitrate réductase, NR ; nitrite réductase, NiR ; glutamine synthétase, GS ; glutamate synthétase, GOGAT ; aspartate aminotransférase, AspAT) a été significativement induite par l'apport d'extraits microalgues (Schiavon, Ertani, and Nardi 2008).

1.3. L'induction de la synthèse des métabolites

La performance biochimique des plantes est un paramètre très important pour l'amélioration de la santé des plantes et la qualité nutritionnelle des cultures. Ainsi l'autre rôle principal de biostimulant, la stimulation de la croissance végétale pourraient être associé à une induction de la synthèse de certains métabolites afin d'augmenter la teneur en composés bioactifs des plantes cultivées. De la sorte, la production agricole, en plus de son rôle qui réside dans l'augmentation des rendements des cultures et leur protection, devrait aussi se concentrer sur l'amélioration de leur qualité nutritionnelle, en particulier dans des conditions environnementales défavorables.

L'analyse métabolomique via GC-MS a également montré un changement dans les profils des lipides, des stérols et des alcanes. Généralement dans cette étude, les PSs microalgues ont induit la voie de la biosynthèse des acides gras (AGs) insaturés, surtout l'acide gras polyinsaturé à 18C, précisément, l'acide linoléique (C18 :3). Les trois acides gras polyinsaturés les plus abondants dans les plantes sont, l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide linolénique (M. He et al. 2020). Ces acides sont des composants des membranes, des modulateurs dans les glycérolipides et des réserves de carbone et d'énergie dans les triacylglycérols. Ils agissent comme des antioxydants intrinsèques, des précurseurs de divers composés bioactifs et des stocks de constituants de la barrière extracellulaire, et jouent un rôle important dans la défense des plantes contre les stress biotiques et abiotiques (M. He et al. 2020). En outre, ils présentent

une variété d'activités biologiques et de fonctions physiologiques dans le corps humain (M. He et al. 2020). Les AGs polyinsaturés (AGPI) (acides gras oméga-3 et oméga-6) jouent un rôle clé en tant que composés bioactifs alimentaires sains. Une consommation équilibrée d'AGPI peut affecter différents aspects de l'immunité et du métabolisme (Cencic and Chingwaru 2010). Dans la littérature, il a été noté que les bio-produits de grains de maïs augmentaient la teneur en huile de tournesol (acides gras oléique et linoléique) et diminuaient les autres acides gras saturés, mono-insaturés et polyinsaturés (Rehman, n.d.) 2018.

Notre étude a révélé que certains précurseurs des stérols ont augmenté, comme le cholestérol, le 6,22,24-triène, ce qui peut indiquer une augmentation de la biosynthèse des stérols et/ou des glycoalcaloïdes stéroïdiens dans les plantes traitées. Les phytostérols ont une structure et une fonction similaires à celles du cholestérol. Ces composés participent à la formation des membranes cellulaires et sont présents en faible quantité dans les légumes, les fruits, les céréales, les noix, etc. Ils sont généralement présents dans les fractions riches en graisses ou liposolubles des parties de plantes. Parmi les phytostérols alimentaires, les plus abondants sont le sitostérol (50 %) et le campesterol (33 %). Ils exercent de nombreux effets bénéfiques sur la prévention des maladies, par exemple certains types de cancer tels que les cancers du côlon, du sein et de la prostate. Les stérols sont également capables de réduire le taux de cholestérol (R. Yang et al. 2019; Godlewska et al. 2021). La pulvérisation foliaire d'extraits a modifié la composition en stérols des têtes de chou, ce qui était le plus visible après l'application de *Valeriana officinalis* (Godlewska et al. 2021).

Ces résultats suggèrent que l'effet positif des polysaccharides microalgues sur la croissance, la réduction et l'assimilation ainsi que l'induction des métabolites de la tomate se produit très probablement par la stimulation des voies métaboliques photosynthétiques et de l'assimilation de l'azote. Ainsi, les polysaccharides microalgues pourraient agir comme une alternative écologique et économique aux engrais chimiques pour promouvoir une agriculture durable.

2. Les polysaccharides induisent les voies biochimiques, métaboliques, transcriptomiques et hormonales de la défense naturelle des plantes

Les éliciteurs sont des composés qui stimulent tout type de défense de la plante, en favorisant le métabolisme secondaire pour protéger la cellule et la plante entière (Ramirez-Estrada et al. 2016). Parmi les principales fonctions de biostimulant/bioéliciteur c'est le changement du

potentiel génétique en raison de changer le statut hormonal et l'activation des processus métaboliques afin de développer et renforcer la capacité de la plante à résister et/ou tolérer les divers stress (O I Yakhin, Lubyantov, and Yakhin 2016). Cependant, les voies de signalisation immunitaire sous-jacentes modulées par ces PSs microalgues restent pour la plupart peu étudiées.

2.1. Effet sur les voies biochimiques et transcriptomiques

Cette étude a montré que les PSs microalgues ont le potentiel d'induire les voies biochimiques et transcriptomiques dépendantes de la bioélicitation de la défense des plantes. Cette induction est présentée par leur capacité, d'induire les activités enzymatiques du PAL, de la chitinase, de la 1,3-bêta-glucanase et de la POX ; de stimuler la synthèse des protéines ; des polyphénols et le H_2O_2 ; d'induire une régulation positive des gènes, MAPK qui sont responsables de la transduction du signal, PRs (PR1, Glucanase et Chitinase), et aussi les inhibiteurs des protéases (PI1). Ces résultats sont en accord avec ceux de (Marwa Drira, Elleuch, et al. 2021; Marwa Drira et al. 2022). Les exopolysaccharides produits par *Porphyridium sordidum* ont le potentiel d'induire la résistance des plantes d'*Arabidopsis thaliana* contre *Fusarium oxysporum*, via l'induction de l'accumulation des H_2O_2 , de l'activité de PAL, de la surexpression des gènes dépendantes de la défense (POX et SOD), et le protéin PR1 (Marwa Drira, Elleuch, et al. 2021). Drira et al (2022), a constaté que le traitement des vitroplants du palmier dattier par les exopolysaccharides sulfatés du *Porphyridium sordidum* a induit une forte accumulation des H_2O_2 et l'expression des gènes PR1, SOD et PAL.

2.2. Effet sur les voies métaboliques

L'analyse métabolomique via GC-MS et MetaboAnalyst-5.0 a montré que l'effet biostimulant des PSs microalgues sur les plantes de la tomate a induit divers voies de biosynthèses des métabolites à savoir ; le métabolisme de l'acide linoléique, la biosynthèse des acides gras insaturés, la biosynthèse des acides gras, la biosynthèse de la cutine, de la subérine et de la cire, la biosynthèse des brassinostéroïdes, l'élongation des acides gras, la dégradation des acides gras et le métabolisme de l'acide alpha-linolénique. Cette induction est confirmée par l'accumulation des acides gras (C16:3, C18:2 et C18:3, C18:0 et d'acide azélaïque), des alcanes et les phytostérols.

Plusieurs études ont montré que les brassinostéroïdes, à part leur rôle comme hormone de croissance, jouent un rôle primordial dans la protection des plantes contre un large spectre d'infections pathogènes (Khripach, Zhabinskii, and de Groot 2000; Nakashita et al. 2003). Le

traitement des plantes de pomme de terre par les BRs minimise la sévérité de l'infection par phytophthora (Khripach, Zhabinskii, and de Groot 2000). Aussi le traitement des plantes de Tabac par les BRs induit leur résistance aux virus de la mosaïque du tabac (TMV) ; au *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pst) et le champignon pathogène *Oidium* sp. Ils induisent aussi la résistance contre la pyriculariose et à la bactériose causées respectivement par *Magnaporthe grisea* et *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. chez le riz (Nakashita et al. 2003). Zhang et al (2015) ont constaté que les niveaux de BR étaient positivement corrélés avec la tolérance au virus de la mosaïque du concombre (CMV). Ils ont également montré que le traitement par les BRs atténuait les dommages causés par le photosystème, augmentait l'activité des enzymes antioxydantes et induisait l'expression des gènes associés à la défense en cas de stress dû au CMV chez Arabidopsis (D.-W. Zhang et al. 2015).

Les acides gras AGs et leurs dérivés participent à la régulation de l'immunité de base des plantes, de la résistance induite par les effecteurs, de la résistance systémique et d'autres voies de défense, améliorant ainsi la résistance des plantes aux divers stress(Xiao et al. 2022). La voie métabolique des acides gras joue un rôle principal dans l'induction et la signalisation de la défense des plantes (Kachroo and Kachroo 2009). On a attribué aux AGs que des rôles passifs dans les mécanismes de la défense des plantes, présentent les précurseurs biosynthétiques des composants cuticulaires et l'acide jasmonique (Kachroo and Kachroo 2009). Les acides gras C18:0, C18:1, C18:2 et C18:3, interviennent directement ou indirectement dans le processus de signalisation de la défense des plantes. L'accumulation de C18:0 accompagnée par l'inhibition de la colonisation des graines de soja par l'agent pathogène, *Diaporthe phaseolorum*. Aussi, l'inoculation des plantes d'haricots par les rhizobactéries a induit sa résistance au *Botritis cinerea* via l'induction des acides gras C18:2 et C18:3 . Les AGs, C16, C18 et les acides gras à longue chaîne, contribuent à la biosynthèse de la cuticule des plantes, qui constitue la première barrière contre les pathogènes. Outre la biosynthèse de la cuticule, les AGs contribuent également à un rôle de signalisation non caractérisé de la perméabilité cuticulaire dans la défense contre les pathogènes fongiques. Les changements dans le flux des AGs peuvent également inhiber la réponse SAR en entravant la formation de la cuticule, qui est importante pour la génération et la perception du signal mobile de la résistance systémique acquise (SAR) (Lim et al. 2017). Ce dernier induit à son tour le SAR via son effet sur la biosynthèse du G3P. Le lipide digalactosyldiacylglycerol (DGDG) est essentiel pour la production de NO pendant le SAR (Lim et al. 2017)

2.3. Effet sur les voies de biosynthèse et interaction entres les phytohormones

L'analyse par L'UHPLC-MS des feuilles de la tomate traitées par les PSs de *P. tricornutum*, accumulent des niveaux plus élevés des acides tZ et GA4. D'autre part, ils ont induit une réduction significative de la synthèse de IAA, DHZ GA1 et SA. Le traitement n'a pas d'effet significatif sur la synthèse de, iP, ABA et JA.

La combinaison des résultats, Protéines PRs, gènes PRs nous permet de constater que les polysaccharides des microalgues induisent les voies de défense dépendantes de l'AS. Mais le contenu en phytohormone AS est significativement réduit par le traitement PSs. Cette réduction est accompagnée par une amélioration significative de tZ. Ce n'est que récemment qu'il a été démontré que les cytokinines jouent un rôle important dans l'immunité des plantes. Des niveaux accrus de cytokinines telles que la trans-zéatine, qui sont considérées comme très actives, ont induit une résistance contre des agents pathogènes principalement (hémi-)biotrophes dans différentes espèces végétales (D. Großkinsky et al. 2013). Des études citées par Backer, Naidoo, and Van den Berg (2019) ont montrées que l'induction de la défense dépend du niveau de biosynthèse de l'AS. Ces études ont mis en évidence l'existence de deux à six gènes NPR1-like et surtout deux paralogues de NPR1, NPR3 et NPR4 qui ont une affinité différente avec le SA (Backer, Naidoo, and Van den Berg 2019). Ils régulent l'activité et la stabilité de NPR1 de différentes manières dépendantes de la concentration de l'AS : à une concentration élevée de SA, NPR3 est censé réguler la dégradation de NPR1 pendant la phase d'immunité déclenchée par les effecteurs (ETI), entraînant une mort cellulaire programmée localisée, tandis que NPR4 est activé à une concentration plus faible de SA et provoque l'activation de l'expression du gène PR (Backer, Naidoo, and Van den Berg 2019). Le gène NPR1 est un récepteur de l'AS induisant une modification de la structure de la protéine qui est essentielle pour l'activation des gènes PR (Pieterse et al. 2012).

A l'issu de notre résultats, l'accumulation de zT et de GA4, la réduction de l'AS, l'inhibition de la synthèse de l'AJ, l'induction des gènes, l'accumulation des protéines et des métabolites secondaires dépendantes de la défense des plantes, nous pousse a constaté que l'effet antagoniste et l'interaction entres les phytohormones, reste une piste à entamée pour comprendre le mécanisme d'action de ces nouveaux biostimulants dans les voies de la défense des plantes.

1. Conclusion

La relation directe entre la structure moléculaire des PSs de microalgues et leur activité biostimulante n'est pas encore décrite, mais une meilleure connaissance de l'effet des polysaccharides d'algues pourrait probablement contribuer à l'élucidation des mécanismes généraux. Tout au long de leur cycle de vie, les plantes sont exposées à plusieurs stress environnementaux, qui affectent négativement leur productivité et leur survie.

Les microalgues sont des micro-organismes photosynthétiques qui produisent plusieurs molécules bioactives qui ont fait l'objet d'une attention considérable dans les communautés scientifiques et industrielles. Aujourd'hui, de nombreux biostimulants/bioéliciteurs végétaux, dont des extraits d'algues et des polysaccharides, sont utilisés en agriculture. Cependant, les microalgues n'ont pas été largement exploitées dans ce domaine comme source potentielle de biostimulants/Bioéliciteurs végétaux.

Après l'évaluation de l'effet biostimulant et bioéliciteur des PSs microalgaux sur les plantes de tomate « *S. lycopersicum*. L », on peut constater les conclusions suivantes ;

D'une part les PSs microalgaux ont le potentiel de biostimuler les mécanismes de croissance des plante via (Figure 26) :

- L'amélioration de la croissance des plantes (les PSs d' *A. platensis*, *D. salina* et *Porphyridium sp*, a amélioré le nombre de nœuds (NN), le poids sec des pousses (SDW) et la longueur des pousses (SS) de 75 %, 46,6 %, 25,26 % respectivement.),
- L'induction de l'activité photosynthétique (Chlorophylles a et b et les caroténoïdes),
- L'activation des voies d'assimilation de l'azote ((NR), NAD-GDH et les protéines).
- Le changement du profil de lipides, des stérols et des alcanes. Certains précurseurs des stérols ont augmenté, comme le cholesta-6,22,24-triène, ce qui peut indiquer une augmentation de la biosynthèse des stérols et/ou des glycoalcaloïdes stéroïdiens dans les plantes.

D'autre part ces PSs microalgaux ont le pouvoir d'induire les marqueurs biochimiques, métabolomiques, transcriptomiques, les voies de biosynthèses des métabolites et les phytohormones, dépendant des voies d'élicitation de la défense des plantes (Figure 26) ;

■ CONCLUSION & PERSPECTIVES

- Les marqueurs biochimiques : Les activités de la phénylalanine ammoniac lyase (PAL), de la chitinase, de la 1,3-bêta-glucanase et de la peroxydase (POX) ont été améliorées dans les feuilles de plants de tomate traitées par des polysaccharides extraits de *P. triocnutum* (238,26%) ; *Desmodesmus* sp. (19,95%) ; *P. triocnutum* (137,50%) et *Porphyridium* sp. (47,28%) respectivement. Pour les protéines, les polyphénols et H₂O₂, l'effet maximal a été induit par *D. salina* 067 (55,01%), *Porphyridium* sp. (3,97%) et *A. platensis* (35,08%) représenté par les protéines, les activités enzymatiques de la phénylalanine ammoniac lyase (PAL), de la chitinase, de la 1,3-bêta-glucanase et de la peroxydase (POX), protéines, les polyphénols et H₂O₂, ont été induits par les PSs.
- Les marqueurs métabolomiques. L'analyse métabolomique par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (GC-MS) a montré que les PS induisent la modification du profil des métabolites impliqués dans la construction de la cire des feuilles de tomate, tels que les acides gras, les alcanes, les alcènes et le phytostérol. Les traitements aux PS ont amélioré l'accumulation des acides gras C16:3, C18:2 et C18:3 libérés par les lipides membranaires comme précurseurs de la biosynthèse des oxylipines qui sont des molécules de signalisation de la défense des plantes. De plus, le traitement PS a induit l'accumulation de C18:0 et d'acide azélaïque qui est un régulateur de la résistance systémique acquise dépendante de l'acide salicylique
- Les marqueurs transcriptomiques. L'analyse transcriptomique par Rt-PCR des feuilles de tomates traitées avec des PSs de microalgues a montré une régulation positive des gènes MAPK1 et MAPK2. MAPK4 a subi une surexpression très importante par les PSs de *Porphorydium* sp et *P.tricornutum*. On constate également qu'il existe une spécificité entre le traitement et le gène induit ; MAPK3 MAPK5, MAPK6 sont induits par *D. salina* et MAPK7 est spécifiquement induit par *P.tricornutum*. Chez les plantes, les cascades MAPK ont été identifiées dans la transduction des signaux, notamment la division cellulaire, les réponses hormonales, le développement et la résistance aux maladies.
- PR1 et les formes acides de la Glucanase et de la Chitinase sont régulées à la hausse par *Porphorydium* sp. D'autre part, *D. salina* et *P. tricornutum* induisent très significativement la surexpression des formes basiques de la Glucanase et de la Chitinase. Les plantes traitées par les PSs de *D. salina* et *P. tricornutum* ont été observées comme ayant une régulation positive du gène PI1.

■ CONCLUSION & PERSPECTIVES

- Les voies de biosynthèses de métabolites. L'analyse des voies lipidomiques avec MetaboAnalyst-5. 0 a révélé que le traitement par *Porphorydium sp* induit significativement toutes les voies : métabolisme de l'acide linoléique (LAM), biosynthèse des acides gras insaturés (BUFA), biosynthèse des acides gras (FAB), biosynthèse de la cutine, de la subérine et de la cire (CSWB), biosynthèse des brassinostéroïdes (BrB), élongation des acides gras (FAE), dégradation des acides gras et métabolisme de l'acide alpha-linolénique (aLAM), à l'exception de la voie du métabolisme de l'acide alpha-linolénique. *D. salina* a induit de manière significative les voies LAM, BUFA, FB et CSWB. Enfin *P. tricornutum* a induit LAM, BrB, FB et BUFA.
- La biosynthèse et l'interaction des phytohormones : l'UHPLC-MS a montré que le traitement par les PSs a induit une accumulation très significative des phytohormones tZ et GA4. Toutefois, il a induit une réduction hautement significative de la synthèse de l'IAA et DHZ, en même temps qu'une réduction modérément significative pour GA1 et SA. Le traitement n'a pas d'effet significatif sur la synthèse de JA, ABA et iP.

En accord avec les travaux précédents utilisant les microalgues, grâce à leur composition et leurs effets sur la croissance des plantes, le rendement et la stimulation du métabolisme avec des améliorations biochimiques et l'induction des voies de la défense des plantes, les PSs microalgues peuvent être considérés comme un biostimulant naturel et une nouvelle alternative biotechnologique pour l'agriculture durable.

La combinaison de nos résultats issues de trois études réalisées dans cette thèse, nous a permis de créer un schéma récapitulatif, qui représente un modèle de mode d'action des PSs microalgues (forment des Biostimulants de la nouvelle génération.), comme un biostimulant de croissance, l'assimilation de l'azote et la bioélicitation des mécanismes de défense des plantes.

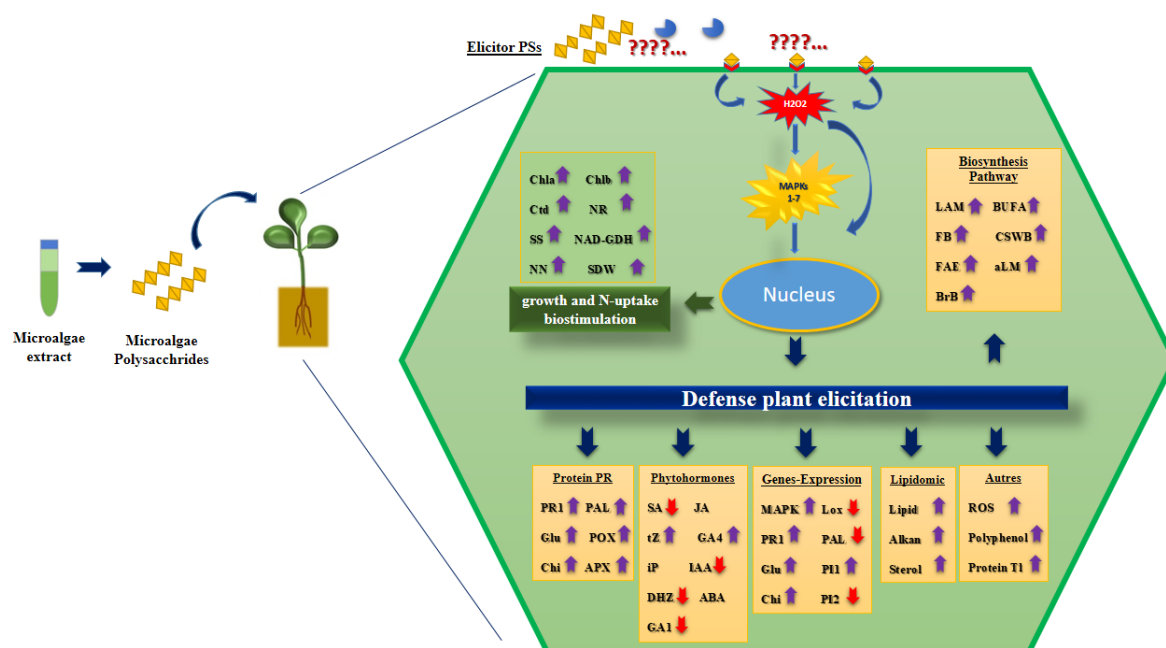


Figure 26 : Schéma récapitulatif de mod d'action des polysaccharides microalgaux sur la biostimulation de la croissance et la bioelicitation de la défense des plantes.

Adopté de résultats de cette article et ceux de, (Farid et al. 2019; Rachidi et al. 2020; 2021).

2. Perspectives

Ces résultats ouvrent la voie à, des études moléculaires et métaboliques afin de déterminer plus précisément le mode d'action des polysaccharides de microalgues comme biostimulants/éliciteurs de la défense des plantes. La relation directe entre la structure moléculaire des EPS de microalgues et leur activité biostimulante est une piste de recherche très importante pour comprendre le mécanisme d'action de ces macromolécules.

Des travaux ultérieurs devraient être réalisés afin d'approfondir l'étude par des analyses moléculaire, génomique fonctionnelle et la simulation avec les éliciteurs classiques afin de comprendre les mécanismes d'action de PSs.

Des recherches devraient également être conduites pour élargir le spectre d'analyse pour comprendre les mécanismes de l'effet de ces polysaccharides sur des phytohormones dans les plantes en relation avec la croissance et les voies de défense.

- Abouraïcha, E, Z El Alaoui-Talibi, R El Boutachfai, E Petit, B Courtois, J Courtois, and C El Modafar. 2015. "Induction of Natural Defense and Protection against *Penicillium Expansum* and *Botrytis Cinerea* in Apple Fruit in Response to Bioelicitors Isolated from Green Algae." *Scientia Horticulturae* 181: 121–28.
- Adie, Bruce, José Manuel Chico, Ignacio Rubio-Somoza, and Roberto Solano. 2007. "Modulation of Plant Defenses by Ethylene." *Journal of Plant Growth Regulation* 26 (2): 160–77.
- Ahanger, Mohammad Abass, Muhammad Ashraf, Andrzej Bajguz, and Parvaiz Ahmad. 2018. "Brassinosteroids Regulate Growth in Plants under Stressful Environments and Crosstalk with Other Potential Phytohormones." *Journal of Plant Growth Regulation* 37 (4): 1007–24.
- Aitouguinane, Meriem, Soukaina Bouissil, Anouar Mouhoub, Halima Rchid, Imen Fendri, Slim Abdelkafi, Mohamed Didi Ould El-Hadj, Zakaria Boual, Pascal Dubessay, and Christine Gardarin. 2020. "Induction of Natural Defenses in Tomato Seedlings by Using Alginate and Oligoalginates Derivatives Extracted from Moroccan Brown Algae." *Marine Drugs* 18 (10): 521.
- Alexandratos, Nikos, and Jelle Bruinsma. 2012. "World Agriculture towards 2030/2050: The 2012 Revision."
- Andargie, Mebeaselassie, and Jianxiong Li. 2016. "Arabidopsis Thaliana: A Model Host Plant to Study Plant–Pathogen Interaction Using Rice False Smut Isolates of *Ustilaginoidea Virens*." *Frontiers in Plant Science* 7: 192.
- Andersen, R A. 1996. "Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry." *Algae*, 29–64.
- Anwar, Ali, Yumei Liu, Rongrong Dong, Longqiang Bai, Xianchang Yu, and Yansu Li. 2018. "The Physiological and Molecular Mechanism of Brassinosteroid in Response to Stress: A Review." *Biological Research* 51.
- Arad, Shoshana Malis, and Oshrat Levy-Ontman. 2013. "Sulfated Polysaccharides in the Cell Wall of Red Microalgae." In *Handbook of Biopolymer-Based Materials: From Blends and Composites to Gels and Complex Networks*, 351–70. Wiley-VCH.
- Argueso, Cristiana T, Fernando J Ferreira, Petra Epple, Jennifer P C To, Claire E Hutchison, G Eric Schaller, Jeffery L Dangl, and Joseph J Kieber. 2012. "Two-Component Elements Mediate Interactions between Cytokinin and Salicylic Acid in Plant Immunity." *PLoS Genetics* 8 (1): e1002448.
- Arroussi, Hicham EL, R Benhima, Adil El Baouchi, Badreddine Sijilmassi, N Mernissi, A Aafsar, Issam Meftah Kadmiri, Najib Bendaou, and Smouni Abdelaziz. 2018. "Dunaliella Salina Exopolysaccharides: A Promising Biostimulant for Salt Stress Tolerance in Tomato (*Solanum Lycopersicum*)." *Journal of Applied Phycology* 30. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1382-1>.
- Asai, Tsuneaki, Guillaume Tena, Joulia Plotnikova, Matthew R Willmann, Wan-Ling Chiu, Lourdes Gomez-Gomez, Thomas Boller, Frederick M Ausubel, and Jen Sheen. 2002. "MAP Kinase Signalling Cascade in Arabidopsis Innate Immunity." *Nature* 415 (6875): 977–83.
- Aubel, Géraldine van, Sophie Serderidis, J Ivens, A Clinckemaillie, Anne Legrève, Bettina

- Hause, and Pierre Van Cutsem. 2018. "Oligosaccharides Successfully Thwart Hijacking of the Salicylic Acid Pathway by Phytophthora Infestans in Potato Leaves." *Plant Pathology* 67 (9): 1901–11.
- Backer, Robert, Sanushka Naidoo, and NoeLani Van den Berg. 2019. "The NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1) and Related Family: Mechanistic Insights in Plant Disease Resistance." *Frontiers in Plant Science* 10: 102.
- Bajguz, Andrzej, and Shamsul Hayat. 2009. "Effects of Brassinosteroids on the Plant Responses to Environmental Stresses." *Plant Physiology and Biochemistry* 47 (1): 1–8.
- Bari, Rajendra, and Jonathan D G Jones. 2009. "Role of Plant Hormones in Plant Defence Responses." *Plant Molecular Biology* 69 (4): 473–88.
- Barsanti, Laura, and Paolo Gualtieri. 2005. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC press.
- Basak, Alina. 2008. "Effect of Preharvest Treatment with Seaweed Products, Kelpak® and Goëmar BM 86®, on Fruit Quality in Apple." *International Journal of Fruit Science* 8 (1–2): 1–14.
- Basu, Samarпита, Abhijit Sarma Roy, Kaustubha Mohanty, and Alope K Ghoshal. 2013. "Enhanced CO₂ Sequestration by a Novel Microalga: Scenedesmus Obliquus SA1 Isolated from Bio-Diversity Hotspot Region of Assam, India." *Bioresource Technology* 143: 369–77. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.010>.
- Baweja, Pooja, Savindra Kumar, and Gaurav Kumar. 2019. "Organic Fertilizer from Algae: A Novel Approach Towards Sustainable Agriculture." In *Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment*, edited by Bhoopander Giri, Ram Prasad, Qiang-Sheng Wu, and Ajit Varma, 353–70. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18933-4_16.
- Beets, Caryn Ann, Ju-Chi Huang, Ntakadzeni Edwin Madala, and Ian Dubery. 2012. "Activation of Camalexin Biosynthesis in Arabidopsis Thaliana in Response to Perception of Bacterial Lipopolysaccharides: A Gene-to-Metabolite Study." *Planta* 236 (1): 261–72.
- Beetul, Keshini, Arvind Gopeechund, Deepeeka Kaullysing, Sushma Mattan-Moorgawa, Daneshwar Puchooa, and Ranjeet Bhagooli. 2016. "Challenges and Opportunities in the Present Era of Marine Algal Applications." *Algae-Organisms for Imminent Biotechnology*; Thajuddin, N., Dhanasekaran, D., Eds, 237–76.
- Benedetti, Manuel, Daniela Pontiggia, Sara Raggi, Zhenyu Cheng, Flavio Scaloni, Simone Ferrari, Frederick M Ausubel, Felice Cervone, and Giulia De Lorenzo. 2015. "Plant Immunity Triggered by Engineered in Vivo Release of Oligogalacturonides, Damage-Associated Molecular Patterns." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (17): 5533–38.
- Berberoglu, Halil, Laurent Pilon, and Anastasios Melis. 2008. "Radiation Characteristics of Chlamydomonas Reinhardtii CC125 and Its Truncated Chlorophyll Antenna Transformants Tla1, TlaX and Tla1-CW+." *International Journal of Hydrogen Energy* 33 (22): 6467–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.071>.
- Berens, Matthias L, Hannah M Berry, Akira Mine, Cristiana T Argueso, and Kenichi Tsuda. 2017. "Evolution of Hormone Signaling Networks in Plant Defense." *Annual Review of*

- Phytopathology* 55: 401–25.
- Bhattacharya, M, and S Goswami. 2020. “Microalgae—A Green Multi-Product Biorefinery for Future Industrial Prospects. *Biocatal Agric Biotechnol* 25: 101580.”
- Bitog, J P, I.-B. Lee, C.-G. Lee, K.-S. Kim, H.-S. Hwang, S.-W. Hong, I.-H. Seo, K.-S. Kwon, and E Mostafa. 2011. “Application of Computational Fluid Dynamics for Modeling and Designing Photobioreactors for Microalgae Production: A Review.” *Computers and Electronics in Agriculture* 76 (2): 131–47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compag.2011.01.015>.
- Bittel, Pascal, and Silke Robatzek. 2007. “Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs) Probe Plant Immunity.” *Current Opinion in Plant Biology* 10 (4): 335–41.
- Bitterlich, Michael, Youssef Rouphael, Jan Graefe, and Philipp Franken. 2018. “Arbuscular Mycorrhizas: A Promising Component of Plant Production Systems Provided Favorable Conditions for Their Growth.” *Frontiers in Plant Science* 9: 1329.
- Blagoveshchensky, A V. 1956. “Biogenic Stimulants and Biochemical Nature of Their Action.” *Bull. Main Bot. Garden* 25: 79–86.
- Blumwald, Eduardo, Gilad S Aharon, and Bernard C H Lam. 1998. “Early Signal Transduction Pathways in Plant–Pathogen Interactions.” *Trends in Plant Science* 3 (9): 342–46.
- Boller, Thomas, and Georg Felix. 2009. “A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors.” *Annual Review of Plant Biology* 60: 379–406.
- Bouissil, Soukaina, El Alaoui-Talibi, Guillaume Pierre, Philippe Michaud, Cherkaoui El Modafar, and Cedric Delattre. 2020. “Use of Alginate Extracted from Moroccan Brown Algae to Stimulate Natural Defense in Date Palm Roots.” *Molecules* 25 (3): 720.
- Broekaert, Willem F, Stijn L Delauré, Miguel F C De Bolle, and Bruno P A Cammue. 2006. “The Role of Ethylene in Host-Pathogen Interactions.” *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 393–416.
- Brown, Neil Andrew, and Kim E Hammond-Kosack. 2015. *Secreted Biomolecules in Fungal Plant Pathogenesis*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Calvo, Pamela, Louise Nelson, and Joseph W Kloepper. 2014. “Agricultural Uses of Plant Biostimulants.” *Plant and Soil* 383 (1): 3–41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>.
- Camejo, Daymi, Ángel Guzmán-Cedeño, and Alexander Moreno. 2016. “Reactive Oxygen Species, Essential Molecules, during Plant–Pathogen Interactions.” *Plant Physiology and Biochemistry* 103: 10–23.
- Cargnello, Marie, and Philippe P Roux. 2011. “Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75 (1): 50–83.
- Castilleux, Romain, Barbara Plancot, Marc Ropitiaux, Alexis Carreras, Jérôme Leprince, Isabelle Boulogne, Marie-Laure Follet-Gueye, Zoë A Popper, Azeddine Driouich, and Maïté Vicré. 2018. “Cell Wall Extensins in Root–Microbe Interactions and Root Secretions.” *Journal of Experimental Botany* 69 (18): 4235–47.
- Castro, Jorge, Jeannette Vera, Alberto González, and Alejandra Moenne. 2012. “Oligo-Carrageenans Stimulate Growth by Enhancing Photosynthesis, Basal Metabolism, and

- Cell Cycle in Tobacco Plants (Var. Burley).” *Journal of Plant Growth Regulation* 31 (2): 173–85.
- Cencic, Avrelja, and Walter Chingwaru. 2010. “The Role of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements in Intestinal Health.” *Nutrients* 2 (6): 611–25.
- Chen, Chun-Yen, Pei-Chun Kao, Chia-Jung Tsai, Duu-Jong Lee, and Jo-Shu Chang. 2013. “Engineering Strategies for Simultaneous Enhancement of C-Phycocyanin Production and CO₂ Fixation with *Spirulina Platensis*.” *Bioresource Technology* 145: 307–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.054>.
- Chen, Yong-Yi, Yu-Mei Lin, To-Chun Chao, Jaw-Fen Wang, An-Chi Liu, Fang-I Ho, and Chiu-Ping Cheng. 2009. “Virus-induced Gene Silencing Reveals the Involvement of Ethylene-, Salicylic Acid-and Mitogen-activated Protein Kinase-related Defense Pathways in the Resistance of Tomato to Bacterial Wilt.” *Physiologia Plantarum* 136 (3): 324–35.
- Cheng, Jun, Ke Li, Zongbo Yang, Junhu Zhou, and Kefa Cen. 2016. “Enhancing the Growth Rate and Astaxanthin Yield of *Haematococcus Pluvialis* by Nuclear Irradiation and High Concentration of Carbon Dioxide Stress.” *Bioresource Technology* 204: 49–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.076>.
- Chiaiese, Pasquale, Giandomenico Corrado, Giuseppe Colla, Marios C Kyriacou, and Youssef Rouphael. 2018. “Renewable Sources of Plant Biostimulation: Microalgae as a Sustainable Means to Improve Crop Performance.” *Frontiers in Plant Science* 9: 1782. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01782>.
- Chinchilla, Delphine, Zsuzsa Bauer, Martin Regenass, Thomas Boller, and Georg Felix. 2006. “The Arabidopsis Receptor Kinase FLS2 Binds Flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception.” *The Plant Cell* 18 (2): 465–76.
- Chisti, Yusuf. 2007. “Biodiesel from Microalgae.” *Biotechnology Advances* 25 (3): 294–306. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>.
- . 2008. “Biodiesel from Microalgae Beats Bioethanol.” *Trends in Biotechnology* 26 (3): 126–31. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.12.002>.
- Choi, Hyong Woo, and Daniel F Klessig. 2016. “DAMPs, MAMPs, and NAMPs in Plant Innate Immunity.” *BMC Plant Biology* 16 (1): 1–10.
- Choi, Jaemyung, Sung Un Huh, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara, Kyung-Hee Paek, and Ildoo Hwang. 2010. “The Cytokinin-Activated Transcription Factor ARR2 Promotes Plant Immunity via TGA3/NPR1-Dependent Salicylic Acid Signaling in Arabidopsis.” *Developmental Cell* 19 (2): 284–95.
- Choi, Yoon Young, Anil Kumar Patel, Min Eui Hong, Won Seok Chang, and Sang Jun Sim. 2019. “Microalgae Bioenergy with Carbon Capture and Storage (BECCS): An Emerging Sustainable Bioprocess for Reduced CO₂ Emission and Biofuel Production.” *Bioresource Technology Reports* 7: 100270. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100270>.
- Choudhary, Devendra K, Anil Prakash, and B N Johri. 2007. “Induced Systemic Resistance (ISR) in Plants: Mechanism of Action.” *Indian Journal of Microbiology* 47 (4): 289–97.
- Christenson, Logan, and Ronald Sims. 2011. “Production and Harvesting of Microalgae for

- Wastewater Treatment, Biofuels, and Bioproducts.” *Biotechnology Advances* 29 (6): 686–702. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.015>.
- Clouse, Steven D, and Jenneth M Sasse. 1998. “Brassinosteroids: Essential Regulators of Plant Growth and Development.” *Annual Review of Plant Biology* 49 (1): 427–51.
- Colla, Giuseppe, Mariateresa Cardarelli, Paolo Bonini, and Youssef Roupael. 2017. “Foliar Applications of Protein Hydrolysate, Plant and Seaweed Extracts Increase Yield but Differentially Modulate Fruit Quality of Greenhouse Tomato.” *HortScience* 52 (9): 1214–20.
- Colla, Giuseppe, and Youssef Roupael. 2020. “Microalgae: New Source of Plant Biostimulants.” *Agronomy*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Costa, Jorge Alberto Vieira, Bárbara Franco Lucas, Ana Gabrielle Pires Alvarenga, Juliana Botelho Moreira, and Michele Greque de Moraes. 2021. “Microalgae Polysaccharides: An Overview of Production, Characterization, and Potential Applications.” *Polysaccharides* 2 (4): 759–72.
- Couto, Daniel, and Cyril Zipfel. 2016. “Regulation of Pattern Recognition Receptor Signalling in Plants.” *Nature Reviews Immunology* 16 (9): 537–52.
- Dangl, Jeffery L, Diana M Horvath, and Brian J Staskawicz. 2013. “Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment.” *Science* 341 (6147): 746–51.
- Datta, Asis, Ayushi Kamthan, Mohan Kamthan, Niranjana Chakraborty, and Subhra Chakraborty. 2012. “A Simple Protocol for Extraction, Derivatization, and Analysis of Tomato Leaf and Fruit Lipophilic Metabolites Using GC-MS.” *Protocol Exchange*. <https://doi.org/10.1038/protex.2012.061>.
- Denby, Katherine J, Pavan Kumar, and Daniel J Kliebenstein. 2004. “Identification of Botrytis Cinerea Susceptibility Loci in Arabidopsis Thaliana.” *The Plant Journal* 38 (3): 473–86.
- Desender, Sabine, Didier Andrivon, and Florence Val. 2007. “Activation of Defence Reactions in Solanaceae: Where Is the Specificity?” *Cellular Microbiology* 9 (1): 21–30.
- Dey, Priya, Ramani Ramanujam, Ganesan Venkatesan, and Radhakrishnan Nagarathnam. 2019. “Sodium Alginate Potentiates Antioxidant Defense and PR Proteins against Early Blight Disease Caused by Alternaria Solani in Solanum Lycopersicum Linn.” *PloS One* 14 (9): e0223216.
- Dixon, Richard A, Lahoucine Achnine, Parvathi Kota, Chang-Jun Liu, M S Srinivasa Reddy, and Liangjiang Wang. 2002. “The Phenylpropanoid Pathway and Plant Defence—a Genomics Perspective.” *Molecular Plant Pathology* 3 (5): 371–90. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00131.x>.
- Dmytryk, Agnieszka, and Katarzyna Chojnacka. 2018. “Algae As Fertilizers, Biostimulants, and Regulators of Plant Growth.” In *Algae Biomass: Characteristics and Applications: Towards Algae-Based Products*, edited by Katarzyna Chojnacka, Piotr Pawel Wiecek, Grzegorz Schroeder, and Izabela Michalak, 115–22. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74703-3_10.
- Doughari, J. 2015. “An Overview of Plant Immunity.” *J. Plant Pathol. Microbiol* 6 (11): 10–4172.
- Drira, Maroua, Faiez Hentati, Olga Babich, Stanislas Sukhikh, Viktoria Larina, Sana Sharifian,

- Ahmad Homai, Imen Fendri, Marco F L Lemos, and Carina Félix. 2021. “Bioactive Carbohydrate Polymers—Between Myth and Reality.” *Molecules* 26 (23): 7068.
- Drira, Marwa, Jihen Elleuch, Farah Hadjkacem, Faiez Hentati, Riadh Drira, Guillaume Pierre, Christine Gardarin, et al. 2022. “Influence of the Sulfate Content of the Exopolysaccharides from *Porphyridium Sordidum* on Their Elicitor Activities on Date Palm Vitroplants.” *Plant Physiology and Biochemistry* 186: 99–106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.06.012>.
- Drira, Marwa, Jihen Elleuch, Hajer Ben Hlima, Faiez Hentati, Christine Gardarin, Christophe Rihouey, Didier Le Cerf, Philippe Michaud, Slim Abdelkafi, and Imen Fendri. 2021. “Optimization of Exopolysaccharides Production by *Porphyridium Sordidum* and Their Potential to Induce Defense Responses in *Arabidopsis Thaliana* against *Fusarium Oxysporum*.” *Biomolecules* 11 (2): 282.
- Drira, Marwa, Jamila Ben Mohamed, Hajer Ben Hlima, Faiez Hentati, Philippe Michaud, Slim Abdelkafi, and Imen Fendri. 2021. “Improvement of *Arabidopsis Thaliana* Salt Tolerance Using a Polysaccharidic Extract from the Brown Algae *Padina Pavonica*.” *Algal Research* 56: 102324.
- Ekengren, Sophia K, Yule Liu, Michael Schiff, S P Dinesh-Kumar, and Gregory B Martin. 2003. “Two MAPK Cascades, NPR1, and TGA Transcription Factors Play a Role in Pto-mediated Disease Resistance in Tomato.” *The Plant Journal* 36 (6): 905–17.
- El-Naggar, Noura El-Ahmady, Mervat H Hussein, Sami A Shaaban-Dessuuki, and Shimaa R Dalal. 2020. “Production, Extraction and Characterization of *Chlorella Vulgaris* Soluble Polysaccharides and Their Applications in AgNPs Biosynthesis and Biostimulation of Plant Growth.” *Scientific Reports* 10 (1): 1–19.
- Elarroussia, Hicham, Najib Elmernissia, Redouane Benhimaa, Isam Meftah El Kadmiria, Najib Bendaou, Abedelaziz Smouni, and I Wahbya. 2016. “Microalgae Polysaccharides a Promising Plant Growth Biostimulant.” *J. Algal Biomass Utln* 7 (4): 55–63.
- Ellinger, Dorothea, and Christian A Voigt. 2014. “Callose Biosynthesis in *Arabidopsis* with a Focus on Pathogen Response: What We Have Learned within the Last Decade.” *Annals of Botany* 114 (6): 1349–58.
- Esquerré-Tugayé, Marie-Thérèse, Georges Boudart, and Bernard Dumas. 2000. “Cell Wall Degrading Enzymes, Inhibitory Proteins, and Oligosaccharides Participate in the Molecular Dialogue between Plants and Pathogens.” *Plant Physiology and Biochemistry* 38 (1–2): 157–63.
- Faheed, Fayza, and Z Fattah. 2008. “Effect of *Chlorella Vulgaris* as Bio-Fertilizer on Growth Parameters and Metabolic Aspects of Lettuce Plant.” *J Agric Soc Sci* 4: 165–69.
- Farid, Rachidi, Chanda Mutale-Joan, Benhima Redouane, E L Mernissi Najib, Aasfar Abderahime, Sbabou Laila, and E L Arroussi Hicham. 2019. “Effect of Microalgae Polysaccharides on Biochemical and Metabolomics Pathways Related to Plant Defense in *Solanum Lycopersicum*.” *Applied Biochemistry and Biotechnology* 188 (1): 225–40. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2916-y>.
- Felix, Georg, and Thomas Boller. 2003. “Molecular Sensing of Bacteria in Plants: The Highly Conserved RNA-Binding Motif RNP-1 of Bacterial Cold Shock Proteins Is Recognized

- as an Elicitor Signal in Tobacco.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (8): 6201–8.
- Felix, Georg, Juliana D Duran, Sigrid Volko, and Thomas Boller. 1999. “Plants Have a Sensitive Perception System for the Most Conserved Domain of Bacterial Flagellin.” *The Plant Journal* 18 (3): 265–76.
- Feng, Jun, Min Zhang, Kang-Ning Yang, and Cai-Xia Zheng. 2020. “Salicylic Acid-Primed Defence Response in Octoploid Strawberry ‘Benihoppe’ Leaves Induces Resistance against *Podosphaera Aphanis* through Enhanced Accumulation of Proanthocyanidins and Upregulation of Pathogenesis-Related Genes.” *BMC Plant Biology* 20 (1): 1–18.
- Ferrari, Simone, Daniel V Savatin, Francesca Sicilia, Giovanna Gramegna, Felice Cervone, and Giulia De Lorenzo. 2013. “Oligogalacturonides: Plant Damage-Associated Molecular Patterns and Regulators of Growth and Development.” *Frontiers in Plant Science* 4: 49.
- Filatov, V P. 1951a. “Tissue Treatment.(Doctrine on Biogenic Stimulators). I. Background, Methods and the Clinical Tissue Treatment.” *Priroda* 11: 39–46.
- . 1951b. “Tissue Treatment.(Doctrine on Biogenic Stimulators). II. Hypothesis of Tissue Therapy, or the Doctrine on Biogenic Stimulators.” *Priroda* 12: 20–28.
- Filatov, VLADIMIR P. 1944. “Tissue Therapy in Ophthalmology.” *American Review of Soviet Medicine* 2 (1): 53–66.
- Fogg, G E. 2001. “Algal Adaptation to Stress—Some General Remarks.” In *Algal Adaptation to Environmental Stresses*, 1–19. Springer.
- Garcia-Brugger, Angela, Olivier Lamotte, Elodie Vandelle, Stéphane Bourque, David Lecourieux, Benoit Poinssot, David Wendehenne, and Alain Pugin. 2006. “Early Signaling Events Induced by Elicitors of Plant Defenses.” *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19 (7): 711–24.
- Garcia-Gonzalez, Jesus, and Milton Sommerfeld. 2016. “Biofertilizer and Biostimulant Properties of the Microalga *Acutodesmus Dimorphus*.” *Journal of Applied Phycology* 28: 1051–61. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0625-2>.
- García-Mier, Lina, Ramón G Guevara-González, Víctor M Mondragón-Olguín, Beatriz del Rocío Verduzco-Cuellar, and Irineo Torres-Pacheco. 2013. “Agriculture and Bioactives: Achieving Both Crop Yield and Phytochemicals.” *International Journal of Molecular Sciences* 14 (2): 4203–22.
- Gardner-Dale, D A, I M Bradley, and J S Guest. 2017. “Influence of Solids Residence Time and Carbon Storage on Nitrogen and Phosphorus Recovery by Microalgae across Diel Cycles.” *Water Research* 121: 231–39. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.033>.
- Gaupels, Frank, Alexandra C U Furch, Torsten Will, Luis A J Mur, Karl-Heinz Kogel, and Aart J E Van Bel. 2008. “Nitric Oxide Generation in *Vicia Faba* Phloem Cells Reveals Them to Be Sensitive Detectors as Well as Possible Systemic Transducers of Stress Signals.” *New Phytologist* 178 (3): 634–46.
- Ghannam, Ahmed, Assef Abbas, Houda Alek, Zozafin Al-Waari, and Mahmoud Al-Ktaifani. 2013. “Enhancement of Local Plant Immunity against Tobacco Mosaic Virus Infection after Treatment with Sulphated-Carrageenan from Red Alga (*Hypnea Musciformis*).” *Physiological and Molecular Plant Pathology* 84: 19–27.

- Glawischnig, Erich. 2007. "Camalexin." *Phytochemistry* 68 (4): 401–6.
- Godlewska, Katarzyna, Paweł Pacyga, Izabela Michalak, Anita Biesiada, Antoni Szumny, Natalia Pachura, and Urszula Piszcz. 2021. "Effect of Botanical Extracts on the Growth and Nutritional Quality of Field-Grown White Head Cabbage (*Brassica Oleracea* Var. *Capitata*).” *Molecules* 26 (7): 1992.
- Gómez-Gómez, Lourdes. 2004. "Plant Perception Systems for Pathogen Recognition and Defence.” *Molecular Immunology* 41 (11): 1055–62.
- Górka, Bogusława, Karolina Korzeniowska, Jacek Lipok, and Piotr P Wieczorek. 2018. "The Biomass of Algae and Algal Extracts in Agricultural Production.” In *Algae Biomass: Characteristics and Applications: Towards Algae-Based Products*, edited by Katarzyna Chojnacka, Piotr Pawel Wieczorek, Grzegorz Schroeder, and Izabela Michalak, 103–14. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74703-3_9.
- Großkinsky, Dominik, Kerstin Edelsbrunner, Hartwig Pfeifhofer, Eric Van der Graaff, and Thomas Roitsch. 2013. "Cis-and Trans-Zeatin Differentially Modulate Plant Immunity.” *Plant Signaling & Behavior* 8 (7): e24798.
- Großkinsky, Dominik K, Eric van der Graaff, and Thomas Roitsch. 2014. "Absciscic Acid–Cytokinin Antagonism Modulates Resistance against *Pseudomonas Syringae* in Tobacco.” *Phytopathology* 104 (12): 1283–88.
- Großkinsky, Dominik K, Muhammad Naseem, Usama Ramadan Abdelmohsen, Nicole Plickert, Thomas Engelke, Thomas Griebel, Jürgen Zeier, Ondřej Novák, Miroslav Strnad, and Hartwig Pfeifhofer. 2011. "Cytokinins Mediate Resistance against *Pseudomonas Syringae* in Tobacco through Increased Antimicrobial Phytoalexin Synthesis Independent of Salicylic Acid Signaling.” *Plant Physiology* 157 (2): 815–30.
- Guo, Jun, Keyu Sun, Yujing Zhang, Kongxin Hu, Xin Zhao, Hengchao Liu, Shiyong Wu, Yanwen Hu, Yan Zhang, and Yousheng Wang. 2021. "SIMAPK3, a Key Mitogen-Activated Protein Kinase, Regulates the Resistance of Cherry Tomato Fruit to *Botrytis Cinerea* Induced by Yeast Cell Wall and β -Glucan.” *Postharvest Biology and Technology* 171: 111350.
- Gupta, Nidhi, Atul K Gupta, Vikram S Gaur, and Anil Kumar. 2012. "Relationship of Nitrogen Use Efficiency with the Activities of Enzymes Involved in Nitrogen Uptake and Assimilation of Finger Millet Genotypes Grown under Different Nitrogen Inputs.” *The Scientific World Journal* 2012.
- Gust, Andrea A, Raja Biswas, Heike D Lenz, Thomas Rauhut, Stefanie Ranf, Birgit Kemmerling, Friedrich Götz, Erich Glawischnig, Justin Lee, and Georg Felix. 2007. "Bacteria-Derived Peptidoglycans Constitute Pathogen-Associated Molecular Patterns Triggering Innate Immunity in *Arabidopsis*.” *Journal of Biological Chemistry* 282 (44): 32338–48.
- Gutman, Jenia, Aliza Zarka, and Sammy Boussiba. 2009. "The Host-Range of *Paraphysoderma Sederbakerensis*, a Chytrid That Infects *Haematococcus Pluvialis*.” *European Journal of Phycology* 44 (4): 509–14.
- Hadrami, Abdelbasset El, Lorne R Adam, Ismail El Hadrami, and Fouad Daayf. 2010. "Chitosan in Plant Protection.” *Marine Drugs* 8 (4): 968–87.

- Halder, Mihir, Sayantika Sarkar, and Sumita Jha. 2019. "Elicitation: A Biotechnological Tool for Enhanced Production of Secondary Metabolites in Hairy Root Cultures." *Engineering in Life Sciences* 19 (12): 880–95.
- Hamel, Louis-Philippe, Marie-Claude Nicole, Somrudee Sritubtim, Marie-Josée Morency, Margaret Ellis, Juergen Ehling, Nathalie Beaudoin, Brad Barbazuk, Dan Klessig, and Justin Lee. 2006. "Ancient Signals: Comparative Genomics of Plant MAPK and MAPKK Gene Families." *Trends in Plant Science* 11 (4): 192–98.
- Han, Xingfeng, Huiru Zeng, Pietro Bartocci, Francesco Fantozzi, and Yunjun Yan. 2018. "Phytohormones and Effects on Growth and Metabolites of Microalgae: A Review." *Fermentation* 4 (2). <https://doi.org/10.3390/fermentation4020025>.
- Hase, Ryouetsu, Hiroyoshi Oikawa, Chiyo Sasao, Masahiko Morita, and Yoshitomo Watanabe. 2000. "Photosynthetic Production of Microalgal Biomass in a Raceway System under Greenhouse Conditions in Sendai City." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89 (2): 157–63. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)88730-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)88730-7).
- He, Mei, Chun-Xue Qin, Xu Wang, and Nai-Zheng Ding. 2020. "Plant Unsaturated Fatty Acids: Biosynthesis and Regulation." *Frontiers in Plant Science*, 390.
- He, Ping, Libo Shan, and Jen Sheen. 2007. "Elicitation and Suppression of Microbe-associated Molecular Pattern-triggered Immunity in Plant–Microbe Interactions." *Cellular Microbiology* 9 (6): 1385–96.
- He, Xiaowen, Chuanzeng Wang, Haibo Wang, Linguang Li, and Chen Wang. 2020. "The Function of MAPK Cascades in Response to Various Stresses in Horticultural Plants." *Frontiers in Plant Science* 11: 952.
- Herve, J J. 1994. "Biostimulant, a New Concept for the Future and Prospects Offered by Chemical Synthesis and Biotechnologies." *Comptes Rendus de l'Academie d'Agriculture de France (France)*.
- Hildebrandt, Tatjana M, Adriano Nunes Nesi, Wagner L Araújo, and Hans-Peter Braun. 2015. "Amino Acid Catabolism in Plants." *Molecular Plant* 8 (11): 1563–79.
- Hlima, Hajer Ben, Slim Smaoui, Mohamed Barkallah, Khaoula Elhadeif, Latifa Tounsi, Philippe Michaud, Imen Fendri, and Slim Abdelkafi. 2021. "Sulfated Exopolysaccharides from *Porphyridium Cruentum*: A Useful Strategy to Extend the Shelf Life of Minced Beef Meat." *International Journal of Biological Macromolecules* 193: 1215–25.
- Hohmann, Ulrich, Kelvin Lau, and Michael Hothorn. 2017. "The Structural Basis of Ligand Perception and Signal Activation by Receptor Kinases." *Annual Review of Plant Biology* 68: 109–37.
- Hosseini Tafreshi, A, and M Shariati. 2009. "Dunaliella Biotechnology: Methods and Applications." *Journal of Applied Microbiology* 107 (1): 14–35.
- Hu, Q, C Zhang, and M Sommerfeld. 2006. "Biodiesel from Algae: Lessons Learned over the Past 60 Years and Future Perspectives." In *Journal of Phycology*, 42:12. BLACKWELL PUBLISHING 9600 GARSINGTON RD, OXFORD OX4 2DQ, OXON, ENGLAND.
- Hückelhoven, Ralph. 2007. "Cell Wall–Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility." *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 101–27.
- Hulten, Marieke van, Maaike Pelser, L C Van Loon, Corné M J Pieterse, and Jurriaan Ton.

2006. "Costs and Benefits of Priming for Defense in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (14): 5602–7.
- Idrees, Muhammad. 2014. "Making Biofuels from Microalgae-A Review of Technologies." *J. Food Sci. Technol* 1: 7–14.
- Ito, T, M Tanaka, H Shinkawa, T Nakada, Y Ano, and N Kurano. 2013. "Metabolic and Morphological Changes of an Oil Accumulating Trebouxiphycean Alga in Nitrogen-Deficient Conditions. *Metabolomics* 9." *S178–S187*.
- Jacob-Lopes, Eduardo, Carlos Henrique Gimenes Scoparo, Lucy Mara Cacia Ferreira Lacerda, and Telma Teixeira Franco. 2009. "Effect of Light Cycles (Night/Day) on CO2 Fixation and Biomass Production by Microalgae in Photobioreactors." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 48 (1): 306–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cep.2008.04.007>.
- Jäpelt, Rie, and Jette Jakobsen. 2013. "Vitamin D in Plants: A Review of Occurrence, Analysis, and Biosynthesis." *Frontiers in Plant Science* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00136>.
- Jardin, Patrick du. 2015. "Plant Biostimulants: Definition, Concept, Main Categories and Regulation." *Scientia Horticulturae* 196: 3–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>.
- Jones, Jonathan D G, and Jeffery L Dangl. 2006. "The Plant Immune System." *Nature* 444 (7117): 323–29.
- Jongebloed, Udo, Judit Szederkényi, Katja Hartig, Christian Schobert, and Ewald Komor. 2004. "Sequence of Morphological and Physiological Events during Natural Ageing and Senescence of a Castor Bean Leaf: Sieve Tube Occlusion and Carbohydrate Back-up Precede Chlorophyll Degradation." *Physiologia Plantarum* 120 (2): 338–46.
- Juneja, Ankita, Ruben Michael Ceballos, and Ganti S Murthy. 2013. "Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review." *Energies* 6 (9): 4607–38. <https://doi.org/10.3390/en6094607>.
- K.V., Supraja, Bunushree Behera, and Balasubramanian P. 2020. "Efficacy of Microalgal Extracts as Biostimulants through Seed Treatment and Foliar Spray for Tomato Cultivation." *Industrial Crops and Products* 151: 112453. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112453>.
- Kachroo, Aardra, and Pradeep Kachroo. 2009. "Fatty Acid-Derived Signals in Plant Defense." *Annual Review of Phytopathology* 47 (1): 153–76.
- Kadota, Yasuhiro, Ken Shirasu, and Cyril Zipfel. 2015. "Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD during Plant Immunity." *Plant and Cell Physiology* 56 (8): 1472–80.
- Kandoth, Pramod Kaitheri, Stefanie Ranf, Suchita S Pancholi, Sastry Jayanty, Michael D Walla, Wayne Miller, Gregg A Howe, David E Lincoln, and Johannes W Stratmann. 2007. "Tomato MAPKs LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 Function in the Systemin-Mediated Defense Response against Herbivorous Insects." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (29): 12205–10.
- Kang, Yeeun, Minjeong Kim, Changki Shim, Suyea Bae, and Seonghoe Jang. 2021. "Potential of Algae–Bacteria Synergistic Effects on Vegetable Production." *Frontiers in Plant Science* 12: 656662.

- Khan, Muhammad Imran, Jin Hyuk Shin, and Jong Deog Kim. 2018. "The Promising Future of Microalgae: Current Status, Challenges, and Optimization of a Sustainable and Renewable Industry for Biofuels, Feed, and Other Products." *Microbial Cell Factories* 17 (1): 36. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>.
- Khozin-Goldberg, Inna, and Zvi Cohen. 2006. "The Effect of Phosphate Starvation on the Lipid and Fatty Acid Composition of the Fresh Water Eustigmatophyte *Monodus Subterraneus*." *Phytochemistry* 67 (7): 696–701. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.010>.
- Khripach, Vladimir, Vladimir Zhabinskii, and Aede de Groot. 2000. "Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century." *Annals of Botany* 86 (3): 441–47.
- Kim, Min-Jeong, Chang-Ki Shim, Yong-Ki Kim, Byong-Gu Ko, Jong-Ho Park, Soo-Gen Hwang, and Baeg-Ho Kim. 2018. "Effect of Biostimulator *Chlorella Fusca* on Improving Growth and Qualities of Chinese Chives and Spinach in Organic Farm." *The Plant Pathology Journal* 34 (6): 567.
- Kirst, G O. 1990. "Salinity Tolerance of Eukaryotic Marine Algae." *Annual Review of Plant Biology* 41 (1): 21–53.
- Klarzynski, Olivier, Valerie Descamps, Bertrand Plesse, Jean-Claude Yvin, Bernard Kloareg, and Bernard Fritig. 2003. "Sulfated Fucan Oligosaccharides Elicit Defense Responses in Tobacco and Local and Systemic Resistance against Tobacco Mosaic Virus." *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI* 16 (2): 115–22. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.2.115>.
- Kliebenstein, Daniel J, and Heather C Rowe. 2008. "Ecological Costs of Biotrophic versus Necrotrophic Pathogen Resistance, the Hypersensitive Response and Signal Transduction." *Plant Science* 174 (6): 551–56.
- Kocira, Sławomir, Agnieszka Szparaga, Anna Kocira, Ewa Czerwińska, Agnieszka Wójtowicz, Urszula Bronowicka-Mielniczuk, Milan Koszel, and Pavol Findura. 2018. "Modeling Biometric Traits, Yield and Nutritional and Antioxidant Properties of Seeds of Three Soybean Cultivars Through the Application of Biostimulant Containing Seaweed and Amino Acids." *Frontiers in Plant Science* 9: 388. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00388>.
- Koen, Emmanuel, Olivier Lamotte, Angélique Besson-Bard, Stéphane Bourque, Valérie Nicolas-Francès, Sylvain Jeandroz, and David Wendehenne. 2013. "Le Monoxyde d'azote-Un Acteur de l'immunité Chez Les Plantes." *Médecine/Sciences* 29 (3): 309–16.
- Kohli, Sukhmeen Kaur, Shagun Bali, Kanika Khanna, Palak Bakshi, Pooja Sharma, Anket Sharma, Vinod Verma, Puja Ohri, Bilal Ahmad Mir, and Rupinder Kaur. 2019. "A Current Scenario on Role of Brassinosteroids in Plant Defense Triggered in Response to Biotic Challenges." In *Brassinosteroids: Plant Growth and Development*, 367–88. Springer.
- Krzemińska, Izabela, Barbara Pawlik-Skowrońska, Magdalena Trzcińska, and Jerzy Tys. 2014. "Influence of Photoperiods on the Growth Rate and Biomass Productivity of Green Microalgae." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 37 (4): 735–41. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1044-x>.

- Lai, Ying-Jang. 2015. "Omega-3 Fatty Acid Obtained from *Nannochloropsis Oceanica* Cultures Grown under Low Urea Protect against Abeta-Induced Neural Damage." *Journal of Food Science and Technology* 52 (5): 2982–89. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1329-3>.
- Lamotte, Olivier, Kevin Gould, David Lecourieux, Anabelle Sequeira-Legrand, Angela Lebrun-Garcia, Jörg Durner, Alain Pugin, and David Wendehenne. 2004. "Analysis of Nitric Oxide Signaling Functions in Tobacco Cells Challenged by the Elicitor Cryptogein." *Plant Physiology* 135 (1): 516–29.
- Laroche, Céline. 2022. "Exopolysaccharides from Microalgae and Cyanobacteria: Diversity of Strains, Production Strategies, and Applications." *Marine Drugs* 20 (5): 336.
- Lavens, Patrick, and Patrick Sorgeloos. 1996. *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. Food and Agriculture Organization (FAO).
- Lee, Choul-Gyun. 1999. "Calculation of Light Penetration Depth in Photobioreactors." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 4 (1): 78–81. <https://doi.org/10.1007/BF02931920>.
- Li, Beibei, Ruolin Wang, Shiya Wang, Jiang Zhang, and Ling Chang. 2021. "Diversified Regulation of Cytokinin Levels and Signaling during Botrytis Cinerea Infection in Arabidopsis." *Frontiers in Plant Science*, 23.
- Li, Haifeng, Linnan Su, Sheng Chen, Libin Zhao, Hongyu Wang, Fei Ding, Hong Chen, Ruona Shi, Yulan Wang, and Zebo Huang. 2018. "Physicochemical Characterization and Functional Analysis of the Polysaccharide from the Edible Microalga *Nostoc Sphaeroides*." *Molecules* 23 (2): 508.
- Li, Peiqin, Robert J Linhardt, and Zhimin Cao. 2016. "Structural Characterization of Oligochitosan Elicitor from *Fusarium Sambucinum* and Its Elicitation of Defensive Responses in *Zanthoxylum Bungeanum*." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (12): 2076.
- Lim, Gah-Hyun, Richa Singhal, Aardra Kachroo, and Pradeep Kachroo. 2017. "Fatty Acid-and Lipid-Mediated Signaling in Plant Defense." *Annu. Rev. Phytopathol* 55 (1): 505–36.
- Livak, Kenneth J, and Thomas D Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method." *Methods* 25 (4): 402–8.
- Loon, Leendert C van, Martijn Rep, and Corné M J Pieterse. 2006. "Significance of Inducible Defense-Related Proteins in Infected Plants." *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 135–62.
- Lorenzo, Giulia De, Alexandre Brutus, Daniel Valentin Savatin, Francesca Sicilia, and Felice Cervone. 2011. "Engineering Plant Resistance by Constructing Chimeric Receptors That Recognize Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs)." *Febs Letters* 585 (11): 1521–28.
- Lorenzo, Giulia De, Simone Ferrari, Felice Cervone, and Eitan Okun. 2018. "Extracellular DAMPs in Plants and Mammals: Immunity, Tissue Damage and Repair." *Trends in Immunology* 39 (11): 937–50.
- Lu, Yandu, and Jian Xu. 2015. "Phytohormones in Microalgae: A New Opportunity for Microalgal Biotechnology?" *Trends in Plant Science* 20 (5): 273–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.01.006>.

- Macho, Alberto P, and Cyril Zipfel. 2014. "Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling." *Molecular Cell* 54 (2): 263–72.
- Mahboobi, Homa, Meral Yücel, and Hüseyin Avni Öktem. 2002. "Nitrate Reductase and Glutamate Dehydrogenase Activities of Resistant and Sensitive Cultivars of Wheat and Barley under Boron Toxicity." *Journal of Plant Nutrition* 25 (8): 1829–37.
- Mani, Sumithra Devi, Muthukumar Govindan, Mehanathan Muthamilarasan, and Radhakrishnan Nagarathnam. 2021. "A Sulfated Polysaccharide κ -Carrageenan Induced Antioxidant Defense and Proteomic Changes in Chloroplast against Leaf Spot Disease of Tomato." *Journal of Applied Phycology* 33 (4): 2667–81.
- Mata, Teresa M, António A Martins, and Nidia. S Caetano. 2010. "Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (1): 217–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>.
- Mauch-Mani, Brigitte, Ivan Baccelli, Estrella Luna, and Victor Flors. 2017. "Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance." *Annual Review of Plant Biology* 68: 485–512.
- Mayrose, Maya, Arale Bonshtien, and Guido Sessa. 2004. "LeMPK3 Is a Mitogen-Activated Protein Kinase with Dual Specificity Induced during Tomato Defense and Wounding Responses." *Journal of Biological Chemistry* 279 (15): 14819–27.
- Melech-Bonfil, Shiri, and Guido Sessa. 2011. "The SIMKK2 and SIMPK2 Genes Play a Role in Tomato Disease Resistance to *Xanthomonas Campestris* Pv. *Vesicatoria*." *Plant Signaling & Behavior* 6 (1): 154–56.
- Meng, Xiangzong, and Shuqun Zhang. 2013. "MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling." *Annual Review of Phytopathology* 51: 245–66.
- Michalak, Izabela, Katarzyna Chojnacka, Agnieszka Dmytryk, Radosław Wilk, Mateusz Gramza, and Edward Rój. 2016. "Evaluation of Supercritical Extracts of Algae as Biostimulants of Plant Growth in Field Trials." *Frontiers in Plant Science* 7: 1591. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01591>.
- Michalak, Izabela, Agnieszka Dmytryk, Piotr P Wieczorek, Edward Rój, Bogusława Łęska, Bogusława Górka, Beata Messyas, et al. 2015. "Supercritical Algal Extracts: A Source of Biologically Active Compounds from Nature." Edited by Iciar Astiasaran. *Journal of Chemistry* 2015: 597140. <https://doi.org/10.1155/2015/597140>.
- Miedes, Eva, Ruben Vanholme, Wout Boerjan, and Antonio Molina. 2014. "The Role of the Secondary Cell Wall in Plant Resistance to Pathogens." *Frontiers in Plant Science* 5: 358.
- Millet, Yves A, Cristian H Danna, Nicole K Clay, Wisuwat Songnuan, Matthew D Simon, Danièle Werck-Reichhart, and Frederick M Ausubel. 2010. "Innate Immune Responses Activated in Arabidopsis Roots by Microbe-Associated Molecular Patterns." *The Plant Cell* 22 (3): 973–90.
- Mishra, Ajay Kumar, Kamal Sharma, and Raj Shekhar Misra. 2012. "Elicitor Recognition, Signal Transduction and Induced Resistance in Plants." *Journal of Plant Interactions* 7 (2): 95–120.
- Mógor, Átila Francisco, Juliana de Oliveira Amatussi, Gilda Mógor, and Gabriel Bocchetti de Lara. 2018. "Bioactivity of Cyanobacterial Biomass Related to Amino Acids Induces Growth and Metabolic Changes on Seedlings and Yield Gains of Organic Red Beet."

- American Journal of Plant Sciences* 9 (05): 966.
- Molina-Moya, Eliana, Laura C Terrón-Camero, Leyre Pescador-Azofra, Luisa M Sandalio, and María C Romero-Puertas. 2019. "Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Production, Regulation and Function During Defense Response." *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms*, 573–90.
- Monaghan, Jacqueline, and Cyril Zipfel. 2012. "Plant Pattern Recognition Receptor Complexes at the Plasma Membrane." *Current Opinion in Plant Biology* 15 (4): 349–57.
- Morris, Peter C. 2001. "MAP Kinase Signal Transduction Pathways in Plants." *New Phytologist* 151 (1): 67–89.
- Muller, Adrian, Christian Schader, Nadia El-Hage Scialabba, Judith Brüggemann, Anne Isensee, Karl-Heinz Erb, Pete Smith, et al. 2017. "Strategies for Feeding the World More Sustainably with Organic Agriculture." *Nature Communications* 8 (1): 1290. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01410-w>.
- Mur, Luis A J, Aprajita Kumari, Yariv Brotman, Jurgen Zeier, Julien Mandon, Simona M Cristescu, Frans Harren, Werner M Kaiser, Alisdair R Fernie, and Kapuganti Jagadis Gupta. 2019. "Nitrite and Nitric Oxide Are Important in the Adjustment of Primary Metabolism during the Hypersensitive Response in Tobacco." *Journal of Experimental Botany* 70 (17): 4571–82.
- Mus, Florence, Jean-Paul Toussaint, Keith E Cooksey, Matthew W Fields, Robin Gerlach, Brent M Peyton, and Ross P Carlson. 2013. "Physiological and Molecular Analysis of Carbon Source Supplementation and PH Stress-Induced Lipid Accumulation in the Marine Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (8): 3625–42. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4747-7>.
- Mutale-joan, Chanda, Benhima Redouane, Elmernissi Najib, Kasmi Yassine, Karim Lyamlouli, Sbabou Laila, Youssef Zeroual, and El Arroussi Hicham. 2020. "Screening of Microalgae Liquid Extracts for Their Bio Stimulant Properties on Plant Growth, Nutrient Uptake and Metabolite Profile of *Solanum Lycopersicum* L." *Scientific Reports* 10 (1): 2820. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59840-4>.
- Mutanda, T, D Ramesh, S Karthikeyan, S Kumari, A Anandraj, and F Bux. 2011. "Bioprospecting for Hyper-Lipid Producing Microalgal Strains for Sustainable Biofuel Production." *Bioresource Technology* 102 (1): 57–70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.077>.
- Nakashita, Hideo, Michiko Yasuda, Takako Nitta, Tadao Asami, Shozo Fujioka, Yuko Arai, Katsuhiko Sekimata, Suguru Takatsuto, Isamu Yamaguchi, and Shigeo Yoshida. 2003. "Brassinosteroid Functions in a Broad Range of Disease Resistance in Tobacco and Rice." *The Plant Journal* 33 (5): 887–98.
- Nanda, Amrit K, Emilie Andrio, Daniel Marino, Nicolas Pauly, and Christophe Dunand. 2010. "Reactive Oxygen Species during Plant-microorganism Early Interactions." *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (2): 195–204.
- Nardi, Serenella, Diego Pizzeghello, Michela Schiavon, and Andrea Ertani. 2016. "Plant Biostimulants: Physiological Responses Induced by Protein Hydrolyzed-Based Products

- p>and Humic Substances in Plant Metabolism.”
- Scientia Agricola*
- 73: 18–23.
- Navarro-López, Elvira, Angela Ruíz-Nieto, Alice Ferreira, F Gabriel Acién, and Luisa Gouveia. 2020. “Biostimulant Potential of *Scenedesmus Obliquus* Grown in Brewery Wastewater.” *Molecules* 25 (3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030664>.
- Newman, Mari-Anne, Thomas Sundelin, Jon Thoe Nielsen, and Gitte Erbs. 2013. “MAMP (Microbe-Associated Molecular Pattern) Triggered Immunity in Plants.” *Frontiers in Plant Science* 4: 139.
- Nguyen, Quang-Minh, Arya Bagus Boedi Iswanto, Geon Hui Son, and Sang Hee Kim. 2021. “Recent Advances in Effector-Triggered Immunity in Plants: New Pieces in the Puzzle Create a Different Paradigm.” *International Journal of Molecular Sciences* 22 (9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094709>.
- Nicaise, Valerie, Milena Roux, and Cyril Zipfel. 2009. “Recent Advances in PAMP-Triggered Immunity against Bacteria: Pattern Recognition Receptors Watch over and Raise the Alarm.” *Plant Physiology* 150 (4): 1638–47.
- Nobécourt, Pierre. 1946. “Les Mécanismes de l’immunité Naturelle Chez Les Végétaux.” *Journal d’agriculture Traditionnelle et de Botanique Appliquée* 26 (287): 529–42.
- Nobre, B P, F Villalobos, B E Barragán, A C Oliveira, A P Batista, P.A.S.S. Marques, R L Mendes, H Sovová, A F Palavra, and L Gouveia. 2013. “A Biorefinery from *Nannochloropsis* Sp. Microalga – Extraction of Oils and Pigments. Production of Biohydrogen from the Leftover Biomass.” *Bioresource Technology* 135: 128–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.084>.
- Oliver, Richard P, and Simon V S Ipcho. 2004. “Arabidopsis Pathology Breathes New Life into the Necrotrophs-vs.-biotrophs Classification of Fungal Pathogens.” *Molecular Plant Pathology* 5 (4): 347–52.
- Ota, M, K Imada, K Sasaki, H Kajihara, S Sakai, and S Ito. 2019. “MgO-induced Defence against Bacterial Wilt Disease in *Arabidopsis Thaliana*.” *Plant Pathology* 68 (2): 323–33.
- Ozkurt, Ibrahim. 2009. “Qualifying of Safflower and Algae for Energy.” *Energy Education Science and Technology Part A-Energy Science and Research* 23 (1–2): 145–51.
- Pan, Sharadwata, Jaison Jeevanandam, and Michael K Danquah. 2019. “Benefits of Algal Extracts in Sustainable Agriculture.” In *Grand Challenges in Algae Biotechnology*, edited by Armin Hallmann and Pabulo H Rampelotto, 501–34. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-25233-5_14.
- Pathak, Jainendra, Rajneesh, Pankaj K Maurya, Shailendra P Singh, Donat-P. Häder, and Rajeshwar P Sinha. 2018. “Cyanobacterial Farming for Environment Friendly Sustainable Agriculture Practices: Innovations and Perspectives.” *Frontiers in Environmental Science* 6. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00007>.
- Pedley, Kerry F, and Gregory B Martin. 2004. “Identification of MAPKs and Their Possible MAPK Kinase Activators Involved in the Pto-Mediated Defense Response of Tomato.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (47): 49229–35.
- . 2005. “Role of Mitogen-Activated Protein Kinases in Plant Immunity.” *Current Opinion in Plant Biology* 8 (5): 541–47.
- Pieterse, Corné M J, Dieuwertje Van der Does, Christos Zamioudis, Antonio Leon-Reyes, and

- Saskia C M Van Wees. 2012. "Hormonal Modulation of Plant Immunity." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28: 489–521.
- Pingali, Prabhu L. 2012. "Green Revolution: Impacts, Limits, and the Path Ahead." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (31): 12302–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912953109>.
- Pires, José C M. 2015. "Chapter 5 - Mass Production of Microalgae." In *Handbook of Marine Microalgae*, edited by Se-Kwon Kim, 55–68. Boston: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00005-4>.
- Placzek, Małgorzata, Agnieszka Patyna, and Stanisław Witczak. 2017. "Technical Evaluation of Photobioreactors for Microalgae Cultivation." In *E3S Web of Conferences*, 19:2032. EDP Sciences.
- Pollard, Mike, Fred Beisson, Yonghua Li, and John B Ohlrogge. 2008. "Building Lipid Barriers: Biosynthesis of Cutin and Suberin." *Trends in Plant Science* 13 (5): 236–46.
- Postel, Sandra, and Birgit Kemmerling. 2009. "Plant Systems for Recognition of Pathogen-Associated Molecular Patterns." In *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20:1025–31. Elsevier.
- Prasanna, Radha, Santosh Babu, Ngangom Bidyarani, Arun Kumar, Sodimalla Triveni, Dilip Monga, Arup Kumar Mukherjee, Sandhya Kranthi, Nandini Gokte-Narkhedkar, and Anurup Adak. 2015. "Prospecting Cyanobacteria-Fortified Composts as Plant Growth Promoting and Biocontrol Agents in Cotton." *Experimental Agriculture* 51 (1): 42–65.
- Prasanna, Radha, Anjuli Sood, Sachitra Kumar Ratha, and Pawan K. Singh. 2014. "Cyanobacteria as a 'Green' Option for Sustainable Agriculture." *Cyanobacteria: An Economic Perspective*, 145–66.
- Pratelli, Réjane, and Guillaume Pilot. 2014. "Regulation of Amino Acid Metabolic Enzymes and Transporters in Plants." *Journal of Experimental Botany* 65 (19): 5535–56.
- Prathima Devi, M, and S Venkata Mohan. 2012. "CO2 Supplementation to Domestic Wastewater Enhances Microalgae Lipid Accumulation under Mixotrophic Microenvironment: Effect of Sparging Period and Interval." *Bioresource Technology* 112: 116–23. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.095>.
- Puglisi, Ivana, Emanuele La Bella, Ermes Ivan Rovetto, Angela Roberta Lo Piero, and Andrea Baglieri. 2020. "Biostimulant Effect and Biochemical Response in Lettuce Seedlings Treated with A Scenedesmus Quadricauda Extract." *Plants* 9 (1). <https://doi.org/10.3390/plants9010123>.
- Qi, Junsheng, Jinlong Wang, Zhizhong Gong, and Jian-Min Zhou. 2017. "Apoplatic ROS Signaling in Plant Immunity." *Current Opinion in Plant Biology* 38: 92–100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.022>.
- Qiang, Hu, and Amos Richmond. 1996. "Productivity and Photosynthetic Efficiency OfSpirulina Platensis as Affected by Light Intensity, Algal Density and Rate of Mixing in a Flat Plate Photobioreactor." *Journal of Applied Phycology* 8 (2): 139–45. <https://doi.org/10.1007/BF02186317>.
- Rachidi, Farid, Redouane Benhima, Yassine Kasmi, Laila Sbabou, and Hicham El Arroussi. 2021. "Evaluation of Microalgae Polysaccharides as Biostimulants of Tomato Plant

- Defense Using Metabolomics and Biochemical Approaches.” *Scientific Reports* 11 (1): 930. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78820-2>.
- Rachidi, Farid, Redouane Benhima, Laila Sbabou, and Hicham El Arroussi. 2020. “Microalgae Polysaccharides Bio-Stimulating Effect on Tomato Plants: Growth and Metabolic Distribution.” *Biotechnology Reports* 25: e00426.
- Ramirez-Estrada, Karla, Heriberto Vidal-Limon, Diego Hidalgo, Elisabeth Moyano, Marta Golenioswki, Rosa M Cusidó, and Javier Palazon. 2016. “Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories.” *Molecules* 21 (2): 182.
- Rashid, Abdur. 2016. “Defense Responses of Plant Cell Wall Non-Catalytic Proteins against Pathogens.” *Physiological and Molecular Plant Pathology* 94: 38–46.
- Rehman, H. n.d. “Ur, Alharby, HF, Alzahrani, Y., and Rady, MM (2018). Magnesium and Organic Biostimulant Integrative Application Induces Physiological and Biochemical Changes in Sunflower Plants and Its Harvested Progeny on Sandy Soil.” *Plant Physiol. Biochem* 126: 97–105.
- Renuka, Nirmal, Abhishek Guldhe, Radha Prasanna, Poonam Singh, and Faizal Bux. 2018. “Microalgae as Multi-Functional Options in Modern Agriculture: Current Trends, Prospects and Challenges.” *Biotechnology Advances* 36 (4): 1255–73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.04.004>.
- Richmond, Amos, and Qiang Hu. 2013. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. John Wiley & Sons.
- Rizzello, Carlo G, Davide Tagliazucchi, Elena Babini, Giuseppina Sefora Rutella, Danielle L Taneyo Saa, and Andrea Gianotti. 2016. “Bioactive Peptides from Vegetable Food Matrices: Research Trends and Novel Biotechnologies for Synthesis and Recovery.” *Journal of Functional Foods* 27: 549–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.023>.
- Robert-Seilaniantz, Alexandre, Murray Grant, and Jonathan D G Jones. 2011. “Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More than Just Jasmonate-Salicylate Antagonism.” *Annual Review of Phytopathology* 49: 317–43.
- Rodriguez, M C, Morten Petersen, and John Mundy. 2010. “Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plants.” *Annu Rev Plant Biol* 61 (1): 621–49.
- Roetschi, Alexandra, Azeddine Si-Ammour, Lassaâd Belbahri, Felix Mauch, and Brigitte Mauch-Mani. 2001. “Characterization of an Arabidopsis–Phytophthora Pathosystem: Resistance Requires a Functional PAD2 Gene and Is Independent of Salicylic Acid, Ethylene and Jasmonic Acid Signalling.” *The Plant Journal* 28 (3): 293–305.
- Romano, G, M Costantini, C Sansone, C Lauritano, N Ruocco, and A Ianora. 2017. “Marine Microorganisms as a Promising and Sustainable Source of Bioactive Molecules.” *Marine Environmental Research* 128: 58–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.05.002>.
- Romero-Puertas, María C, Michele Perazzolli, Elisa D Zago, and Massimo Delledonne. 2004. “Nitric Oxide Signalling Functions in Plant–Pathogen Interactions.” *Cellular Microbiology* 6 (9): 795–803.

- Ronga, Domenico, Elisa Biazzi, Katia Parati, Domenico Carminati, Elio Carminati, and Aldo Tava. 2019. "Microalgal Biostimulants and Biofertilisers in Crop Productions." *Agronomy* 9: 192. <https://doi.org/10.3390/agronomy9040192>.
- Rosenzweig, Cynthia, Joshua Elliott, Delphine Deryng, Alex C Ruane, Christoph Müller, Almut Arneth, Kenneth J Boote, et al. 2014. "Assessing Agricultural Risks of Climate Change in the 21st Century in a Global Gridded Crop Model Intercomparison." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (9): 3268–73. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222463110>.
- Rouphael, Youssef, Petronia Carillo, Giuseppe Colla, Nunzio Fiorentino, Leo Sabatino, Christophe El-Nakhel, Maria Giordano, Antonio Pannico, Valerio Cirillo, and Edris Shabani. 2020. "Appraisal of Combined Applications of Trichoderma Virens and a Biopolymer-Based Biostimulant on Lettuce Agronomical, Physiological, and Qualitative Properties under Variable N Regimes." *Agronomy* 10 (2): 196.
- Rouphael, Youssef, and Giuseppe Colla. 2018. "Synergistic Biostimulatory Action: Designing the next Generation of Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture." *Frontiers in Plant Science* 9: 1655.
- Rouphael, Youssef, Luigi Lucini, Begoña Miras-Moreno, Giuseppe Colla, Paolo Bonini, and Mariateresa Cardarelli. 2020. "Metabolomic Responses of Maize Shoots and Roots Elicited by Combinatorial Seed Treatments with Microbial and Non-Microbial Biostimulants." *Frontiers in Microbiology* 11: 664.
- Rouphael, Youssef, Lukáš Spíchal, Klára Panzarová, Raffaele Casa, and Giuseppe Colla. 2018. "High-Throughput Plant Phenotyping for Developing Novel Biostimulants: From Lab to Field or from Field to Lab?" *Frontiers in Plant Science* 9: 1197.
- Rubio, F Camacho, F G Acien Fernández, J A Sánchez Pérez, F García Camacho, and E Molina Grima. 1999. "Prediction of Dissolved Oxygen and Carbon Dioxide Concentration Profiles in Tubular Photobioreactors for Microalgal Culture." *Biotechnology and Bioengineering* 62 (1): 71–86.
- Safaie-Farahani, Ali, and S Mohsen Taghavi. 2017. "Transcript Analysis of Some Defense Genes of Tomato in Response to Host and Non-Host Bacterial Pathogens." *Molecular Biology Research Communications* 6 (4): 177.
- Sanchez-Vallet, Andrea, Brisa Ramos, Paweł Bednarek, Gemma López, Mariola Piślewska-Bednarek, Paul Schulze-Lefert, and Antonio Molina. 2010. "Tryptophan-derived Secondary Metabolites in Arabidopsis Thaliana Confer Non-host Resistance to Necrotrophic Plectosphaerella Cucumerina Fungi." *The Plant Journal* 63 (1): 115–27.
- Sandeep, K P, K P KumaraguruVasangam, P Kumararaja, J Syama Dayal, G B Sreekanth, K Ambasankar, and K K Vijayan. 2019. "Microalgal Diversity of a Tropical Estuary in South India with Special Reference to Isolation of Potential Species for Aquaculture." *Journal of Coastal Conservation* 23 (1): 253–67. <https://doi.org/10.1007/s11852-018-0655-4>.
- Schiavon, Michela, Andrea Ertani, and Serenella Nardi. 2008. "Effects of an Alfalfa Protein Hydrolysate on the Gene Expression and Activity of Enzymes of the Tricarboxylic Acid (TCA) Cycle and Nitrogen Metabolism in Zea Mays L." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (24): 11800–808.

- Schroeder, Declan C, Joanne Oke, Matthew Hall, Gillian Malin, and William H Wilson. 2003. "Virus Succession Observed during an *Emiliania Huxleyi* Bloom." *Applied and Environmental Microbiology* 69 (5): 2484–90. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2484-2490.2003>.
- Schulze-Lefert, Paul, and Ralph Panstruga. 2003. "Establishment of Biotrophy by Parasitic Fungi and Reprogramming of Host Cells for Disease Resistance." *Annual Review of Phytopathology* 41 (1): 641–67.
- Schwessinger, Benjamin, and Cyril Zipfel. 2008. "News from the Frontline: Recent Insights into PAMP-Triggered Immunity in Plants." *Current Opinion in Plant Biology* 11 (4): 389–95.
- Sels, Jan, Janick Mathys, Barbara M A De Coninck, Bruno P A Cammue, and Miguel F C De Bolle. 2008. "Plant Pathogenesis-Related (PR) Proteins: A Focus on PR Peptides." *Plant Physiology and Biochemistry* 46 (11): 941–50.
- Seo, Mitsunori, Yusuke Jikumaru, and Yuji Kamiya. 2011. "Profiling of Hormones and Related Metabolites in Seed Dormancy and Germination Studies." In *Seed Dormancy*, 99–111. Springer.
- Serrano, Mario, Fania Coluccia, Martha Torres, Floriane L'Haridon, and Jean-Pierre Métraux. 2014. "The Cuticle and Plant Defense to Pathogens." *Frontiers in Plant Science* 5: 274.
- Sharma, Nandni, Sandeep Kour, Deepak Kumar, Ravinderjit Kaur, Anjali Khajuria, and Puja Ohri. 2022. "Role of Brassinosteroids (BRs) in Modulating Antioxidative Defense Mechanism in Plants Growing Under Abiotic and Biotic Stress Conditions." In *Antioxidant Defense in Plants*, 325–67. Springer.
- Sharma, Pallavi, Ambuj Bhushan Jha, Rama Shanker Dubey, and Mohammad Pessarakli. 2012. "Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions." *Journal of Botany* 2012.
- Sharma, Poonam, and Nivedita Sharma. 2017. "Industrial and Biotechnological Applications of Algae: A Review." *Journal of Advances in Plant Biology* 1 (1): 1.
- Sheih, I.-Chuan, Tony J Fang, and Tung-Kung Wu. 2009. "Isolation and Characterisation of a Novel Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptide from the Algae Protein Waste." *Food Chemistry* 115 (1): 279–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.019>.
- Sheikh, Arsheed Hussain, Badmi Raghuram, Lennart Eschen-Lippold, Dierk Scheel, Justin Lee, and Alok Krishna Sinha. 2014. "Agroinfiltration by Cytokinin-Producing *Agrobacterium* Sp. Strain GV3101 Primes Defense Responses in *Nicotiana Tabacum*." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27 (11): 1175–85.
- Siddiqui, Husna, Shamsul Hayat, and Andrzej Bajguz. 2018. "Regulation of Photosynthesis by Brassinosteroids in Plants." *Acta Physiologiae Plantarum* 40 (3): 1–15.
- Singh, Jasvinder, and Rakesh Chandra Saxena. 2015. "Chapter 2 - An Introduction to Microalgae: Diversity and Significance." In *Handbook of Marine Microalgae*, edited by Se-Kwon Kim, 11–24. Boston: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00002-9>.
- Singh, Poonam, Sanjay Kumar Gupta, Abhishek Guldhe, Ismail Rawat, and Faizal Bux. 2015.

- “Chapter 4 - Microalgae Isolation and Basic Culturing Techniques.” In *Handbook of Marine Microalgae*, edited by Se-Kwon Kim, 43–54. Boston: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00004-2>.
- Singh, Rachana, Parul Parihar, Madhulika Singh, Andrzej Bajguz, Jitendra Kumar, Samiksha Singh, Vijay P Singh, and Sheo M Prasad. 2017. “Uncovering Potential Applications of Cyanobacteria and Algal Metabolites in Biology, Agriculture and Medicine: Current Status and Future Prospects.” *Frontiers in Microbiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00515>.
- Singh, S P, and Priyanka Singh. 2015. “Effect of Temperature and Light on the Growth of Algae Species: A Review.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 50: 431–44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.024>.
- Smirnoff, Nicholas, and Dominique Arnaud. 2019. “Hydrogen Peroxide Metabolism and Functions in Plants.” *New Phytologist* 221 (3): 1197–1214.
- Smith, Val H, Bryan L Foster, James P Grover, Robert D Holt, Mathew A Leibold, and Frank deNoyelles. 2005. “Phytoplankton Species Richness Scales Consistently from Laboratory Microcosms to the World’s Oceans.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (12): 4393–96. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500094102>.
- Solimeno, Alessandro, Roger Samsó, Enrica Uggetti, Bruno Sialve, Jean-Philippe Steyer, Adrián Gabarró, and Joan García. 2015. “New Mechanistic Model to Simulate Microalgae Growth.” *Algal Research* 12: 350–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.09.008>.
- Song, Yuan Yuan, Ren Sen Zeng, Jian Feng Xu, Jun Li, Xiang Shen, and Woldemariam Gebrehiwot Yihdego. 2010. “Interplant Communication of Tomato Plants through Underground Common Mycorrhizal Networks.” *PloS One* 5 (10): e13324.
- Song, Yun, Yaohua Zhai, Linxuan Li, Zhaoen Yang, Xiaoyang Ge, Zuoren Yang, Chaojun Zhang, Fuguang Li, and Maozhi Ren. 2021. “BIN2 Negatively Regulates Plant Defence against *Verticillium Dahliae* in *Arabidopsis* and Cotton.” *Plant Biotechnology Journal* 19 (10): 2097–2112.
- Spoel, Steven H, Jessica S Johnson, and Xinnian Dong. 2007. “Regulation of Tradeoffs between Plant Defenses against Pathogens with Different Lifestyles.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (47): 18842–47.
- Srivastava, Lalit M. 2002. *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*. Elsevier.
- Stadnik, Marciel J, and Mateus B de Freitas. 2014. “Algal Polysaccharides as Source of Plant Resistance Inducers.” *Tropical Plant Pathology* 39: 111–18. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1982-56762014000200001&nrm=iso.
- Steensland, Ann. 2019. “2019 Global Agricultural Productivity Report: Productivity Growth for Sustainable Diets and More.” *2019 Global Agricultural Productivity Report: Productivity Growth for Sustainable Diets and More*.
- Stringlis, Ioannis A, Silvia Proietti, Richard Hickman, Marcel C Van Verk, Christos Zamioudis, and Corné M J Pieterse. 2018. “Root Transcriptional Dynamics Induced by Beneficial

- Rhizobacteria and Microbial Immune Elicitors Reveal Signatures of Adaptation to Mutualists.” *The Plant Journal* 93 (1): 166–80.
- Stulemeijer, Iris J E, and Matthieu H A J Joosten. 2008. “Post-translational Modification of Host Proteins in Pathogen-triggered Defence Signalling in Plants.” *Molecular Plant Pathology* 9 (4): 545–60.
- Suetsuna, Kunio, and Jiun-Rong Chen. 2001. “Identification of Antihypertensive Peptides from Peptic Digest of Two Microalgae, *Chlorella Vulgaris* and *Spirulina Platensis*.” *Marine Biotechnology* 3 (4): 305–9. <https://doi.org/10.1007/s10126-001-0012-7>.
- Taiz, Lincoln, Eduardo Zeiger, Ian Max Møller, and Angus Murphy. 2017. *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal*. Artmed Editora.
- Taj, Gohar, Payal Agarwal, Murray Grant, and Anil Kumar. 2010. “MAPK Machinery in Plants: Recognition and Response to Different Stresses through Multiple Signal Transduction Pathways.” *Plant Signaling & Behavior* 5 (11): 1370–78.
- Temraleeva, A D, S A Dronova, S V Moskalenko, and S V Didovich. 2016. “Modern Methods for Isolation, Purification, and Cultivation of Soil Cyanobacteria.” *Microbiology* 85 (4): 389–99. <https://doi.org/10.1134/S0026261716040159>.
- Thatcher, Louise F, Jonathan P Anderson, and Karam B Singh. 2005. “Plant Defence Responses: What Have We Learnt from Arabidopsis?” *Functional Plant Biology* 32 (1): 1–19.
- Thomas, Brian. 2016. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Academic Press.
- Ton, Jurriaan, Victor Flors, and Brigitte Mauch-Mani. 2009. “The Multifaceted Role of ABA in Disease Resistance.” *Trends in Plant Science* 14 (6): 310–17.
- Tör, Mahmut, Michael T Lotze, and Nicholas Holton. 2009. “Receptor-Mediated Signalling in Plants: Molecular Patterns and Programmes.” *Journal of Experimental Botany* 60 (13): 3645–54.
- Toyota, Masatsugu, Dirk Spencer, Satoe Sawai-Toyota, Wang Jiaqi, Tong Zhang, Abraham J Koo, Gregg A Howe, and Simon Gilroy. 2018. “Glutamate Triggers Long-Distance, Calcium-Based Plant Defense Signaling.” *Science* 361 (6407): 1112–15.
- Truman, William, Mark H Bennett, Ines Kubigsteltig, Colin Turnbull, and Murray Grant. 2007. “Arabidopsis Systemic Immunity Uses Conserved Defense Signaling Pathways and Is Mediated by Jasmonates.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (3): 1075–80.
- Truman, William M, Mark H Bennett, Colin G N Turnbull, and Murray R Grant. 2010. “Arabidopsis Auxin Mutants Are Compromised in Systemic Acquired Resistance and Exhibit Aberrant Accumulation of Various Indolic Compounds.” *Plant Physiology* 152 (3): 1562–73.
- Tsuda, Kenichi, Masanao Sato, Jane Glazebrook, Jerry D Cohen, and Fumiaki Katagiri. 2008. “Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated Defense Responses.” *The Plant Journal* 53 (5): 763–75.
- Tunc-Ozdemir, Meral, and Alan M Jones. 2017. “Ligand-Induced Dynamics of Heterotrimeric G Protein-Coupled Receptor-like Kinase Complexes.” *PloS One* 12 (2): e0171854.
- Ugwu, C U, H Aoyagi, and H Uchiyama. 2008. “Photobioreactors for Mass Cultivation of

- Algae.” *Bioresource Technology* 99 (10): 4021–28.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.046>.
- Venkatesan, Jayachandran, Panchanathan Manivasagan, and Se-Kwon Kim. 2015. “Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances.” In *Handbook of Marine Microalgae*, 1–9. Elsevier.
- Vera, Jeannette, Jorge Castro, Alberto Gonzalez, and Alejandra Moenne. 2011. “Seaweed Polysaccharides and Derived Oligosaccharides Stimulate Defense Responses and Protection Against Pathogens in Plants.” *Marine Drugs* 9 (12): 2514–25.
<https://doi.org/10.3390/md9122514>.
- Verma, Vivek, Pratibha Ravindran, and Prakash P Kumar. 2016. “Plant Hormone-Mediated Regulation of Stress Responses.” *BMC Plant Biology* 16 (1): 86.
<https://doi.org/10.1186/s12870-016-0771-y>.
- Veselova, Svetlana V, Tatyana V Nuzhnaya, Guzel F Burkhanova, Sergey D Rumyantsev, Elza K Khusnutdinova, and Igor V Maksimov. 2021. “Ethylene-Cytokinin Interaction Determines Early Defense Response of Wheat against Stagonospora Nodorum Berk.” *Biomolecules* 11 (2): 174.
- Vo, Thanh-Sang, BoMi Ryu, and Se-Kwon Kim. 2013. “Purification of Novel Anti-Inflammatory Peptides from Enzymatic Hydrolysate of the Edible Microalgal *Spirulina Maxima*.” *Journal of Functional Foods* 5 (3): 1336–46.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.05.001>.
- Voigt, Christian A. 2014. “Callose-Mediated Resistance to Pathogenic Intruders in Plant Defense-Related Papillae.” *Frontiers in Plant Science* 5: 168.
- Wan, Xuzhi, Xiaoqing Li, Dan Liu, Xiaoxiang Gao, Yihan Chen, Zhengxin Chen, Caili Fu, Luan Lin, Bin Liu, and Chao Zhao. 2021. “Physicochemical Characterization and Antioxidant Effects of Green Microalga *Chlorella Pyrenoidosa* Polysaccharide by Regulation of MicroRNAs and Gut Microbiota in *Caenorhabditis Elegans*.” *International Journal of Biological Macromolecules* 168: 152–62.
- Wang, Gang, Arianna Lovato, Annalisa Polverari, Min Wang, Ying-Hai Liang, Yuan-Chun Ma, and Zong-Ming Cheng. 2014. “Genome-Wide Identification and Analysis of Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase Gene Family in Grapevine (*Vitis Vinifera*).” *BMC Plant Biology* 14 (1): 1–19.
- Wendehenne, David, Jörg Durner, and Daniel F Klessig. 2004. “Nitric Oxide: A New Player in Plant Signalling and Defence Responses.” *Current Opinion in Plant Biology* 7 (4): 449–55.
- Wiesel, Lea, Adrian C Newton, Ian Elliott, David Booty, Eleanor M Gilroy, Paul R J Birch, and Ingo Hein. 2014. “Molecular Effects of Resistance Elicitors from Biological Origin and Their Potential for Crop Protection.” *Frontiers in Plant Science* 5: 655.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00655>.
- Wildermuth, Mary C, Julia Dewdney, Gang Wu, and Frederick M Ausubel. 2001. “Isochorismate Synthase Is Required to Synthesize Salicylic Acid for Plant Defence.” *Nature* 414 (6863): 562–65.
- Win, Theint Theint, Giovanni Davide Barone, Francesco Secundo, and Pengcheng Fu. 2018.

- “Algal Biofertilizers and Plant Growth Stimulants for Sustainable Agriculture.” *Industrial Biotechnology* 14 (4): 203–11.
- Wozniak, Elizabeth, Adam Blaszczyk, Pawel Wiatrak, and Michael Canady. 2020. “Biostimulant Mode of Action: Impact of Biostimulant on Whole-Plant Level.” *The Chemical Biology of Plant Biostimulants*, 205–27.
- Xiao, Ruixue, Yirong Zou, Xiaorui Guo, Hui Li, and Hai Lu. 2022. “Fatty Acid Desaturases (FADs) Modulate Multiple Lipid Metabolism Pathways to Improve Plant Resistance.” *Molecular Biology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07568-x>.
- Xing, Zheng, Xu Zong, Jian Pan, and Lianzhou Wang. 2013. “On the Engineering Part of Solar Hydrogen Production from Water Splitting: Photoreactor Design.” *Chemical Engineering Science* 104: 125–46. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ces.2013.08.039](https://doi.org/10.1016/j.ces.2013.08.039).
- Yakhin, O I, A A Lubyantsev, and I A Yakhin. 2016. “Biostimulants in Agrotechnologies: Problems, Solutions, Outlook.” *Agrochemical Herald* 1: 15–21.
- Yakhin, Oleg I, Aleksandr A Lubyantsev, Ildus A Yakhin, and Patrick H Brown. 2017. “Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective.” *Frontiers in Plant Science* 7: 2049. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>.
- Yang, Anming, Lu Yu, Zhuo Chen, Shanxue Zhang, Jing Shi, Xiaozhen Zhao, Yuanyou Yang, Deyu Hu, and Baoan Song. 2017. “Label-Free Quantitative Proteomic Analysis of Chitosan Oligosaccharide-Treated Rice Infected with Southern Rice Black-Streaked Dwarf Virus.” *Viruses* 9 (5): 115.
- Yang, Jieru, Zhaopeng Shen, Zhanyi Sun, Peng Wang, and Xiaolu Jiang. 2021. “Growth Stimulation Activity of Alginate-Derived Oligosaccharides with Different Molecular Weights and Mannuronate/Guluronate Ratio on *Hordeum Vulgare* L.” *Journal of Plant Growth Regulation* 40 (1): 91–100.
- Yang, Ruinan, Li Xue, Liangxiao Zhang, Xuefang Wang, Xin Qi, Jun Jiang, Li Yu, Xiupin Wang, Wen Zhang, and Qi Zhang. 2019. “Phytosterol Contents of Edible Oils and Their Contributions to Estimated Phytosterol Intake in the Chinese Diet.” *Foods* 8 (8): 334.
- Yeh, Kuei-Ling, and Jo-Shu Chang. 2012. “Effects of Cultivation Conditions and Media Composition on Cell Growth and Lipid Productivity of Indigenous Microalga *Chlorella Vulgaris* ESP-31.” *Bioresource Technology* 105: 120–27. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.103](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.103).
- Yen, Hong-Wei, I.-Chen Hu, Chun-Yen Chen, Shih-Hsin Ho, Duu-Jong Lee, and Jo-Shu Chang. 2013. “Microalgae-Based Biorefinery – From Biofuels to Natural Products.” *Bioresource Technology* 135: 166–74. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.099](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.099).
- Yin, Heng, Xiaoming Zhao, and Yuguang Du. 2010. “Oligochitosan: A Plant Diseases Vaccine—a Review.” *Carbohydrate Polymers* 82 (1): 1–8.
- Zeidler, Dana, Ulrich Zähringer, Isak Gerber, Ian Dubery, Thomas Hartung, Wolf Bors, Peter Hutzler, and Jörg Durner. 2004. “Innate Immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides Activate Nitric Oxide Synthase (NOS) and Induce Defense Genes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (44): 15811–16.
- Zhang, Chunguang, Prianka Howlader, Tongmei Liu, Xue Sun, Xiaochen Jia, Xiaoming Zhao,

- Peili Shen, Yimin Qin, Wenxia Wang, and Heng Yin. 2019. "Alginate Oligosaccharide (AOS) Induced Resistance to Pst DC3000 via Salicylic Acid-Mediated Signaling Pathway in Arabidopsis Thaliana." *Carbohydrate Polymers* 225: 115221.
- Zhang, Da-Wei, Xing-Guang Deng, Fa-Qiong Fu, and Hong-Hui Lin. 2015. "Induction of Plant Virus Defense Response by Brassinosteroids and Brassinosteroid Signaling in Arabidopsis Thaliana." *Planta* 241 (4): 875–85.
- Zhang, Nana, Andy Lariviere, Stephen J Tonsor, and M Brian Traw. 2014. "Constitutive Camalexin Production and Environmental Stress Response Variation in Arabidopsis Populations from the Iberian Peninsula." *Plant Science* 225: 77–85.
- Zhang, Shujuan, Liu Wang, Ruirui Zhao, Wenqing Yu, Rui Li, Yujing Li, Jiping Sheng, and Lin Shen. 2018. "Knockout of SIMAPK3 Reduced Disease Resistance to Botrytis Cinerea in Tomato Plants." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (34): 8949–56.
- Zhang, Shuqun, and Daniel F Klessig. 2001. "MAPK Cascades in Plant Defense Signaling." *Trends in Plant Science* 6 (11): 520–27.
- Zhang, Wei, Feng Zhao, Lihui Jiang, Cun Chen, Lintao Wu, and Zhibin Liu. 2018. "Different Pathogen Defense Strategies in Arabidopsis: More than Pathogen Recognition." *Cells* 7 (12): 252.
- Zhang, Yan, Thomas Lubberstedt, and Mingliang Xu. 2013. "The Genetic and Molecular Basis of Plant Resistance to Pathogens." *Journal of Genetics and Genomics* 40 (1): 23–35.
- Zheng, Yanyan, Hui Hong, Lin Chen, Jingyuan Li, Jiping Sheng, and Lin Shen. 2014. "LeMAPK1, LeMAPK2, and LeMAPK3 Are Associated with Nitric Oxide-Induced Defense Response against Botrytis Cinerea in the Lycopersicon Esculentum Fruit." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (6): 1390–96.
- Zhou, Nan, Tina L Tootle, and Jane Glazebrook. 1999. "Arabidopsis PAD3, a Gene Required for Camalexin Biosynthesis, Encodes a Putative Cytochrome P450 Monooxygenase." *The Plant Cell* 11 (12): 2419–28.
- Zipfel, Cyril. 2014. "Plant Pattern-Recognition Receptors." *Trends in Immunology* 35 (7): 345–51.
- Zipfel, Cyril, and Georg Felix. 2005. "Plants and Animals: A Different Taste for Microbes?" *Current Opinion in Plant Biology* 8 (4): 353–60.

A. Quantification de l'ARN

L'évaluation quantitative et qualitative de l'ARN extrait est assurée par le Nano Drop. Et le Qubit fluorometer 4 (**Tableau 16**).

Le rapport des lectures à 260 nm et 280 nm (A260 / A280) fournit une estimation de la pureté de l'ARN par rapport aux contaminants qui absorbent dans le spectre UV, tels que les protéines.

Tableau 16 : Dosage de l'ARN extrait.

Qubit 4 fluoremeter	Nanodrop	A260	A280	A230	A260/A280	A260/A230
ng/µl	ng/µl					
342	448,4	11,21	5,28	5,63316583	2,12	1,99
380	568,9	14,22	6,66	6,80382775	2,14	2,09
316	392,7	9,818	4,63	4,23189655	2,12	2,32
188	282,2	7,054	3,33	3,00170213	2,12	2,35
256	343,9	8,598	4,05	3,87297297	2,12	2,22
340	475,4	11,89	5,59	5,40454545	2,13	2,2
424	634,4	15,86	7,41	7,89054726	2,14	2,01
296	388,9	9,723	4,57	4,88592965	2,13	1,99
294	375,7	9,392	4,41	4,26909091	2,13	2,2
264	364,4	9,112	4,27	4,74583333	2,13	1,92
264	350,9	8,774	4,11	4,00639269	2,13	2,19
272	381,9	9,546	4,47	4,72574257	2,14	2,02

RÉSUMÉ

La protection intégrée et raisonnée des cultures constitue un défi majeur pour l'agriculture. Par ailleurs, les nouvelles approches de productions agricoles doivent concilier l'environnement et l'agriculture et donc veiller à préserver la durabilité des écosystèmes par la réduction des intrants chimiques au niveau des sols. Dans ce contexte, l'utilisation des biostimulants et des bioéliciteurs constitue une alternative biologique innovante et prometteuse. Ces produits sont capables d'induire la croissance d'une plante et de mimer son agression par un pathogène, induisant ainsi une résistance chez la plante. Ces substances permettent donc de promouvoir un état de résistance chez les plantes face aux différents stress biotiques et abiotiques. Plusieurs substances biologiques sont connues comme biostimulants telles que les polysaccharides, les extraits végétaux, les acides fulviques et humiques, les acides aminés, ainsi que les extraits d'algues et de microalgues. Au cours de ce travail, nous avons extrait des polysaccharides (PSs) à partir de microalgues et évalué leur potentiel à induire la croissance et la défense de plants de tomate. Les potentiels biostimulant et Bioéliciteur de ces PSs ont été testés et caractérisés par des approches biochimiques, métabolomiques, et moléculaires. Les résultats obtenus ont montré l'effet biostimulant des PSs sur la croissance de la plante (augmentation du nombre de nœuds, du poids sec des pousses et de la longueur des pousses), ainsi que l'amélioration du contenu en caroténoïdes, en chlorophylles et en protéines. Il a été aussi montré une amélioration de l'activité de la Nitrate réductase (NR) et de la NAD-Glutamate Déshydrogenase (NAD-GDH). Par ailleurs, nos études ont montré que ces polysaccharides induisent des voies biochimiques, transcriptomiques et métabolomiques en relation avec les voies de la défense des plantes. Nous avons noté l'induction de protéines PRs dépendantes de la pathogenèse (1,3-β-glucanase, chitinase, PAL et POX), des protéines totales, des polyphénols et du H₂O₂. L'analyse métabolomique par GC-MS a montré un changement dans le profil des lipides, des stérols et des alcanes. Aussi, nous avons obtenu une induction de la synthèse des acides gras (C16:3, C18:2 et C18:3, C18:0 et acide azélaïque), des alcanes, des alcènes et du phytostérol. L'analyse par Metaboanalyst 0.5 a montré une induction des voies du métabolisme de l'acide linoléique (LAM), de la biosynthèse des acides gras insaturés (BUFA), de la biosynthèse des acides gras (FAB), de la biosynthèse de la cutine, de la subérine et de la cire (CSWB), de la biosynthèse des brassinostéroïdes (BrB), de l'élongation des acides gras (FAE), de la dégradation des acides gras et du métabolisme de l'acide alpha-linolénique (aLAM). L'approche transcriptomique via qRT-PCR a montré que les gènes, MAPK (1-7), PR (PR1, PR2, PR3, PR9) et PI I ont été induits. Enfin, l'analyse par HPLC-MS a montré une accumulation très significative des phytohormones tZ et GA4. D'autre part, il a été noté une réduction hautement significative de la synthèse d'IAA et de DHZ et une réduction modérément significative de GA1 et de SA. Aucun effet significatif n'a été relevé quant à la synthèse de JA, ABA et iP. L'analyse par l'ACP et heatmap a révélé que les souches qui ont induits positivement divers paramètres dépendants de la croissance et la défense des plantes, sont *D. salina*, *Porphordium* sp et *P. tricornutum*. À l'issue de ces résultats, on peut constater que les polysaccharides microalgaux ouvrent de nouvelles perspectives pour le développement de produits Biostimulants et bioéliciteurs d'origine naturelle pour la stimulation de la croissance et l'induction de la défense des plantes.

Mots-clés : Microalgues, Polysaccharides, *S. lycopersicum* L (tomate), Stress, Biostimulants, Bioéliciteurs, Métabolomique, Transcriptomique, Croissance et Défense des Plantes.

ABSTRACT

Integrated and reasoned crop protection is a major challenge for agriculture. In addition, new approaches to agricultural production must reconcile the environment and agriculture and therefore ensure the sustainability of ecosystems by reducing chemical inputs to the soil. In this context, the use of biostimulants and bioelicitors is an innovative and promising biological alternative. These products are capable of inducing the growth of a plant and mimicking its aggression by a pathogen, thus inducing resistance in the plant. These substances can therefore promote a state of resistance in plants to various biotic and abiotic stresses. Several biological substances are known as biostimulants such as polysaccharides, plant extracts, fulvic and humic acids, amino acids, as well as algae and microalgae extracts. In this work, we extracted polysaccharides (PSs) from microalgae and evaluated their potential to induce growth and defense of tomato plants. The biostimulant and bioelicitor potentials of these PSs were tested and characterised by biochemical, metabolomic and molecular approaches. The results obtained showed the biostimulatory effect of PSs on plant growth (increase in the number of nodes, shoot dry weight and shoot length), as well as an improvement in the content of carotenoids, chlorophylls and proteins. It was also shown to improve Nitrate Reductase (NR) and NAD-Glutamate Dehydrogenase (NAD-GDH) activities. Furthermore, our studies showed that these polysaccharides induce biochemical, transcriptomic and metabolomic pathways related to those of plant defense. The induction of pathogenesis-dependent PRs (1,3-beta-glucanase, chitinase, PAL and POX), total proteins, polyphenols and H₂O₂ was noted. Metabolomic analysis by GC-MS showed a change in the lipid, sterol and alkane profiles. An induction of the synthesis of fatty acids (C16:3, C18:2 and C18:3, C18:0 and azelaic acid), alkanes, alkenes and phytosterol was obtained. Analysis by Metaboanalyst 0.5 analysis showed induction of the pathways of linoleic acid metabolism (LAM), unsaturated fatty acid biosynthesis (BUFA), fatty acid biosynthesis (FAB), cutin, suberin and wax biosynthesis (CSWB), brassinosteroid biosynthesis (BrB), fatty acid elongation (FAE), fatty acid degradation and alpha-linolenic acid metabolism (aLAM). The transcriptomic approach through qRT-PCR showed that the genes, MAPK (1-7), PR (PR1, PR2, PR3, PR9) and PI I were induced. Finally, HPLC-MS analysis showed a very significant accumulation of the phytohormones tZ and GA4. On the other hand, there was a highly significant reduction of IAA and DHZ synthesis and a moderately significant reduction of GA1 and SA. No significant effect was found on the synthesis of JA, ABA and iP. PCA and heatmap analysis revealed that the strains that positively induced various plant growth and defense dependent parameters were *D. salina*, *Porphordium* sp and *P. tricornutum*. These results show that microalgal polysaccharides open new perspectives for the development of biostimulants and bioelicitors of natural origin for the stimulation of growth and the induction of plant defense.

Keywords : Microalgae, Polysaccharides; *S. lycopersicum* L (tomato), Stress, Biostimulants, Bioelicitors; Metabolomics; Transcriptomics; Plant Growth and Defense.