HAL
open science

Stimulation de la germination des graines et de la croissance des plantes par plasmas froids à la pression atmosphérique

Maxime Bafoil

To cite this version:

Maxime Bafoil. Stimulation de la germination des graines et de la croissance des plantes par plasmas froids à la pression atmosphérique. Physique des plasmas [physics.plasm-ph]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30208 . tel-03193982

HAL Id: tel-03193982

https://theses.hal.science/tel-03193982v1

Submitted on 9 Apr 2021

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

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

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Maxime BAFOIL

Le 2 Novembre 2020

Stimulation de la germination des graines et de la croissance des plantes par plasmas froids à la pression atmosphérique

---

École doctorale : **GEET - Génie Électrique Électronique et Télécommunications : du système au nanosystème**

Spécialité : **Ingénierie des Plasmas**

Unité de recherche :
LAPLACE - Laboratoire PLAsma et Conversion d'Énergie - CNRS-UPS-INPT

Thèse dirigée par
Mohammed YOUSFI et Christophe DUNAND

Jury
Mme Farzaneh AREFI KHONSARI, Rapporteure
M. Loïc RAJJOU, Rapporteur
M. Thierry DUFOUR, Examinateur
M. Nofel Merbahi, Examinateur et Président du Jury
M. Mohammed YOUSFI, Directeur de thèse
M. Christophe DUNAND, Co-directeur de thèse

The real violence, the violence that I realized was unforgivable, is the violence that we do to ourselves, when we're too afraid to be who we really are

Nomi Marks

Remerciements :

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement tous les membres de mon jury qui ont lu et examiner mon travail de thèse. Merci à Mme Arefi Khonsari et Mr Rajjou d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse. Merci à Mr Dufour d'avoir examiné ma thèse et merci à lui de tous les échanges que nous avons eu pendant la soutenance ou pendant le congrès ou nous nous sommes rencontrés. Merci à Nofel d'avoir accepté la présidence de mon Jury. Merci à toi pour ton aide sur mes manip physique et merci pour ta franchise et ton honnêteté merci pour ton côté humain en fait !

Cette thèse a été réalisée en collaboration entre deux laboratoires le Laplace et le LRSV et de ce fait je remercie Mohammed et Christophe mes directeurs de m'avoir accueilli au sein de leurs équipes encore deux ans de plus pour mener à bien ce doctorat.

Merci à Mohammed pour toutes les connaissances et tout le suivi effectué sur mon travail, merci aussi pour votre bonne humeur à toute épreuve ainsi que vos blagues pour détendre entre deux expériences. Merci pour m'avoir si souvent pousser à donner le meilleur et merci pour le soutien dans les périodes difficiles. Peut-être un jour je réussirai à dire « tu » comme la totalité du Laplace.
Merci également à Christophe, pour ta patiente impressionnante et tes nombreuses connaissances. Merci pour les chouquettes les chocolatines et les petites pâtisseries que tu amènes souvent. J'ai beaucoup appris sur ton côté humain en plus de ton côté scientifique et j'en suis ravi.

Merci à Vincent Burlat pour ses questions épineuses mais très instructives ainsi tous ses conseils sur mes expériences et pour ses connaissances qui sont quelque peu empiriques pour certaines. Merci à Elisabeth Jamet pour tous ses conseils que ça soit sur le travail ou sur le personnel. Merci à tous les permanents des équipes Paroi et Pérox pour leur aide. Merci à Fabien Mounet qui m'a permis de faire de l'enseignement et j'ai beaucoup apprécié.

Merci à Aurélie Le Ru pour ces après-midis entières passées à mettre au point un protocole pour trouver les « points-points », pour essayer de faire des gouttes de plus en plus petites. Je ne sais pas si tu me détestes ou m'adores pour te pousser dans tes retranchements mais on est par là. Et évidemment Merci pour ton répertoire musical que je qualifierai de personnel haha

Je remercie toute l'équipe du LaPlace2B avec qui j'ai passé de très bons moments et des longs fous rires. Je les remercie de m'avoir intégré il y a 4 ans maintenant au sein d'une équipe déjà bien soudée. Et l'équipe continue à s'agrandir et à s'entretenir même si la plupart ne sont plus au labo (Bravo aux Dr de l'équipe voir même Dr^2 pour un particulier) et ça c'est super !! J'ai hâte de refaire les soirées qui nous définissent bien avec des gaufres et de la bière évidement. Je ne sais pas si je remercie Tristan d'avoir tué toutes mes plantes mais sinon merci à Julien, Valentin, Nicolas, Julie, Cyril, Farah, Jérémie, AurélieS, Marjo et Maxime bien sûr.

Merci à toute l'équipe de MT180, j'ai découvert de superbes personnes et une super ambiance qui m'a fait une super pause de bonne humeur pendant la thèse.

Merci à l'équipe de l'Adel, l'ancienne de m'avoir choisi, la mienne pour toutes ces « réunions » et la suivante portée par Valentin et bien Bon courage !

Une mention particulière à Mademoiselle **Elena Griseti** que j'ai appris à découvrir de plus en plus toutes ces années et avec qui je me suis lié d'une profonde amitié.

Durant cette thèse j'ai une nouvelle fois partagé le bureau avec Sébastien Viudes, les brainstormings autant que les décompressions de fins de journée ont été très appréciés. On a encore pu poursuivre la connaissance l'un de l'autre que l'on a initié il y a déjà quelques années sur les bancs de la Fac (ça passe vite !!). J'ai découvert Ali ElJebbawi qui a commencé en même temps que moi, merci pour sa bonne humeur et pour ses délicieux gâteaux. Merci à Bastien Dauphin pour ses connaissances sur à peu près tous les sujets du monde. Merci également à Duchesse Mbadinga Mbadinga qui a su me donner des conseils sur les analyses de mes résultats mais aussi et sur les analyses des différents potins très souvent en compagnie de Camille bien évidemment.

Merci à Jean que j'ai découvert pendant cette thèse pendant les journées de labo mais aussi pendant les longues soirées de jeux. Merci à Salimata pour toute sa patience pendant mes manips ! Merci à Niniche, Julie, Simon, Mélanie, Kaka, Arthur, Ines, Yvan, Maria, Léa, Marion, Cyril, Quentin et tous les autres pour les sourires, les rires & les anecdotes …

Je ne peux terminer les personnes rencontrées au sein des laboratoires que par mes trois acolytes **Charlène, Nicolas et Nathanaël** ! On a partagé de très nombreuses soirées ensemble de très importants fous rires et beaucoup d'histoires et de souvenirs (la fête de la musique qui a marqué un tournant dans notre amitié haha). Je suis heureux de les compter parmi mes Amis et ce n'est que le début !

Enfin je remercie **La Team** ! Plus de 10 ans d'amitié (23 pour Don Toto) fêtés l'an dernier et c'est pas terminé ! Merci de m'avoir écouté et remonté le moral parfois. Merci pour la belote, le tarot, le tariquet, la festa, les karaokés et tout le reste !! Une mention à Mr Titouan Delepaux qui a relu cette thèse pendant ses vacances et à Céline qui m'a relu plusieurs fois grâce à son anglais bien parfait !

Plus que des Amis, des Frères et des Sœurs de cœur, même si on peut rarement être tous présents en même temps à cause de nos emplois du temps de ministre ou d'un océan on est et on restera une grande Famille.

Merci à toute ma famille pour leur soutien

Enfin Merci à mes Parents, *Florence et Michel*, que j'ai saoulé pendant beaucoup trop de repas à parler de mes expériences et de mes graines. Merci d'avoir lu et relu, écouté et ré-écouté mes présentations. Juste Merci !

Bonne lecture

Table des matières

Table des figures 3

Tables des abréviations 7

Résumé 9

Introduction générale 11

Chapitre I Contexte de l'étude et état de l'art 17

I.1 Introduction 17

I.2 Germination des graines et croissance 17

I.2.1 La graine, une révolution évolutive 17

I.2.2 La germination 20

I.2.3 Les espèces réactives et les plantes 25

I.3 Aperçu sur les plasmas 26

I.4 Avancées et état de la recherche 28

I.4.1 Les différents dispositifs plasma 28

I.4.2 Les effets des plasmas sur la germination 35

I.4.3 Le plasma et le développement des plantes 38

I.4.4 Les effets du plasma sur la surface des graines 41

I.4.5 La décontamination par plasma 42

I.5 Conclusion 45

Chapitre II Matériels et méthodes 47

II.1 Introduction 47

II.2 Les dispositifs plasma 48

II.2.1. FE-DBD dans l'air ambiant 48

II.2.2 Jet DBD de plasma d'hélium dans l'air ambiant 49

II.2.3 Corona multi-pointes dans l'air ambiant 50

II.2.4 Alimentation électrique utilisée 51

II.2.5. Caractéristiques énergétiques et chimiques des plasmas utilisés 53

II.3 Le matériel biologique 59

II.3.1 *Arabidopsis thaliana* : une plante modèle 59

II.3.2 Autres graines d'intérêt agronomique étudiées 60

II.3.3 Traitement des graines 60

II.4 Les plans expérimentaux 61

II.4.1 Test de germination 61

II.4.2 La microscopie 62

II.4.3 L'analyse de la surface 63

II.4.4 Visualisation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'activité peroxydase 65

II.4.5 Le développement 65

II.4.6 Les analyses de l'eau activée par plasma 66

Chapitre III Résultats 69

III.1 Introduction 69

III.2 Les effets sur la germination 70

III.2.1. Col-0 le génotype de référence 70

III.2.2 Les effets sur les différents mutants 71

III.2.3 La résistance aux stress 73

III.2.4 La longévité des effets 77

III.3 Les effets sur la surface des graines 79

III.3.1 L'imagerie 79

III.3.2 La perméabilité des graines 83

III.3.3 Analyses des lipides de surface 85

III.3.4 L'effet des traitements sur le mucilage 86

III.3.5 Visualisation des ROS et de l'activité peroxydases 88

III.3.6 Étude sur la graine de *Camelina sativa* 89

III.4 Le développement des plantes 92

III.4.1 L'eau activée par plasma 92

III.4.2 Les différents effets sur le développement d'*Arabidopsis thaliana* 97

Chapitre IV Discussion, Conclusion et Perspectives 101

IV.1 Discussion 101

IV.2 Conclusion 107

IV.3 Perspectives 109

Références bibliographiques 113

Annexes 123

Table des figures

Figure 1 : Graphique de l'estimation de la population mondiale jusqu'en 2100. Extrait du rapport de décembre 2019 des Nations Unies 11

Chapitre I

Figure I-1 Schéma d'une graine mature d'A. thaliana. Les principaux tissus constituant la graine sont représentés. Schéma extrait de Belmonte et al. [13] 18

Figure I-2 : Photographie au microscope électronique à balayage (c) et dessin de coupe longitudinale (d) de graine de cactacées Tephrocactus ecoriensis. Pointillé : tissu funiculaire ; Hachuré : périsperme ; Noir : testa. Pour cette espèce, c'est le tissu funiculaire en pointillés qui va s'aplanir et s'étendre pour former une aile. Figure extraite de Bregman [18] 19

Figure I-3 : Photographie des fruits de saule et d'érable. Fruit de saule de Zeyher (Combretum zeyheri, A) ; Fruit d'érable argenté (Acer platanoides, B). Les photographies montrent les excroissances du péricarpe appelées « hélicoptères » qui sont importantes pour la dispersion des graines par anémochorie. Barres d'échelle = 5 cm en A et 1 cm en B. Photographies extraites de Crang [14] 19

Figure I-4 : Graphique de l'évolution du nombre d'articles avec les mots-clés « germination » et « plant ». Les données sont recueillies sur le serveur de Web of science. 20

Figure I-5 : Photographie d'une plante entière d'A. thaliana pendant la floraison. 21

Figure I-6 : Schéma simplifié du contrôle de la germination. Les flèches vertes représentent un contrôle positif et les rouges un contrôle négatif ou une inhibition. GA : Acide gibbérellique ; ABA : Acide abscissique ; NO_3^- : Nitrate. Adapté de Shu et al. [29] et Kucera et al. [30] 22

Figure I-7 : Les états de la matière. L'ajout d'énergie (thermique, électrique, ...) permet le passage d'un état le plus stable (solide) vers un état le plus instable (plasma). Les billes bleues représentent des molécules (ou atomes dans le cas des gaz rares) 26

Figure I-8 Schéma du dispositif « Diffuse Coplanar Surface Barrier Discharge » (Stolarik et al., 2015). La décharge plasma se produit ici à la surface du dispositif où les graines sont placées. Les électrodes noyées dans le diélectrique se trouvant dans la partie inférieure sont alternativement reliées à la haute tension (HT ou HV) et à la masse à la manière d'un peigne. Ce réseau d'électrodes est ensuite recouvert d'un autre diélectrique d'une faible épaisseur (<1mm) à la surface duquel un plasma est directement formé dans l'air ambiant. 32

Figure I-9 : Schéma du dispositif plasma adapté de Ahn et al. 2019 (A). Schéma du dispositif plasma adapté de Butscher et al. 2016 (B). Les deux schémas montrent le fonctionnement d'un dispositif plasma de type DBD. La décharge plasma se fait à partir de l'électrode qui est au-dessus et reliée à la haute tension et celle du bas reliée à la masse. Afin d'éviter la formation d'arcs électriques et permettre l'allumage du plasma, les électrodes sont toutes les deux recouvertes d'un matériau diélectrique. 33

Figure I-10 Schéma du jet plasma adapté de Fadhlalmawla et al., 2019. Le principe du jet plasma est similaire à celui de la DBD cependant ici le gaz plasmagène est ionisé entre les électrodes se trouvant à l'intérieur du tube de quartz avant d'en être éjecté à l'extérieur du tube pour être utilisé pour le traitement des graines. Grâce au flux de gaz, on peut observer une plume plasma qui vient au contact des graines. 33

Figure I-11 Schéma du dispositif de l'étude de Kučerová en 2019 servant l'activation de l'eau. Ce dispositif est basé sur un appareil de Type DBD mais l'échantillon traité est ici de l'eau. L'électrode, présente au fond d'une gouttière va permettre à l'eau d'être traitée à son passage. De plus, une pompe permet de fermer le circuit d'eau afin de contrôler le nombre de passage sous le plasma. 34

Figure I-12 Histogramme du pourcentage de germination du blé pour 1 jour et 4 jours après différents traitements plasma. Quatre gaz ont été utilisés pour générer le plasma.CK : contrôle sans plasma. Adapté de la figure 4 de Meng et al., 2017 [79] 36

Figure I-13 : Diagramme de la longueur moyenne des tiges de radis (Raphanus sativus) après 5, 7 et 9 jours en fonction de différents traitements plasma utilisant l'eau activée par plasma (PAW). Digramme adapté de (Sivachandiran & Khacef 2017). TW : Eau du robinet, PAW : eau activée par plasma pendant 15 ou 30 min, P10 et P20 : graines traitées par plasma pendant 10 et 20 min. 39

Figure I-14 Courbe de l'angle de contact (WCA) en fonction du temps de traitement au plasma sur des graines de Zea mays. [83] 41

Figure I-15 : Photo du test d'angle de contact. Figure extraite de Dobrin et al., 2015 [4]. a : surface de graine témoin ; b : surface de graine traitée au plasma 42

Chapitre II

Figure II-1 : Schéma du dispositif plasma de décharge de barrière diélectrique (DBD) dans l'air ambiant. [89]... 48

Figure II-2: Schéma du dispositif de jet de plasma d'hélium. Adapté de Bafoil et al, 2018 [90]. Le gaz injecté dans le dispositif, ici l'hélium, est ionisé grâce aux électrodes et passe de l'état gazeux (en bleu) à l'état plasma (en violet). 49

Figure II-3 : Schéma du dispositif de décharge corona. Les quatre pointes en tungstène vont ioniser+ l'air ambiant et créer une forme de pyramide de plasma (zone violette). 50

Figure II-4 : Courant et tension instantanés de la décharge DBD dans l'hélium générant le jet de plasma. À noter que le courant inclut aussi le courant de déplacement (première bosse lors de la montée) issue de [65] 52

Figure II-5A : Tension pulsée et courant instantané mesurés sur le dispositif FE-DBD.... 54

Chapitre III

Figure III-1: Effet du traitement direct et indirect au plasma sur la germination des graines d'A. thaliana. Les boxplots montrent les effets des différents traitements sur la rupture du testa. Les observations sont faites sur quatre différents réplicas à t0 + 24h. Six cents graines comptées pour chaque répétition. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour la significativité entre les moyennes, la p-valeur est : .= 0,1 ; *= 0,05 ; ** = 0,005 ; *** = 0,002. 71

Figure III-2 : Effet du traitement au plasma d'air par la FE-DBD sur la rupture du testa de graines d'A. thaliana en fonction du temps. Les courbes rouges représentent les graines traitées au plasma et les bleues les contrôles. L'effet du plasma sur la rupture du testa est toujours positif excepté sur gpat5. Les premières observations sont réalisées 24 h après mise en germination qui arrive le même jour que le traitement au plasma. 72

Figure III-3 : Le traitement au plasma a un effet opposé sur la germination des graines d'A. thaliana Col-0, et des mutants gl2 et gpat5 en condition saline. La rupture du testa a été évaluée en fonction du temps et des différents génotypes. Les courbes bleues représentent les graines témoins et les rouges les graines traitées au plasma. Col-0 (A, B, C); gl2 (D, E, F); gpat5 (G, H, I). Trois conditions de germination différentes ont été testées : contrôle sans NaCl (A, D, G, J) ; 25 mM de NaCl (B, E, H, K) ; 50 mM de NaCl (C, F, I, L). En raison de l'absence de germination avec une concentration en NaCl supérieure à 50 mM, le pourcentage de rupture du testa obtenu n'est pas indiqué. Les diagrammes en bâton représentent l'effet du plasma sur la rupture du testa par rapport à celui du contrôle (J, K, L). 75

Figure III-4 : Le traitement au plasma a un effet opposé sur la germination des graines d'A. Thaliana Col-0, et des mutants gl2 et gpat5 dans des conditions de stress osmotiques. La rupture du testa a été évaluée en fonction du temps et des différents génotypes. Les courbes bleues représentent les graines témoins et les rouges les graines traitées au plasma. Col-0 (A, B, C); gl2 (D, E, F); gpat5 (G, H, I). Trois conditions de germination différentes ont été testées : contrôle sans PEG (A, D, G, J) ; 2,5 % de PEG (B, E, H, K) ; 5 % de PEG (C, F, I, L). En raison de l'absence de germination avec une teneur en PEG supérieure à 5 %, le pourcentage de rupture du testa obtenu n'est pas indiqué. Les diagrammes en bâton représentent l'effet du plasma sur la rupture du testa par rapport à celui du contrôle (J, K, L). 76

Figure III-5 : Longévité de la stimulation de la germination de graines d'A. thaliana après traitement par plasma d'air. Boxplots du pourcentage de la rupture du testa en fonction du traitement à différents temps ti après traitement (A). Les observations sont faites 24 h après imbibition. Boxplots du pourcentage de la rupture du testa en fonction du traitement à différents temps ti après traitement (B). Les observations sont faites 40 h après imbibition. Boxplots du pourcentage de rupture de l'endosperme en fonction du temps de latence après le traitement (observations à 40 h) (C). L'axe x représente le temps de mise en germination (t0, t2, t7, t9) et le traitement, C pour contrôle et P pour traiter au plasma. Six cents graines comptées pour chaque répétition. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour la significativité entre les moyennes, la p-valeurest : .= 0,1 ; *= 0,05 ; ** = 0,005 ; *** = 0,002. 78

Figure III-6 : Photos de graines d'A. thaliana au microscope électronique à balayage. Graines contrôles (A, C et E) et graines traitées avec la FE-DBD (B, D et F). L'échelle est 100 µm pour la graine entière (A et B), 50 µm pour le zoom sur le manteau (C et D), et 10 µm pour la columelle (E et F). 80

Figure III-7 : Effets du plasma basse température sur la surface des graines d'A. thaliana. Columelle des graines d'A. thaliana Col-0 avec (1) ou sans (2) traitement au plasma, observée au microscope électronique à balayage (A). Observations de graines de Col-0 et des mutants gl2 et gpat5 d'A. thaliana au microscope confocal (10X zoom x9) avec ou sans traitement au plasma (B). Les graines sont préalablement colorées dans de l'auramine-O. Laser d'excitation fixé à 488 nm, réflexion : 484-494 nm (gris), fluorescence : 505-560 nm (vert) et 572-642 nm (rouge). La case en bas à droite correspond à la fusion de trois images. 82

Figure III-8: Le traitement avec le plasma d'air modifie la perméabilité des graines d'A. thaliana. Scan des trois génotypes d'Arabidopsis (Col-0, gl2, gpat5) avec ou sans traitement au plasma (A). Les graines ont été incubées pendant 48 h dans du rouge de tétrazolium. Boxplots de l'absorbance de broyat de graines incubées dans du rouge de tétrazolium en fonction du traitement (C : contrôle ; T : traitées au plasma d'air avec la FE-DBD) (B). Trois réplicas de 100 µg de graines pour chaque génotypes et traitement ont été fait. 83

Figure III-9 : Analyse lipidique des résidus de surface des graines d'A. thaliana traitées au plasma. Le traitement au plasma diminue fortement la quantité des acides gras simples présents sur la surface des graines après le traitement direct au plasma d'air. La courbe rouge correspond à l'extrait provenant de graines traitées et la courbe bleue de graines contrôles. 85

Figure III-10 : Aspect du mucilage adhérent d'A. thaliana avec ou sans traitement au plasma. Photographies au microscope optique du mucilage adhérent de graines d'A. thaliana colorées au rouge de ruthénium 0,02 %. 100 graines de chaque génotype et traitement sont colorées et observées au microscope. 87

Figure III-11 : Boxplot de l'aire du mucilage en fonction du génotype et du traitement plasma avec la FE-DBD. L'aire du mucilage, mesurée en μm^2 est quantifiée grâce à une analyse d'image de graines colorées au rouge de ruthénium. 88

Figure III-12 : Photos de graines d'A. thaliana, Activité des peroxydases de classe III et détection des ROS. L'activité peroxydase est détecté grâce au guaïacol (A & B). La présence de l'ion superoxyde $O2^{-}$ est observée avec du NBT (C & D). Graines contrôles (A & C) et graines traitées (B & D). L'intensité de la coloration apparait identique au même niveau de germination. 89

Figure III-13 : Le traitement au plasma diminue l'angle de contact des graines de Camelina sativa. Photos des graines de C. sativa après dépôt de la goutte de 0.3 µL. Graine contrôle (A), ou traitée grâce à la FE-DBD pendant 15 min (B). Schéma du calcul de l'angle de contact α (C). Violin plot des mesures d'angles de contact sur 30 graines par traitement (D). 90

Figure III-14 : Diagramme en bâton de l'absorbance du broyat de graines de C. sativa incubées pendant 40 h dans une solution de 1% de sel de tétrazolium en fonction du traitement. La barre bleue représente l'absorbance des lots de graines contrôles et la rouge de graines traitées à la FE-DBD pendant 15 min. l'expérimentation a été réalisé sur 30 graines et répétées 3 fois. 91

Figure III-15 : Courbe de l'évolution de la concentration en ammonium et nitrates en fonction du temps et du stockage dans l'eau du robinet activée par plasma PAW_{Tap}. 96

Figure III-16 : Courbe des concentrations en ammonium et nitrate en fonction du temps d'exposition au jet de plasma d'hélium dans l'eau activée par plasma PAW_{Tap}. La courbe verte représente la concentration en NO_3^- et la courbe rose la concentration en NH_4^+ en $mg.L^{-1}$. 96

Figure III-17 : Évolution des différents caractères de la plante pendant son développement en fonction du temps utilisant de l'eau du robinet (Watertap) ou de l'eau du robinet activé par jet de plasma d'hélium (PAWtap). Nombre de feuilles en fonction de l'âge de la plante et du traitement (A); Diamètre de la rosette (B); Aire des feuilles (C); Nombre total de plante en floraison (D). Photos de deux plantes d'A. thaliana à 28 jours de développement (E & F), la photo du haut correspond à une plante arrosée avec du PAW et celle du bas contrôle (arrosée avec de l'eau du robinet) Le test de Wilcoxon a été utilisé pour la significativité entre les moyennes, la p-valeurest : • = 0,1; *=0,05 ; **=0,005 ; ***=0,002. 98

Chapitre IV

Figure IV-1 : Modulation de l'effet du temps de traitement par la Corona sur la germination de Linum usitatissimum. Courbe des pourcentages de rupture du testa (A) et de l'endosperme (B) sur des graines de Linum usitatissimum en fonction du temps après leur imbibition. Les graines ont subi un traitement au système Corona (10k V, 10 kHz). Chaque courbe représente un temps de traitement différent. Chaque point est le résultat d'un comptage de 90 graines. 110

Tables des abréviations

ABA	Acide abscissique	Ar	Argon
AC	Courant alternatif	$CaCO_3$	Carbonate de Calcium
ADN	Acide désoxyribonucléique	H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
CAT	Catalase	He	Hélium
DC	Courant continu	N_2	Azote
Class III Prx	Peroxydase de classe III	NaCl	Chlorure de sodium
DCSBD	Diffuse Coplanar Surface Barrier Discharge	NH_4^+	Ammonium
DO	Densité optique	NO_2^-	Nitrite
ER	Rupture de l'endosperme	NO_3^-	Nitrate
FE-DBD	Décharge à barrière diélectrique à électrode flottante	O_2	Oxygène
GA	Acide gibbérellique	$O_2^{\cdot-}$	Ion superoxyde
HV	Haute tension	PEG	Polyéthylène glycol
LTP	Plasma basse température		
MEB	Microscope électronique à balayage	K	Kelvin
MW	Micro-onde	A	Ampère
PAW	Eau activée par plasma	CFU	Unité formant colonie
Prx	Peroxydase	eV	Electron volt
RF	Radiofréquence	E	Einstein
RONS	Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote	Hz	Hertz
SOD	Superoxyde dismutase	M	Molaire
TR	Rupture du testa	Pa	Pascal
UV	Ultraviolets	T	Torr
WCA	Angle de contact	V	Volt
		W	Watt

Résumé

Ces travaux s'inscrivent à la convergence des domaines de la physique des plasmas et de la biologie végétale. L'objectif de cette thèse est de contribuer à apporter des éléments de réponses quant aux mécanismes impliqués dans les effets des plasmas froids à pression atmosphérique sur la germination des graines et le développement des plantes.

La plante modèle en biologie végétale *Arabidopsis thaliana* est en grande partie utilisée ; en considérant le génotype de référence Col-0 et deux mutants présentant un défaut de synthèse de la couche externe imperméable de la graine (*gl2* et *gpat5*) afin de mieux mettre en évidence l'effet du plasma notamment sur les stress osmotiques et salins. Pour le traitement direct des graines afin de favoriser la germination, les plasmas d'air générés par décharges à barrières diélectriques à électrode flottante (FE-DBD) sont utilisés. Le traitement indirect, servant à la stimulation de la croissance de la plante, utilise l'eau activée par plasma (PAW) grâce aux jets DBD de plasma d'hélium.

Les résultats montrent un effet positif du traitement au plasma généré dans l'air ambiant par le dispositif FE-DBD et également par un dispositif corona multi-pointes. Ces traitements directs des graines permettent une augmentation du taux de germination mais surtout une augmentation de la vitesse de germination. Une analyse de la perméabilité des graines a mis en évidence un changement à la surface des graines dû à un effet physique du plasma pouvant être qualifié de gravure de la surface. L'analyse des résidus de surface montre un changement en composition lipidique. Cela étant fortement corrélé avec la germination, ces résultats permettent la mise en évidence des pistes de compréhension des effets des plasmas sur la germination liée notamment aux changements de surface des graines.

Dans une seconde partie, le traitement indirect des plantes par le PAW a pour effet une augmentation significative de la vitesse de croissance. Le plasma créant en phase aqueuse un nombre certains d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (notamment des nitrates et de l'ammonium) qui agissent de façon synergique comme un engrais stimulant la croissance des plantes.

Mots clés

Plasma froid, Germination, *Arabidopsis thaliana*, Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, Plasma-agriculture, Développement des plantes

Introduction générale

Au premier janvier 2020 la Terre comptait déjà plus de 7,7 milliards d'individus. D'après les estimations les plus basses des Nations Unies (Figure 1), la population mondiale sera de plus de 9,4 milliards dans 30 ans [1].

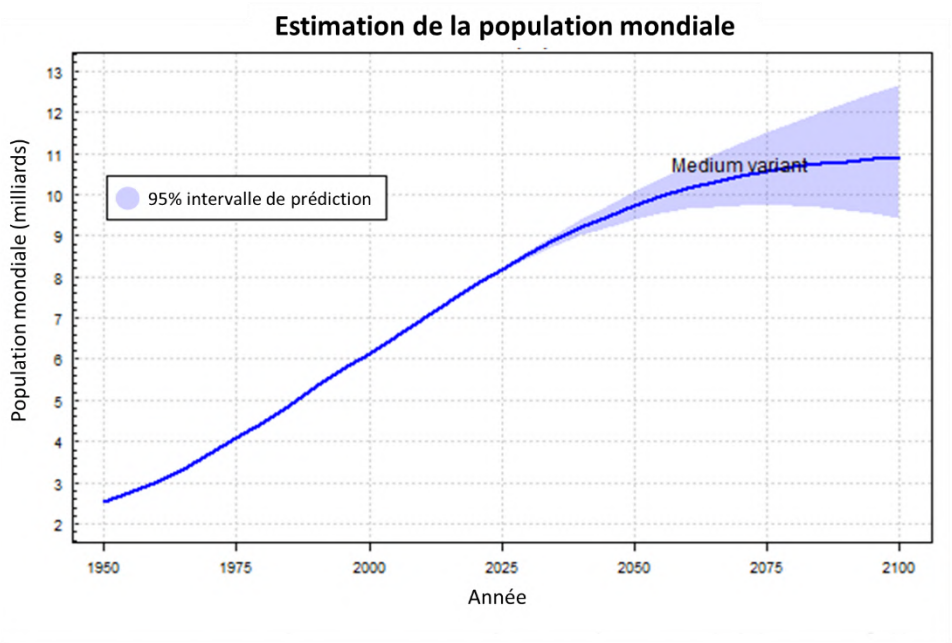


Figure 1 : Graphique de l'estimation de la population mondiale jusqu'en 2100. *Extrait du rapport de décembre 2019 des Nations Unies*

En l'état actuel, la demande alimentaire est déjà trop importante par rapport à la production [2]. En effet, chaque année, les habitants de notre planète consomment plus que la Terre ne peut produire en une année en termes de denrée alimentaires. Tous les ans, l'ONG Global Footprint Network définit « le Jour du dépassement » ou « Overshoot Day » en se basant sur plus de 3 millions de données statistiques de plus de 200 pays. En 2020, le jour du dépassement était estimé au 22 août, soit 2 mois plus tôt qu'il y a 20 ans. Face à l'augmentation de la demande, la production doit s'adapter et par conséquent, l'obtention, dans le domaine agricole, de rendements élevés associés à une réduction du gaspillage alimentaire sont essentielles.

Afin de répondre à ces exigences, il existe plusieurs options. La plus courante concerne l'utilisation de produits phytosanitaires pour augmenter le rendement des productions, des stimulants pour la vitesse de croissance ou encore des antifongiques ou divers pesticides pour éviter la fonte des semis. Cependant, dans le contexte actuel, un changement de conscience est également initié et le monde agricole se tourne vers des technologies plus respectueuses de l'environnement.

Les plasmas à basse température (LTP : Low-temperature plasma) se révèlent prometteurs en tant que technologies vertes pour l'amélioration de la productivité des plantes. Le plasma est l'état de la matière le moins connu et, paradoxalement, le plus répandu puisqu'il compose plus de 99% de l'univers visible. Cet état de plasma est constitué d'un gaz ionisé qui va influencer ou réagir avec son environnement.

Dans le domaine des plasmas hors équilibre, les recherches sont nombreuses aussi bien sur le plan fondamental pour mieux connaitre ses propriétés que sur le plan appliqué à travers des applications très variées allant de la micro/nano-électronique et de la propulsion spatiale à la biologie et la médecine. Depuis près de trente ans, le thème de « plasma-agriculture » a émergé [3] et c'est dans ce domaine que s'inscrit cette thèse.

Dans ce domaine, un des principaux intérêts consiste à utiliser les LTP pour le traitement de graines afin d'augmenter la germination sans utilisation d'engrais chimiques [4]. Cet aspect a été étudié depuis la fin du 20ème siècle sur un certain nombre de graines [5]. Néanmoins, la plupart de ces travaux sont pour l'instant surtout descriptifs quant aux effets des différents plasmas sur les différentes graines [6, 7]. Le travail effectué pendant cette thèse vise à apporter une contribution pour obtenir des réponses plus précises sur les effets du plasma sur la germination et le développement des plantes.

Durant cette thèse, à travers l'application de la technologie des plasmas froids hors équilibre sur les graines et plus particulièrement sur les graines de la plante *Arabidopsis thaliana*, des pistes pour la compréhension des mécanismes qui entrent en jeu dans la réponse des plantes aux traitements par LTP, et notamment sur la germination des graines et leur développement ont été étudiées. En d'autres termes, le but de ce travail est donc de mieux comprendre, en étudiant en particulier la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et en utilisant certains dispositifs plasmas déjà développés et caractérisés au laboratoire Laplace, les effets directs du plasma et indirects (*via* l'eau activée par plasma) sur la germination des graines et la croissance des plantes. Le choix d'*A. thaliana* s'est imposée pour cette thèse car c'est un modèle couramment utilisé en biologie végétale. Il possède un cycle de vie court (2 à 3 mois de graine à graine) ce qui est idéal pour la culture en laboratoire [8], la séquence de son génome est disponible depuis près de 20 ans [9] permettant l'accès à de nombreuses données ainsi qu'à des collections de mutants utiles pour mener à bien cette étude. De plus, tout en étant de petite taille (une trentaine de centimètres) cette plante a un rendement très important dans de bonnes conditions de culture, chaque silique contient de 30 à 50 graines sachant que la plante a plusieurs dizaines de silique. L'*A. thaliana* est donc une bonne graine candidate pour aider à mieux comprendre les

mécanismes induits par le traitement des graines par LTP (même si de tels mécanismes ne sont pas forcément les mêmes pour d'autres familles de graine), et de pouvoir dans un second temps transposer aux moins les méthodologies mises en œuvre dans ce travail et l'utilisation des plasmas sur des graines d'intérêt agronomique tels que le colza qui fait partie de la même famille des Brassicaceae.
Ce travail est issu d'une collaboration, commencée en 2014, entre deux laboratoires de l'université Paul Sabatier de Toulouse : le Laplace (Laboratoire de Plasma et Conversion d'Énergie) et le LRSV (Laboratoire de Recherches en Sciences Végétales).

Les recherches menées au Laplace, vont de l'étude des mécanismes physiques de conversion d'énergie jusqu'aux systèmes les utilisant. Les principaux domaines d'applications regroupent la production, le transport, la gestion, la conversion et l'usage de l'électricité. Une des activités de recherche de l'équipe PRHE (Plasma Réactifs Hors Équilibre) portent sur le développement et l'utilisation de dispositifs plasmas froids hors équilibre au service des applications bio-médicales et environnementales et leurs études fondamentales.

Le LRSV, rassemble à travers la FRAIB (Fédération de Recherche Agrobiosciences, Interactions et Biodiversité) les principales forces toulousaines de recherche dans les domaines de la Biologie, de la Microbiologie Végétale et de l'Écologie Moléculaire. L'équipe EEP (Évolution et Expression des Peroxydases) a pour thème de recherche principal l'étude des fonctions des peroxydases et leur évolution. Les peroxydases sont des enzymes universelles du monde vivant catalysant des réactions d'oxydo-réduction et contrôlant l'homéostasie des espèces réactives de l'oxygène.

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse sont déclinés en quatre chapitres.

Le premier chapitre donne le contexte de l'étude. Il sert à exposer certaines notions de biologie végétale en relation avec le projet de thèse. Il est centré sur l'étape clé du cycle de vie d'une plante, à savoir la germination. Les différents facteurs contrôlant la germination (conditions environnementales, hormones, …) mais aussi les espèces chimiques importantes dans cette étape et tout au long du développement de la plante sont abordés. Ce chapitre est également important pour définir ce qu'est le plasma. Les différents types de plasmas ainsi que leur formation en conditions contrôlés sont exposés. Par la suite, ce chapitre fait le point sur l'avancée des recherches dans le domaine de plasma-agriculture à travers une sélection de

travaux commencés depuis le brevet établi par Krapivina en 1994 [3] jusqu'aux résultats récemment obtenus. Ces explications sont nécessaires à la compréhension future des effets du plasma sur la germination des graines et la croissance des plantes ce qui est le principal but de ce travail.

Le deuxième chapitre est d'abord dédié à la description de différentes sources de plasma froid utilisées pour ces travaux (FE-DBD, jet DBD d'hélium et corona) avec leur alimentation haute tension impulsionnelle. On y trouve aussi la présentation du matériel biologique ainsi que la description des différentes expériences et les protocoles mis en œuvre durant cette thèse. Les différents traitements notamment pour l'activation de l'eau ainsi que les caractéristiques physiques associées y sont également décrites avec les plans expérimentaux utilisés dans ce travail.

Le troisième chapitre regroupe les résultats obtenus dans ce travail. Il présente en détails les différentes expériences menées et les résultats associés afin de comprendre les effets du traitement au LTP sur les graines et les plantes. Il débute par le développement des effets du traitement direct sur la germination et en déterminant quels plasmas et quels paramètres opératoires physiques doivent être appliqués pour avoir le meilleur effet positif sur la germination, c'est à dire un taux de germination plus élevé et une vitesse plus rapide. Le but ici est la mise au point d'un traitement efficace sur les graines d'une espèce d'intérêt afin de fixer les paramètres plasmas et d'essayer d'en comprendre les effets et les mécanismes plus en aval. Par la suite, des mutants d'*A. thaliana* sont utilisés pour comprendre au mieux les mécanismes mis en jeu suite au traitement plasma. Ces mutants sont sélectionnés pour leurs propriétés principalement axées sur la physionomie de la graine ce qui a pour but de faciliter la compréhension des effets du traitement à ce niveau-là. Plusieurs conditions de germination ont été testées, comme par exemple en présence de différents stress (salin et osmotique), afin d'observer les effets du traitement plasma sur la germination dans ces conditions extrêmes qu'on peut retrouver en milieu naturel. Les effets ont ensuite été caractérisés par plusieurs expériences, comme l'analyse de la surface des graines, de leur perméabilité et des lipides présents sur cette surface pour élargir le niveau de compréhension.
Dans un second volet de ce chapitre, le développement et la croissance des parties aériennes de plantes arrosées avec de l'eau activée par plasma ont été étudiés. Ceci est réalisé pour analyser l'effet indirect du plasma via cette eau activée.

Dans la dernière partie de ce chapitre, les principaux résultats de mon travail de thèse sont analysés et discutés et leur implication quant à l'utilisation future des plasmas pour améliorer le rendement de la germination des graines et la croissance des plantes est soulignée sont. Puis après avoir conclu sur l'ensemble de travaux effectués dans cette thèse, on présente les principales perspectives des sur la poursuite de l'étude des traitements plasmas sur *l'Arabidopsis thaliana* et d'autres graines modèles et d'intérêt agronomiques afin d'approfondir la compréhension des mécanismes activés par les plasmas. Les perspectives visent également la mise en place d'autres dispositifs de génération de plasma mieux adaptés sur une échelle plus grande aux traitements d'une plus grande quantité de graines et/ou des graines de plus grandes tailles.

Enfin, ce travail de thèse a donné lieu à deux publications publiées dans Plos One et dans Scientific Reports qui se trouveront en annexe de ce manuscrit.

Chapitre I Contexte de l'étude et état de l'art

I.1 Introduction

Comme déjà souligné dans l'introduction générale, ce travail de thèse concerne l'étude des effets du plasma hors équilibre sur la germination des graines et le développement des plantes. Ce chapitre est une introduction bibliographique de l'étude. Il sert à poser les bases et le contexte de la thèse.

En premier lieu, un aperçu sera donné dans le domaine de la biologie végétale et plus précisément sur la germination des graines en abordant notamment les notions principales qui nous serviront, dans les chapitres suivants, à l'analyse et la compréhension des effets du plasma sur la germination et la croissance.

Par la suite, le chapitre présentera les différents plasmas et leurs nombreuses utilisations.

Enfin, pour inscrire l'étude dans son contexte et par rapport aux principaux travaux déjà effectués dans le domaine, une synthèse sera faite sur l'état de l'art dans ce domaine plasma-agriculture concernant l'utilisation des plasmas froids pour stimuler la germination des graines et la croissance des plantes. L'accent sera mis sur les dispositifs plasmas utilisés, les graines étudiées et les principaux résultats déjà disponibles dans la littérature afin d'en souligner notamment les avantages et les lacunes. Dans le cas de cette revue bibliographique, nous commencerons par une sélection de travaux qui ont abordés l'effet des plasmas sur la germination, puis sur la croissance des plantes. Cela sera suivi par la description de quelques travaux sur la décontamination des graines pour supprimer les parasites et des travaux consacrés l'étude de l'effet des plasmas sur la surface des graines.

I.2 Germination des graines et croissance

I.2.1 La graine, une révolution évolutive

La graine, stade du cycle de vie végétal uniquement retrouvé chez le groupe des spermatophytes composant 80% du règne végétal, incluant les angiospermes (ou plantes à fleurs) et les gymnospermes [10], est le résultat de la reproduction sexuée et de la fusion entre cellules reproductrices femelles (ovules) et males (grains de pollen).

L'apparition de la graine est considérée comme une innovation notable pour le règne végétal [11]. Le succès évolutif des spermatophytes repose en grande partie sur la durée très courte de la phase gamétophytique (c'est-à-dire qui produit les gamètes mâles et/ou femelles).

La graine est donc la structure de résistance puisqu'elle permet de protéger l'embryon avant d'entamer un nouveau cycle de vie pour la future plante [12].Pour cela, la graine est composée de plusieurs couches externes à l'embryon regroupées sous le terme de « manteau ». La couche la plus externe nommément le testa, est souvent pigmentée et inerte. Elle protège l'endosperme qui peut représenter une seule couche de cellule cher *A. thaliana* ou plusieurs de cellules de réserve chez le blé. Lors de la germination, la rupture de ces couches périphériques permet l'extrusion rapide de l'embryon turgescent et ensuite la germination de la graine (Figure I-1).

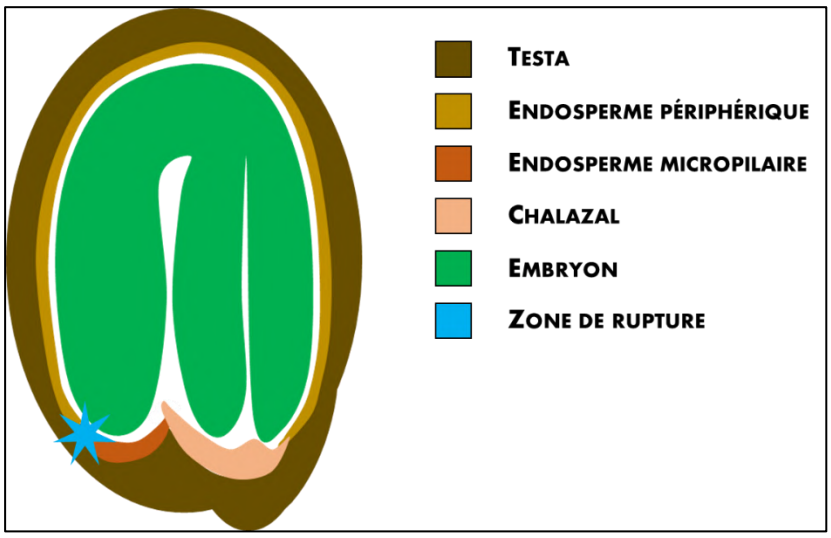


***Figure I-1 Schéma d'une graine mature d'*A. thaliana.** *Les principaux tissus constituant la graine sont représentés. Schéma extrait de Belmonte et al. [13]*

Les graines présentes une très large diversité de structure, morphologie, taille, couleurs…entre les différentes espèces des spermatophytes (diversité inter-spécifique) ainsi qu'une grande diversité au sein d'une même espèce (diversité intra-spécifique) cette diversité résulte de l'adaptation de cette structure à son environnement [14]. Ainsi, leur taille, leur poids, leur morphologie, leur composition et leur nombre peuvent varier d'un individu à l'autre, ou d'une année à l'autre pour un même individu [15]. La plus grosse graine est celle du *Lodoicea maldivica* mesurant jusqu'à 50 cm et pesant entre 20 et 25 kg en moyenne [16]. À l'opposé, la graine de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* fait environ 500 µm soit 1000 fois plus petite [17].

Un exemple d'adaptation est celui du mode de dispersion des graines, lequel peut s'effectuer par la gravité (barochorie), par l'eau (hydrochorie), par les animaux (zoochorie) ou en encore par le vent (anémochorie). Ce dernier moyen de dispersion repose sur la petite taille des graines et leur légèreté ceci souvent accompagnées d'adaptation morphologique telle que l'apparition d'une aile comme c'est le cas chez certains cactaceae et notamment chez *Tephrocactus ecoriensis* (Figure I-2)

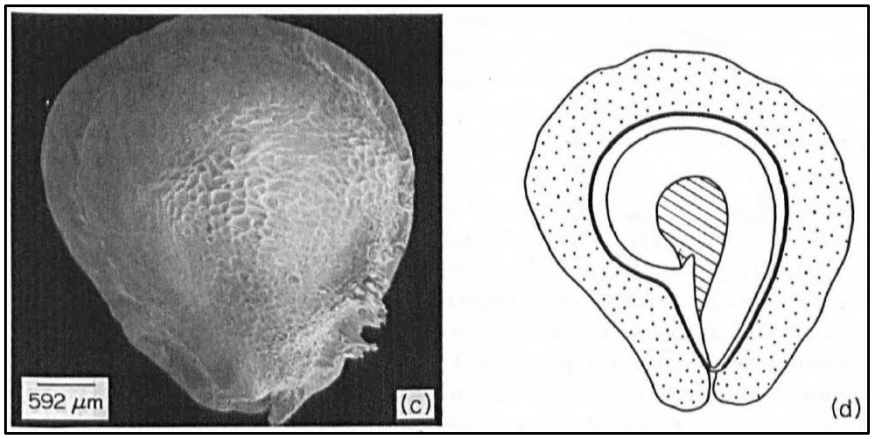


***Figure I-2 : Photographie au microscope électronique à balayage (c) et dessin de coupe longitudinale (d) de graine de cactacées* Tephrocactus ecoriensis.** *Pointillé : tissu funiculaire ; Hachuré : périsperme ; Noir : testa. Pour cette espèce, c'est le tissu funiculaire en pointillés qui va s'aplanir et s'étendre pour former une aile. Figure extraite de Bregman [18]*

On peut également retrouver le développement d'excroissance provenant du fruit (péricarpe) autour de la graine comme pour l'érable ou le saule (Figure I-3).

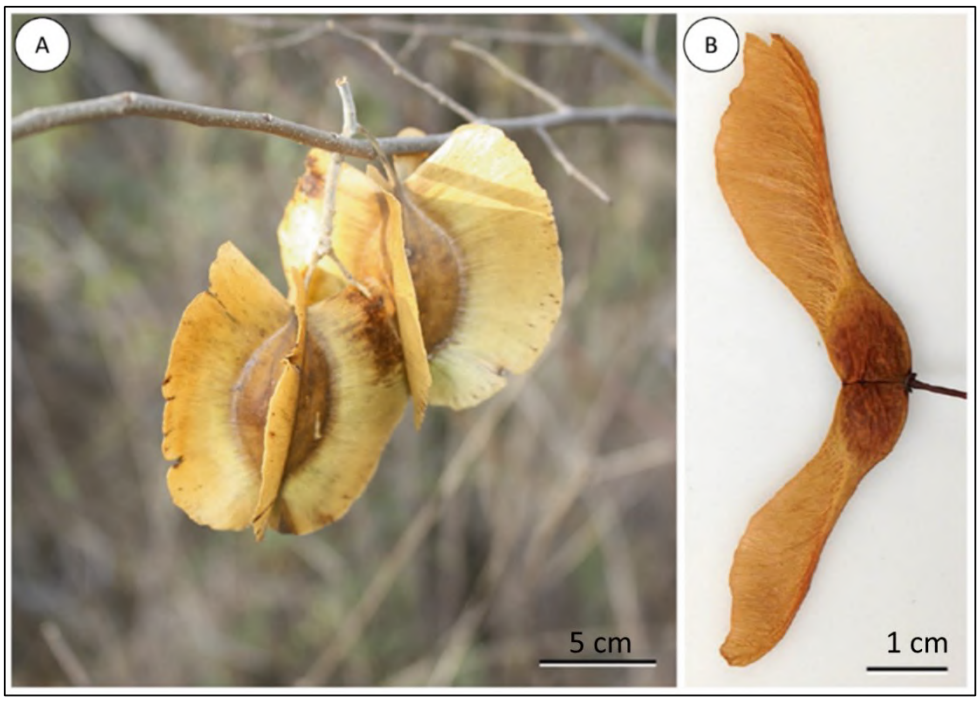


Figure I-3 : Photographie des fruits de saule et d'érable. Fruit de saule de Zeyher (*Combretum zeyheri*, A) ; Fruit d'érable argenté (*Acer platanoides*, B). *Les photographies montrent les excroissances du péricarpe appelées « hélicoptères » qui sont importantes pour la dispersion des graines par anémochorie. Barres d'échelle = 5 cm en A et 1 cm en B. Photographies extraites de Crang [14]*

Cette grande diversité structurelle induit de nombreuses spécificités comme la vitesse de germination ou en encore le temps de viabilité des graines. Néanmoins, un des points communs à toutes ces plantes est qu'un nouveau cycle débute toujours par l'étape de la germination. C'est sur cette étape de la vie des plantes qu'une grande partie de ce travail est centrée notamment pour essayer de comprendre les processus affectant la germination à l'aide du traitement plasma.

I.2.2 La germination

C'est une étape cruciale, en effet si la germination ne se passe pas dans des conditions optimales, la plante va tout simplement interrompre son cycle de vie. La germination est un phénomène extrêmement complexe, régulé par de nombreux signaux, à la fois endogènes et environnementaux, comme par exemple les balances hormonales ou le taux d'humidité ambiant [19]. C'est aussi son rôle clef et sa complexité qui attisent la curiosité des chercheurs et donne lieu à de nombreuses études sur le sujet (Figure I-4). Ces études cherchent principalement à étudier les effets de l'environnement sur la germination mais aussi à comprendre le rôle des gènes /protéines et des métabolites associés sur le contrôle de cette germination. De plus, la complexité de ce mécanisme n'est pas la même chez toutes les plantes, ce qui rend difficile la généralisation des recherches pour l'ensemble des spermatophytes. Néanmoins, la recherche fondamentale a permis de mettre en évidence le contrôle de la germination par des facteurs endogènes et exogènes à la graine et qui seront détaillés dans la suite de cette partie.

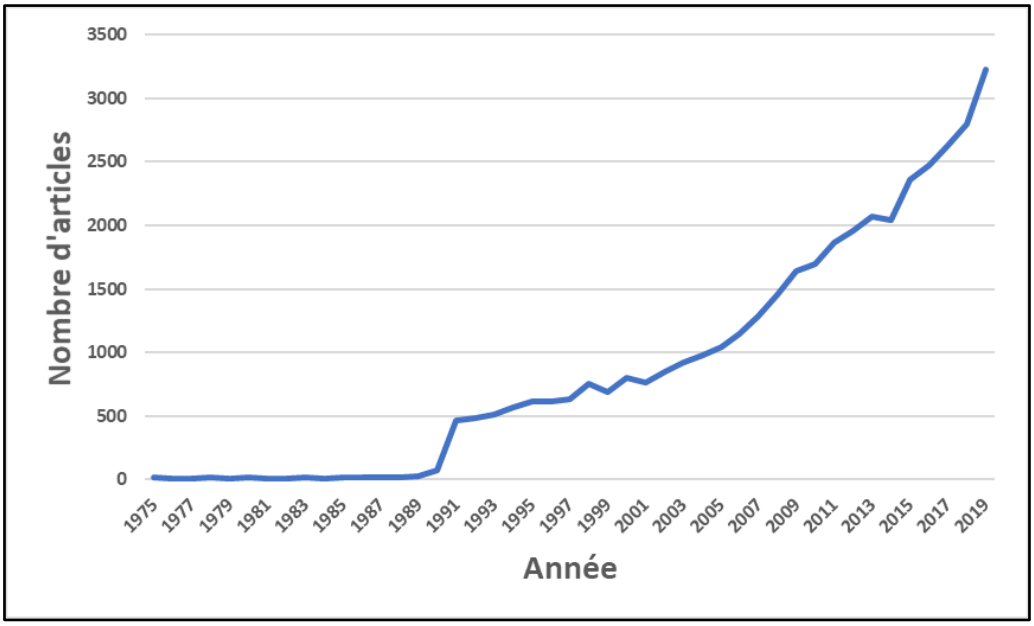


Figure I-4 : Graphique de l'évolution du nombre d'articles avec les mots-clés « germination » et « plant ». *Les données sont recueillies sur le serveur de Web of science.*

Dans cette étude, la plante modèle utilisée est *A. thaliana* [20] (Figure I-5). C'est une plante de la famille des Brassicaceae. Cette famille a la particularité de produire un grand nombre de graines par plante contenues dans une enveloppe spécifique nommée silique (Figure I-5). Cette plante développe une rosette de feuilles durant le stade végétatif. Ensuite, lorsque la floraison est initiée, une hampe florale apparait au centre de la rosette. Elle peut atteindre jusqu'à 40 cm et portera de nombreuses siliques sur la longueur des tiges principale et secondaires. De plus, les exigences de culture et la courte durée du cycle de vie (3 mois de graines à graines) de cette plante sont adaptées aux expérimentations de laboratoire tout comme sa taille qui reste petite même en floraison (entre 20 et 30 cm). Comme cela a déjà été signalé, il est également à noter que le génome de cette plante est entièrement séquencé et nous avons donc accès à de nombreux mutants permettant l'étude des différents acteurs moléculaires intervenant au cours de la germination [9]. Enfin, l'absence d'enjeux agronomiques directs pour cette plante permet d'éviter les conflits d'intérêt et donc une diffusion plus rapide des découvertes et des résultats au sein d'une très vaste communauté scientifique. La disponibilité des résultats des études ainsi que leur nombre a permis une grande connaissance de cette plante et cela en fait la plante modèle adéquate pour l'étude de l'effet d'un traitement au plasma sur la germination [21-23].

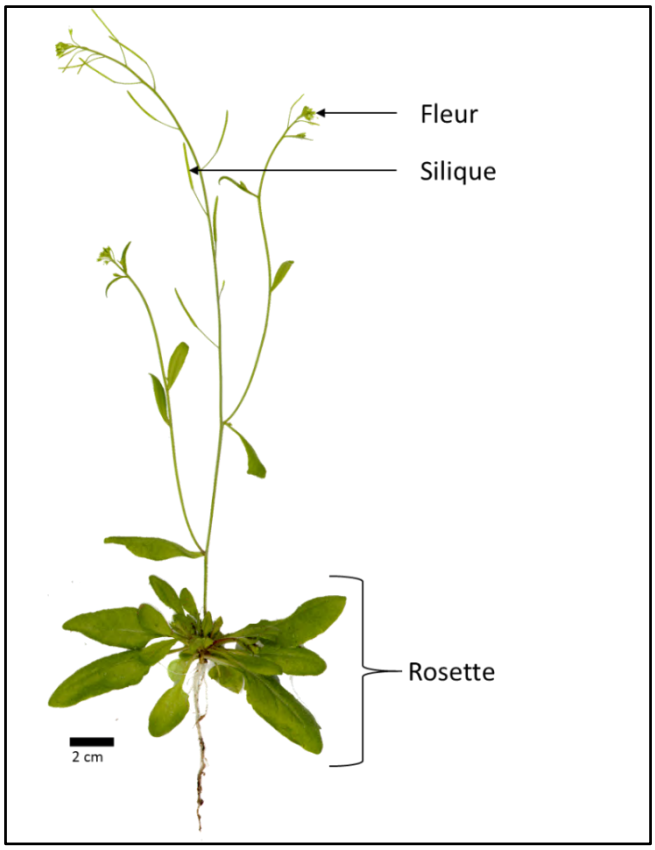


Figure I-5 : Photographie d'une plante entière d'*A. thaliana *pendant la floraison.

La germination commence avec l'absorption d'eau par la graine et le démarrage de l'activité cellulaire [24]. L'activité enzymatique associée à la pression exercée par l'embryon (turgescence des cellules) vont permettre la rupture des parois des cellules constituant les enveloppes (manteau : testa et endosperme) entourant l'embryon de la graine. Dans le cas d'*A. thaliana,* c'est grâce à la rupture de ces deux enveloppes et à la reprise de l'activité cellulaire (division et élongation) que la radicule peut émerger. Par la suite, on observe l'extension de l'hypocotyle conduisant à l'apparition et l'ouverture des cotylédons [25]. Il est a noté que ce scénario n'est pas le même pour toutes les espèces avec l'émergence des cotylédons en premier ou avec l'absence du développement du/des cotyledon(s) [26].
La vitesse de germination dépend des conditions environnementales directes de la graine mais aussi de sa taille et de sa composition [27]. Par exemple, chez C*ryptocarya alba* les graines les plus grosses germent plus rapidement [28]. Des facteurs internes tels que la dormance primaire entrent également en jeux.

La germination des graines est contrôlée par de nombreux mécanismes, dont certains sont explicités dans la suite de ce chapitre, et elle marque le début de la croissance et du développement de l'embryon, et à terme de la nouvelle plante (Figure I-6).

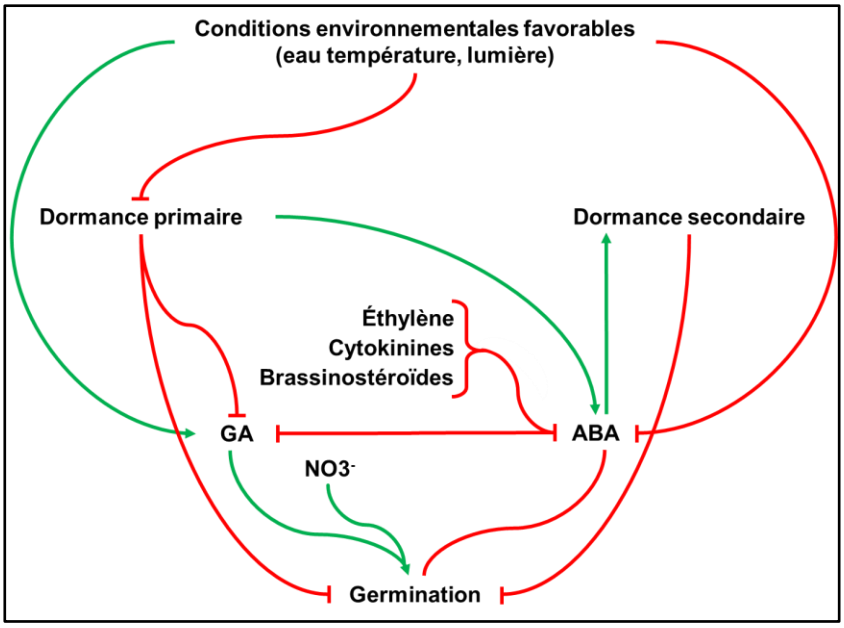


Figure I-6 : Schéma simplifié du contrôle de la germination. *Les flèches vertes représentent un contrôle positif et les rouges un contrôle négatif ou une inhibition. GA : Acide gibbérellique ; ABA : Acide abscissique ;* NO_3^- *: Nitrate. Adapté de Shu et al. [29] et Kucera et al. [30]*

En premier lieu, afin de pouvoir germer, la graine doit tout d'abord être mature. La maturation qui se produit à la fin du développement de la graine (embryogénèse) va entrainer, une inhibition du cycle cellulaire, une dessiccation des graines et une augmentation de la concentration en acide abscissique (ABA) qui va établir la dormance [31].

Si la graine a atteint sa maturation et, lorsque les conditions sont favorables, elle va pouvoir germer. Cependant, dans des conditions défavorables, certaines graines, comme *A. thaliana*, peuvent devenir dormantes (dormance secondaire) pour maintenir sa capacité de germination en attendant un moment plus propice. Il existe un certain nombre de facteurs contrôlant la germination et la dormance des graines, comme les hormones végétales (Figure I-6).

La dormance des graines est un mécanisme par lequel la germination est retardée. On peut trouver une dormance primaire qui se fait au cours de la maturation de la graine par l'augmentation du niveau d'ABA bloquant le développement cellulaire [25]. On peut aussi parfois trouver une dormance secondaire qui est en lien avec les facteurs extérieurs. En effet, la dormance secondaire est induite par des conditions environnementales directes non favorables (température trop basse par exemple), et va permettre à la graine de passer cette période sans démarrer le processus de germination [32].

En affectant l'équilibre hormonal de la graine, les paramètres environnementaux, comme la température et la lumière, peuvent influencer la germination des graines [33]. Si les conditions sont favorables la germination sera enclenchée et au contraire si certaines conditions ne sont pas présentes (faible humidité par exemple) la germination sera repoussée grâce à la dormance secondaire.

Le nitrate (NO_3^-) ainsi que les gibbérellines (GA) sont capables d'induire la germination des graines et de lever la dormance primaire [33]. Le NO_3^- peut agir comme une source d'azote et comme molécule signal capable d'inhiber par nitrosilation des protéines de la signalisation ABA dépendant comme ABI5 [34] et d'activer des protéines de synthèse du GA3 comme GA3ox [35]. Les gibbérellines nouvellement synthétiser vont améliorer la germination des graines en activant la transcription de gènes nécessaires au démarrage de la germination et en inhibant l'activité de l'ABA [36]. On peut donc dire que le ratio GA/ABA est essentiel pour le contrôle de la germination.

Cependant, les gibbérellines ne sont pas les seules hormones impliquées dans l'activation de la germination. L'éthylène, les cytokinines et les brassinostéroïdes, du fait de leurs interactions négative avec l'ABA, peuvent aussi réguler positivement le processus de germination des graines [30]. De plus les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (RONS) apparaissent comme étant indispensables à la germination. En effet, en dépit de leur caractère nocif dans certaines conditions (tout est question de dose), les RONS vont pouvoir participer au relâchement des parois et favoriser les ruptures du manteau de la graine permettant de ce fait la germination [37]. Mais aussi rôle de signalisation du fait de leur potentiel red-ox.

Les conditions environnementales ne peuvent être favorables que pendant une courte période, c'est pourquoi la vitesse et le taux de germination sont très importants pour la pérennité de l'espèce. L'optimisation de la germination va permettre à la graine de commencer sa croissance pendant le lapse de temps où les conditions sont favorables en puisant dans ces réserves et pour que la plantule devienne rapidement autotrophe (c'est-à-dire qu'elle va pouvoir produire toute la matière organique carbonée nécessaire grâce à la photosynthèse). Cette vitesse de germination permet aussi la mise en place rapide de défense contre les stress biotiques ou abiotiques. De plus cette vitesse de germination et l'autotrophie qui en dépend vont permettre l'établissement rapide de la plante et son bon développement et par conséquent une production de matière organique ainsi que de graines plus importante.

D'un point de vue agronomique, le taux de germination ainsi que l'état sanitaire des semences sont des facteurs importants pour la réussite des cultures.
En effet, en agronomie, le taux de germination est crucial pour la pérennité de l'activité agriculturale puisqu'un mauvais taux de germination devrait être pallié par une augmentation du nombre de graines semées et donc par un cout plus important. D'autre part, l'état sanitaire des semences est aussi capital ; des graines et par la suite des plantes qui peuvent être contaminées peuvent engendrer une perte de rendement ce qui nuit à la production de nourriture ou de matières premières. C'est dans ce but que des traitements phytosanitaires tels que des antifongiques ou des répulsifs contre des parasites par pulvérisation mais aussi par enrobage sont utilisés pour faciliter la manipulation
Depuis quelques années, les semenciers sont entrés dans une optique plus respectueuse de l'environnement pour réduire l'utilisation de certains produits phytosanitaires. En effet, il est possible de retrouver des traces de certains composants dans l'environnement (sol et organismes vivants) longtemps après leur utilisation et parfois éloigné de leur lieu d'utilisation [38].

C'est dans cette optique que des recherches avec l'utilisation des nouvelles technologies ont vu le jour et notamment le domaine du « plasma agriculture ». Ce domaine a été exploré dans le but d'améliorer et d'optimiser la production agricole. Cependant, à l'heure actuelle, les nombreuses recherches visent à comprendre les effets encore méconnus des traitements plasmas sur la germination des graines et leur croissance.

I.2.3 Les espèces réactives et les plantes

Un grand nombre de facteurs contrôle la germination, comme l'intensité et la qualité de la lumière ou la température [39, 40]. D'autres facteurs comme le taux d'espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote (RONS) ont également été identifiés comme des facteurs d'activation de la germination [41, 42].

Des molécules telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) sont produites par la plante de manière constitutive au cours de processus biologiques essentiels tels que la photosynthèse et la respiration ou dans d'autres mécanismes comme lors de la croissance racinaire [43]. Cependant, ces espèces réactives bien qu'essentielles peuvent avoir un effet « dose dépendant » sur le développement et le bon fonctionnement de la plante. Par exemple, en trop grande concentration, le pouvoir oxydant de ces espèces va être trop élevé et va alors entrainer un ralentissement de la croissance en affectant l'intégrité cellulaire [44]. Les plantes vont devoir allouer plus de ressources pour se protéger de ces effets néfastes au détriment du développement. En effet, le stress oxydatif produits par les RONS va entrainer de nombreuses réactions comme l'oxydation des phospholipides constituants de la membrane plasmique, de l'ADN, des protéines ou des polysaccharides de la paroi [45]. Au contraire, à concentration plus faible, les RONS auront un rôle de messagers secondaires au sein de la plante [46]. De plus, l'effet dose peut se percevoir quand les RONS sont présents même à faible dose mais de manière non contrôlée par la plante.

Afin de se protéger contre les effets doses indésirables, et garder un niveau stable de ces espèces actives dans la plante et dans l'environnement direct, les plantes possèdent une batterie de protéines capables de réguler l'homéostasie des RONS [47]. Parmi ces protéines, on va retrouver les peroxydases de classe III. Les peroxydases végétales sont des glycoprotéines sécrétées, elles sont impliquées dans de nombreux mécanismes tels que l'élongation cellulaire, la construction de la paroi cellulaire mais aussi pour la défense contre les agents pathogènes. Elles appartiennent à de grandes familles multigéniques chez les angiospermes, on en retrouve 73 chez *A. thaliana* [48, 49]. Une des fonctions des peroxydases est d'oxyder et de réduire le peroxyde d'hydrogène [50], ce dernier étant entre autre localisé dans le manteau de la graine avant sa germination [42]. On peut donc envisager que l'activité enzymatique de ces protéines intervienne au cours de la rupture des couches externes de la graine et puisse être utilisée pour l'amélioration de la germination.

Les RONS peuvent donc être générées de façon endogène par la graine pendant sa phase de germination et de croissance mais peuvent également être amenées de façon exogène par une source externe comme par exemple le plasma. Dans les prochains chapitres, il sera donc intéressant d'identifier les relations présentes entre les RONS, le plasma et les effets sur la germination des graines.

I.3 Aperçu sur les plasmas

Le plasma est considéré comme le quatrième état de la matière [51] (Figure I-7). Cet état est le composant majeur de notre univers. Sur Terre, les plasmas «naturels» les plus courants sont les aurores boréales ou les décharges de foudre [52].

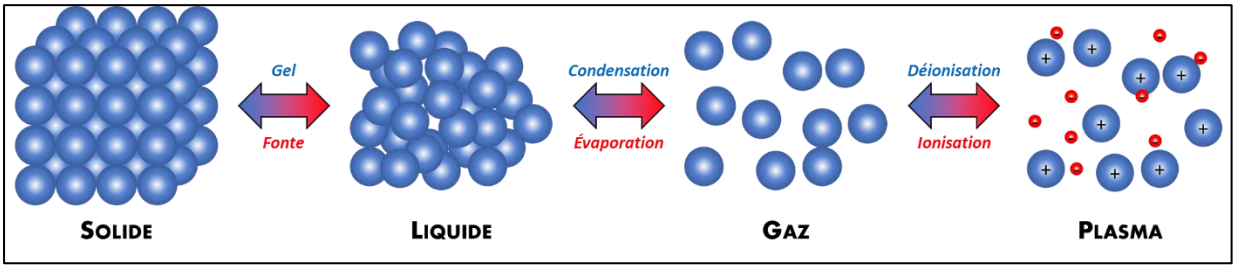


***Figure I-7 : Les états de la matière**. L'ajout d'énergie (thermique, électrique, ...) permet le passage d'un état le plus stable (solide) vers un état le plus instable (plasma). Les billes bleues représentent des molécules (ou atomes dans le cas des gaz rares)*

Le plasma dans sa forme naturelle dans l'univers est un milieu très chaud (millions de K) et totalement ionisé (absence de particules neutres, qu'il s'agisse d'atomes ou de molécules), on parle alors de plasmas chauds. Il existe cependant d'autres formes de plasmas que l'on génère à l'aide de source électromagnétique comme par exemple les plasmas d'arc électrique qui sont des plasmas thermiques ayant une température de quelques milliers de Kelvin et caractérisé par un régime d'équilibre thermique et chimique et un degré d'ionisation et de dissociation important [53].

Ensuite, il y a les plasmas froids, également appelés plasmas hors-équilibre (thermodynamique et chimique) dans lesquels, les espèces neutres ont une température pouvant être proche de la température ambiante tandis que la température des ions est typiquement 10 à 20 fois plus élevée alors que la température des électrons peut être en moyenne proche d'environ 1 eV (11604 K) jusqu'à plusieurs eV. Les plasmas froids contenant des espèces neutres et des espèces chargées positivement et/ou négativement, sont des gaz faiblement voire partiellement ionisés. Ils sont caractérisés par un faible degré d'ionisation (généralement entre 10^{-6} et 10^{-4}). Il est à

noter que ce sont les électrons (particules les plus énergétiques) qui, suite à une succession d'impacts avec le milieu gazeux, sont responsables de la formation des espèces actives (ions, radicaux, photons, espèces chimiques réactives comme les RO(N)S, …). Ce sont précisément ces espèces qui présentent une plus-value dans les applications biologiques ou industrielles.

Afin d'atteindre cet état faiblement ou partiellement ionisé proche de la température ambiante et riche en espèces actives, le gaz ou le mélange de gaz plasmagènes doit être soumis à des conditions de pression et d'alimentation électrique particulières [54]. Par exemple dans notre étude, le gaz choisi est à la pression atmosphérique et il est soumis à l'action d'une tension pulsée de 10 kV, de courte durée (la micro-seconde) avec une fréquence de 10 kHz.

Le plasma est un atout dans de nombreux domaines. Cet état va être utilisé de différentes façons en fonction des conditions dans lesquelles il est créé. Par exemple, à basse pression, l'apparition de propulseurs fonctionnant avec un plasma de gaz rare lors des ajustements ou petits changements d'orbite de satellites, est étudiée [55] ; les plasmas froids peuvent également être utilisés dans l'industrie pour modifier les propriétés physico-chimiques ou structurelles de surfaces en faisant par exemple des dépôts de couches minces pour la micro-électronique [56] ou en faisant de la nitruration pour le durcissement ou le blindage [57] ou encore de la fonctionnalisation pour améliorer les propriétés de mouillabilité ou conférer d'autres propriétés aux surfaces [58, 59].

Les plasmas ne sont pas seulement utilisés pour traiter de la matière inerte. Ils sont également utilisés dans le domaine des sciences du vivant pour notamment la décontamination ou la stérilisation de surfaces ou d'instruments pour le biomédical de par leurs propriétés antifongiques et bactéricides [60]. Le domaine plasma-médecine a fait l'objet de nombreux travaux de recherche par les communautés plasma et biologie car il permet d'apporter des solutions pragmatiques dans le cas de la cicatrisation des plaies chroniques [61] ou de participer à l'inactivation des cellules tumorales [62, 63] ou encore de traiter plusieurs pathologies de la peau en dermatologie [64].

Le domaine plasma-agriculture est celui sur lequel la communauté scientifique s'est penchée un peu plus tardivement même s'il y a eu un tout premier brevet paru en 1994 sur l'effet d'un plasma froid d'oxygène basse pression sur la stimulation de la germination des graines de blé [3] suivi de quelques publications au début des années 2000. Ce domaine regroupant les chercheurs de la physique des plasmas et de la biologie végétale a commencé réellement à prendre de l'ampleur depuis environ une petite dizaine d'années. Les travaux effectués concernaient généralement l'utilisation de certaines propriétés singulières des plasmas froids pour améliorer notamment la germination des graines et la croissance des plantes. Les plasmas

utilisés dans ces travaux sont des plasmas de laboratoire créés à partir d'un gaz (ou mélange de gaz) auquel on applique de l'énergie électrique ou électromagnétique. L'énergie apportée permet alors l'ionisation partielle du gaz et donc le passage d'un état isolant à conducteur. Le plasma ainsi créé est considéré comme un plasma « froid » hors équilibre puisque seule l'énergie des électrons est beaucoup plus grande que celles des autres espèces qui restent à une température globale n'excédant pas, à quelques exceptions près, la trentaine de degrés Celsius [65].

Cette particularité thermique permet l'utilisation du plasma pour le traitement de surfaces vivantes animales ou végétales sans provoquer de brulures ni de dégâts thermiques irréversibles. Du fait de l'énergie apportée par l'alimentation électrique ou électromagnétique au gaz, de nombreuses espèces réactives vont être produites principalement par collisions électroniques dans la phase gazeuse aussi bien dans l'environnement direct impacté par le plasma que sur les surfaces exposées au plasma [66]. Ces espèces réactives ou chimiquement actives vont être au cœur des études réalisées sur ces plasmas et elles seront exploitées dans les domaines de la biologie [67].
Du fait de l'utilisation de plasmas générés directement dans l'air ou de jets de plasma générés dans un gaz rare puis éjecté dans l'air ambiant, les principales espèces d'intérêt vont être des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (RONS) sur lesquelles on reviendra en détails dans les chapitres suivants.

I.4 Avancées et état de la recherche

I.4.1 Les différents dispositifs plasma

Une des difficultés dans ce domaine plasma-agriculture est le choix du dispositif plasma et des réglages de traitement pour traiter les graines. Comme c'est déjà indiqué, les plasmas utilisés dans ce domaine sont des plasmas froids hors équilibre thermique et chimique où il est très difficile de maitriser les taux de production des différentes espèces actives en fonction des paramètres opératoires (telles que la pression, la composition du milieu gazeux, les paramètres électriques de l'alimentation, etc.) surtout dans le cas des plasmas à la pression atmosphérique. On peut retrouver dans la littérature un très grand nombre de dispositifs plasmas parfois très différents qui ont été testées dans les applications plasmas-agriculture [6]. Les différences se situent à plusieurs niveaux :

- Le choix du gaz plasmagène : Par exemple, nous pouvons retrouver l'utilisation de plasma créé avec des gaz purs comme des plasmas d'hélium ou d'argon mais aussi des plasmas initiés dans l'air ou des mélanges de gaz précis [68].
- Le choix de la pression de travail : cela peut varier d'une étude à l'autre allant des basses pressions à la pression atmosphérique. L'intérêt des basses pressions est la relative bonne maitrise des espèces plasmas produites avec l'inconvénient de la survie à basse pression des espèces biologiques traitées. Tandis que l'avantage des plasmas générés à la pression atmosphérique est leur capacité de traiter directement les graines dans leurs conditions de pression naturelle avec l'inconvénient de maitriser difficilement une production contrôlée des espèces actives.
- Le choix de la géométrie du dispositif : plusieurs agencements et formes sont possibles notamment pour les électrodes permettant de répartir l'énergie apportée par exemple par le champ électrique qui va entrainer l'excitation et l'ionisation du gaz plasmagène. Par exemple à la pression atmosphérique, un système d'électrodes pointe-plan génèrera un plasma de décharge couronne (corona, II.2.3 Corona multi-pointes dans l'air ambiant), si les électrodes sont planes et recouvertes d'un diélectrique ce sera un plasma issu d'une décharge à barrière diélectrique (DBD, II.2.1. FE-DBD dans l'air ambiant). Ces deux exemples de plasmas sont des plasmas de volume, mais il est possible de générer des plasmas de surface comme il sera montré dans les exemples de littérature qui seront donnés dans la suite de ce chapitre.
- Le choix de l'alimentation électrique ou électromagnétique particulier : l'alimentation haute tension est nécessaire à la pression atmosphérique pour générer les plasmas. Elle peut être continue (DC), alternative (AC), ou pulsée (mono ou bipolaire). On peut aussi, quel que soit la pression, avoir besoin d'une alimentation électromagnétique Radiofréquence à 13,56 MHz (RF) ou micro-ondes à 2,45 GHz (MW).

Il faut également ajouter que pour un dispositif plasma donné, les paramètres électriques (par exemple pour une alimentation pulsée : durée de la pulsation, fréquence de répétition, niveau de tension appliquée, etc.) ou encore le temps de traitement des graines sont des paramètres qui diffèrent en fonction des études.

Un des buts de cette étude est notamment de d'examiner tous ces paramètres pour avoir les effets recherchés sur la germination, à savoir une augmentation du taux et de la vitesse, ou sur le développement.

Dans ce qui suit, nous allons passer en revue une sélection de dispositifs plasmas déjà utilisés dans la littérature dans le domaine plasma-agriculture. L'objectif étant de montrer la diversité

des dispositifs plasmas présents dans la littérature. Nous nous concentrerons dans ce paragraphe principalement sur les caractéristiques électriques ainsi que la géométrie des dispositifs.

Le premier prototype plasma mis au point pour le traitement de graines est celui présenté dans le brevet de Krapivina en 1994 [3]. Ce dispositif est composé d'une chambre autour de laquelle sont placées deux électrodes annulaires reliées au courant. La chambre est maintenue sous pression (entre 0,1 et 5 Torr) grâce à une pompe située à une extrémité de la chambre, l'autre étant reliée à un répartiteur qui gère l'arrivée de gaz. Le plasma peut être produit dans l'air, l'O_2, le N_2 ou un mélange, la durée du traitement a été fixée entre 5 et 300 secondes. À noter que le plasma est initié à l'aide d'un générateur de puissance électrique haute fréquence (1 à 40 Mhz) permettant de déposer une puissance dans le volume de la décharge entre 0,003 à 1,5 W/cm^3.

Dans les travaux de 2000 de Dubinov et al [69] sur le traitement de certaines graines de blé, d'orge et d'avoine pour l'étude de leur croissance, la chambre servant au traitement est constituée d'un tube en verre fermé par des électrodes en acier reliées à la haute tension continue permettant de former une décharge de type luminescente (glow) à basse pression. Dans cette étude deux régimes sont utilisés, le premier avec un courant continue de 25mA, une pression de 0,1 Torr et un temps d'exposition de 2 minutes ; le deuxième avec un courant pulsé de 40mA (durée 150 à 200 ms et de fréquence 0,5Hz), une pression de 0,2 Torr, et un temps d'exposition de 4 minutes. Ces auteurs soulignent que les graines traitées sont soumises à un bombardement de particules chargées d'énergie 0,1 eV pour les ions et de 3eV pour les électrons. Les différents régimes sont utilisés soit pour le traitement de l'orge ou pour celui de l'avoine afin d'augmenter leur germination jusqu'à +35%.

Dans les travaux de 2000 de Volin et al [5] consacrés à l'enrobage de certaines graines (soja et haricot par exemple) par décharge plasma générée à basse pression (0,03 à 0,04 T) dans plusieurs gaz plasmagènes (notamment du CF_4) en régime RF, le dispositif utilisé diffère du fait qu'il est en mouvement permanent pendant le traitement. En effet pour une meilleure homogénéité de l'enrobage des graines avec les différents produits, le dispositif possède une chambre rotative tournant à une vitesse de 30 rpm dans laquelle se trouve les graines. Cette chambre en Pyrex est entourée de deux bagues en acier inoxydable qui servent d'électrodes pour la décharge électrique. Plusieurs pressions ainsi que de temps d'exposition sont appliquées en fonction des graines utilisées (Tableau I-1).

Les travaux de 2014 de Jiang et al [70] s'intéressent à l'effet du traitement par plasma sur la résistance des tomates à la bactérie *Ralstonia solanacearum*. L'appareil utilisé pour la décharge plasma est un dispositif de type DBD, les paramètres sont fixés comme suit : une fréquence de 13,56 MHz, une puissance de 80 W, la pression à l'intérieur de la chambre est maintenue à 150 Pa (soit environ 1,1 Torr) pendant le traitement. Il a été montré que le plasma froid pouvait améliorer la germination des graines de tomate de plus de 10% et la croissance de la tomate de 9% tout en supprimant les bactéries à l'origine du flétrissement de la plante. Il est donc probable que la résistance observée ne soit due qu'à la meilleure santé de la plante avant infection. De plus la création non négligeable d'espèces réactives telles que l'H_2O_2 participe à la régression des symptômes d'infections.

Dans les travaux de 2014 de Puac et al [71], les effets à court et long termes sur les cellules méristématiques sont étudiés. Pour ce faire, le dispositif utilisé, est constitué d'une pointe (ou aiguille) générant le plasma dans un flux d'hélium à la pression atmosphérique. L'aiguille agit comme l'électrode, elle est recouverte par un tube en céramique et placée dans un tube en verre. Le corps de l'aiguille étant en téflon permet l'ignition du plasma. De l'hélium servant de gaz plasmagène circule entre les tubes en céramique et en verre. Le débit de l'hélium varie entre 0,5 et 1 $Ls.m^{-1}$ (litres standard par minute). Enfin, l'électrode centrale est alimentée par un générateur RF de fréquence 13,56 MHz. Dans cette étude, il a été mis en évidence des changements au niveau de plusieurs enzymes : superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT) et peroxydase (Prx). Une augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase est observée, jusqu'à trois fois après traitement au plasma. Le même ratio est retrouvé pour la catalase après 120 s de traitement. Ceci est expliqué par l'augmentation du niveau de ROS dans l'environnement direct de la plante qui va donc stimuler l'activité enzymatique au sein des cellules de la graine pendant son développement.

Un autre type de dispositif utilisé dans la littérature est la DCSBD (Diffuse Coplanar Surface Barrier Discharge),Figure I-8. Cela consiste à créer une décharge de surface du côté de l'air ambiant qui permet notamment de traiter de plus grosses graines tel que le pois comme cela a été fait par Stolarik et al [72] en 2015. Dans cette étude le taux de germination passe de 77 à 83% après 120 s de traitement.

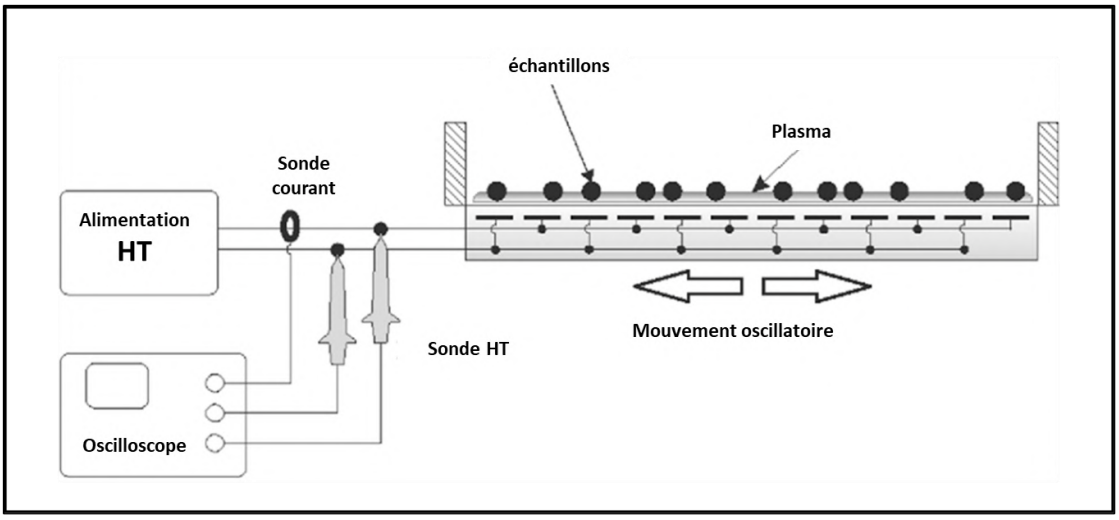


Figure I-8 Schéma du dispositif « Diffuse Coplanar Surface Barrier Discharge » (Stolarik et al., 2015)*. La décharge plasma se produit ici à la surface du dispositif où les graines sont placées. Les électrodes noyées dans le diélectrique se trouvant dans la partie inférieure sont alternativement reliées à la haute tension (HT ou HV) et à la masse à la manière d'un peigne. Ce réseau d'électrodes est ensuite recouvert d'un autre diélectrique d'une faible épaisseur (<1mm) à la surface duquel un plasma est directement formé dans l'air ambiant.*

Dans l'étude de 2016 de Butscher [73], le dispositif de génération plasma utilisé est une décharge à barrière diélectrique (DBD) Figure I-9. Ceci consiste à relier deux électrodes planes au courant, les graines sont alors disposées sur un matériau diélectrique, ici du verre. Le gaz situé entre les électrodes va, sous l'influence du courant, s'ioniser. Dans cette étude le gaz plasmagène est l'argon. Des graines d'oignon (*Allium cepa*), de radis (*Raphanus sativus*) ou de luzerne (*Lepidium sativum*) sont utilisées dans cette étude pour vérifier notamment l'effet sur la contamination des graines par *E. coli*. Il est observé une réduction jusqu'à 3,4 unités logarithmique de la présence d'*E. coli*.

L'étude de 2019 d'Ahn [74], utilise également un dispositif DBD (Figure I-9) avec cependant un autre gaz plasmagène, l'hélium. L'objectif de cette étude était de tester les effets en champs sur le maïs, cependant, le taux de germination étant très proche des 100% aucun changement n'a été observé / détecté.

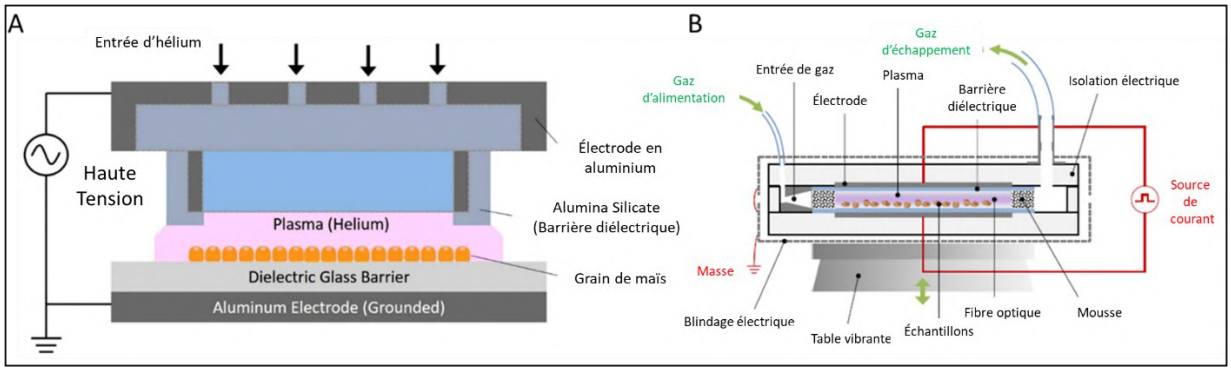


Figure I-9 : Schéma du dispositif plasma adapté de Ahn et al. 2019 (A). Schéma du dispositif plasma adapté de Butscher et al. 2016 (B)*. Les deux schémas montrent le fonctionnement d'un dispositif plasma de type DBD. La décharge plasma se fait à partir de l'électrode qui est au-dessus et reliée à la haute tension et celle du bas reliée à la masse. Afin d'éviter la formation d'arcs électriques et permettre l'allumage du plasma, les électrodes sont toutes les deux recouvertes d'un matériau diélectrique.*

Enfin, un autre type de traitement utilise un jet de plasma. Le principe d'ignition du plasma reste le même que celui de la DBD, mais ici les graines sont placées à la sortie de la décharge et non entre les électrodes. Dans l'étude de 2019 de Fadhlalmawla [75], le jet de plasma est initié avec de l'argon pour stimuler la germination des graines de *Trigonella foenumgraecum* (Figure I-10). Une augmentation significative de 23,3% du taux de germination du lot ayant subi 30 secondes de traitement par rapport au lot de contrôle a été mise en évidence après 24h. Cependant 48h après traitement, cet effet n'était plus significatif.

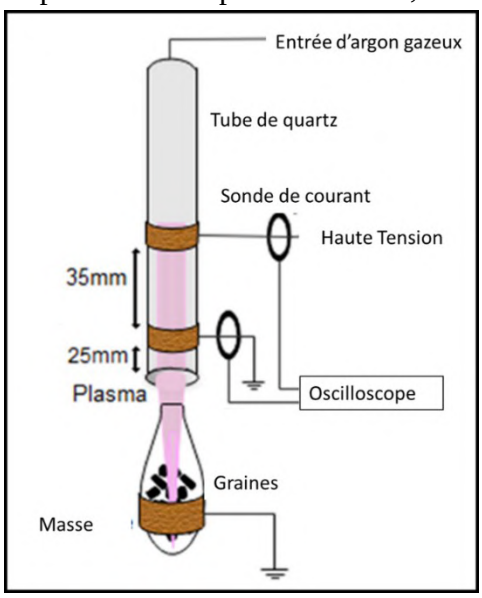


Figure I-10 Schéma du jet plasma adapté de Fadhlalmawla et al., 2019*. Le principe du jet plasma est similaire à celui de la DBD cependant ici le gaz plasmagène est ionisé entre les électrodes se trouvant à l'intérieur du tube de quartz avant d'en être éjecté à l'extérieur du tube pour être utilisé pour le traitement des graines. Grâce au flux de gaz, on peut observer une plume plasma qui vient au contact des graines.*

Tous les dispositifs précédemment illustrés servent au traitement direct des graines, cependant, il est possible de traiter indirectement des graines en utilisant de l'eau activée par plasma (PAW). Par exemple, Alves et al dans son étude [76] de 2016 utilise une décharge à barrière diélectrique pour activer de l'eau. Celle-ci servira ensuite pour l'imbibition des graines d'*Erythrina velutina*. Avec une méthode similaire, Kučerová et al [77] utilise une DBD dans l'air à pression atmosphérique pour le traitement de l'eau (Figure I-11). Dans cette étude, les graines de *Triticum aestivum* sont utilisées. Une augmentation de la germination jusqu'à 30% est observée avec de l'eau du robinet activée. Cependant après un temps d'activation trop long, l'effet de l'eau devient négatif sur le pourcentage de germination mais aussi sur l'absorption d'eau.

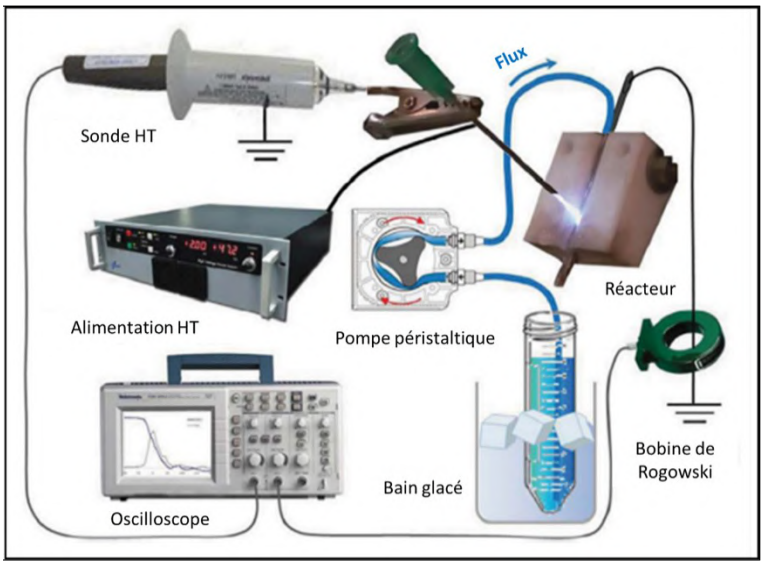


Figure I-11 Schéma du dispositif de l'étude de Kučerová en 2019 servant l'activation de l'eau. *Ce dispositif est basé sur un appareil de Type DBD mais l'échantillon traité est ici de l'eau. L'électrode, présente au fond d'une gouttière va permettre à l'eau d'être traitée à son passage. De plus, une pompe permet de fermer le circuit d'eau afin de contrôler le nombre de passage sous le plasma.*

La multitude de dispositifs plasma avec chacun sa spécificité en termes de composition gazeuse, d'alimentation électrique et de pression gazeuse, ne permet pas de tirer de conclusions générales quant au choix du dispositif plasma le plus approprié pour traiter telles ou telles graines en raison de la complexité de l'effet du plasma sur la germination.

Cependant, nous pouvons présenter ici une synthèse des effets des plasmas sur la germination des plantes à partir d'une sélection non exhaustive de travaux de la littérature.

I.4.2 Les effets des plasmas sur la germination

Ce paragraphe est consacré aux différents résultats biologiques mis en évidence dans la littérature à travers la sélection d'articles effectuée dans le paragraphe précédent. L'accent sera mis notamment sur la disparité des résultats en fonction des dispositifs et des plantes rétudiés.

Dans les premières études sur la germination induite par plasma, on retrouve celle de Dubinov en 2000 [69]. Les graines d'avoine (*Avena sativa*) et d'orge (*Hordeum Rulgare*) ont été utilisées. Deux dispositifs sont testés sur l'avoine qui permettent respectivement de passer de 6,5% à 24,5% de germination et de 18,0 à 29,0 %. Seul le dispositif avec une décharge pulsée est utilisé pour le traitement de l'orge, avec une augmentation de 35% de la germination.

En 2000 également, l'étude de Volin [5] a pour but de voir l'effet d'un enrobage de produit hydrophile ou hydrophobe sur les graines par déposition plasma. Plusieurs types de gaz sont utilisés ainsi que de nombreuses graines et conditions plasmas, le tout est montré dans le Tableau I-1.

Tableau I-1 Tableau résumant tous les différents paramètres des traitements ainsi que les graines traitées dans l'études de Volin et al. [5]

Espèce	Gaz	Pression (mT)	Temps d'exposition
Radis Pois	Tetrafluorure de carbone (CF4)	200	5
Soja Maïs	Octadecafluorodecaline (ODFD)	300	10
Maïs Haricot	Octadecafluorodecaline (ODFD)	200	2
Maïs Haricot	Octadecafluorodecaline (ODFD)	200	5
Maïs Haricot	Octadecafluorodecaline (ODFD)	200	20
Soja Maïs	Aniline	200	20
Soja Maïs	Cyclohexane	70	10

Dans le premier cas de traitement avec le tétrafluorure de carbone (CF4), une réduction de la vitesse de germination est observée. Pour le radis, le maximum de germination est atteint en 2 jours sous condition contrôle et il faut 6 jours pour obtenir le même taux avec les graines traitées au CF4. De plus, le pourcentage de viabilité des graines de pois est réduit de 25%.

Les mêmes observations sont faites pour toutes les conditions à l'exception de l'aniline et du cyclohexane.

On note que sur le maïs et le haricot, les auteurs observent une inhibition proportionnelle au temps d'exposition à l'ODFD. Pour les temps de traitements suivants : 0, 2, 5 et 20 minutes les pourcentages correspondants de germination après 10 jours sont noté : 99, 85, 81 et 27%.
Pour le soja traité à l'aniline, les graines germent plus rapidement 83% au jour 1 contre 12% pour les non-traitées. Le maïs suivant le même traitement montre une tendance similaire passant de 8% de germination au jour 1 à 53%.
Le traitement au cyclohexane n'a quant à lui aucun effet significatif sur la germination. Les auteurs concluent donc que le plasma peut être utilisé pour le micro-dépôt de surface sur les graines sans pour autant altérer leur germination à condition de déterminer au préalable les paramètres optimales.

Dans l'étude de Ji et al de 2015 [78], des graines de coriandre (*Coriandum sativum)* sont utilisées et le temps de traitement varie entre 30 à 180 secondes d'exposition au plasma. Les résultats suivants ont été obtenus avec le plasma d'azote : le taux de germination à 7 jours passe de 50% en moyenne sans traitement à plus de 90% après 30 secondes d'exposition. Cependant à 180 secondes d'exposition on note que le plasma n'a pas d'effet sur le taux de germination de ces graines.

L'étude réalisée par Meng en 2017 [79] porte sur les différences d'effets sur des graines de blé en fonction des différents gaz utilisés. Le dispositif utilisé ici est une DBD, et les gaz sont soit, de l'air, de l'oxygène, de l'azote ou de l'argon. Les mesures de germination sont faites à 1 ou 4 jours après traitement au plasma. On peut voir une différence significative entre le contrôle et les plasmas d'air, N_2 ou Ar. Le taux de germination passant de 62,5% sans traitement à 84,7% après exposition au plasma d'Argon (Figure I-12).

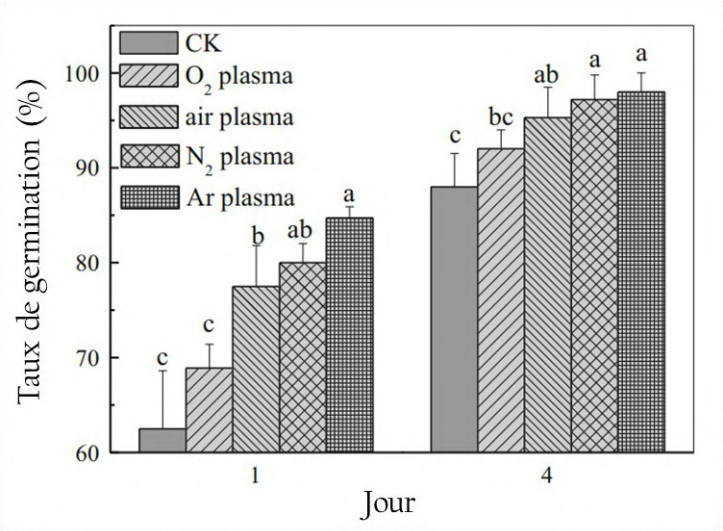


Figure I-12 Histogramme du pourcentage de germination du blé pour 1 jour et 4 jours après différents traitements plasma. *Quatre gaz ont été utilisés pour générer le plasma.CK : contrôle sans plasma. Adapté de la figure 4 de Meng et al., 2017 [79]*

Un autre paramètre très important va donc être la durée d'exposition des graines au plasma. Dans l'étude de Sera et al en 2017 [7], la germination de différents cultivars de chanvre est étudiée. L'intérêt de cette recherche est de montrer des effets différents du plasma sur des plantes cultivars de la même espèce. Ils ont utilisé 3 cultivars différents *Finola, Bialobrzeskie* et *Carmagnola*, qui sont trois anciennes variétés de chanvre (*Cannabis sativa*). Deux types de plasma sont utilisés, le premier est un dispositif micro-ondes formant un plasma à basse température et basse pression ; le deuxième est une décharge d'arc glissant générée entre deux électrodes dont l'écartement s'ouvrent progressivement (Gliding arc discharge). La germination est effectuée sur papier filtre avec de l'eau distillée. Après un traitement au gliding arc, les graines de *Finola* et *Carmagnola* germent mieux que les non-traitées avec jusqu'à 22 % d'augmentation pour *Carmagnola* après 180 s de traitement. En revanche le traitement au gliding arc n'a aucun effet sur le cultivar *Bialobrzeskie* quel que soit le temps d'application.
Pour le traitement avec le dispositif micro-ondes, on observe des effets négatifs sur la germination du *Cramagnola* avec une réduction de 50 % à 180 s de traitement et cet effet s'observe à tous les temps de traitement. Le traitement retarde la germination de *Bialobrzeskie*, indépendamment du temps, on note une réduction de la germination à 3 j (70 % du contrôle) puis à 5 j une germination de 100 %. Enfin pour *Finola*, ce type de traitement n'a aucun effet.
Il a été mis en évidence ici que les résultats peuvent être contradictoires en fonction du type de plasma utilisé ou encore de la graine traitée. C'est pour cela qu'au début de ce travail, une phase de mise au point a été effectuée afin de déterminer et fixer les conditions les plus appropriées pour le traitement des graines choisies avec les dispositifs plasmas dont on dispose au Laplace-PRHE.

I.4.3 Le plasma et le développement des plantes

D'autres travaux ont analysé les effets du plasma sur le développement des plantes. Le traitement au plasma peut être appliqué directement sur les graines ou sur la plante entière. Des paramètres comme la longueur des racines sont utilisés pour montrer l'effet du traitement plasma sur la croissance.

Dans l'étude de Park et al en 2013 [80], trois dispositifs plasma ont été utilisés afin de traiter de l'eau pour la tester sur plusieurs types de graines (pastèque, luzerne, zinnia, herbe de champ ombragé, …). Le dispositif qui a montré les meilleurs résultats est le plasmatron générant des décharges d'arc glissante (gliding arc discharge) ayant généralement une température beaucoup plus élevée que les dispositifs habituels qui utilisent comme gaz plasmagène un flux d'air avec un débit très important (30 $L.min^{-1}$ à 70 kPa c'est à environ 0,7 fois la pression atmosphérique). Afin de noter l'effet de l'eau activée par plasma sur les plantes, la longueur et le poids de la tige et des racines ont été mesurés.

Les meilleurs résultats pour le poids de la tige et des racines de la luzerne ont été obtenus avec de l'eau de source traitée au plasma, avec une augmentation de 400 et 600 % respectivement. Des résultats moins importants mais toujours significatifs ont été trouvés pour le plasmatron alimenté avec de l'eau du robinet, avec un facteur 4 pour l'augmentation du poids de la plante. En parallèle, l'eau distillée traitée avait montré moins d'augmentation. Toutefois, les auteurs soulignent que dans leurs conditions expérimentales les changements des caractéristiques de l'eau traitée par plasma (chute du pH et augmentation des concentrations des espèces oxydées comme H_2O_2, NO_2^-, NO_3^-) sont instables et se perdent assez rapidement en fonction du temps. Il est déduit que le stockage de l'eau activée nécessitera des agents chimiques stabilisant pour ne pas perdre les RONS à courte durée de vie produits par plasma.

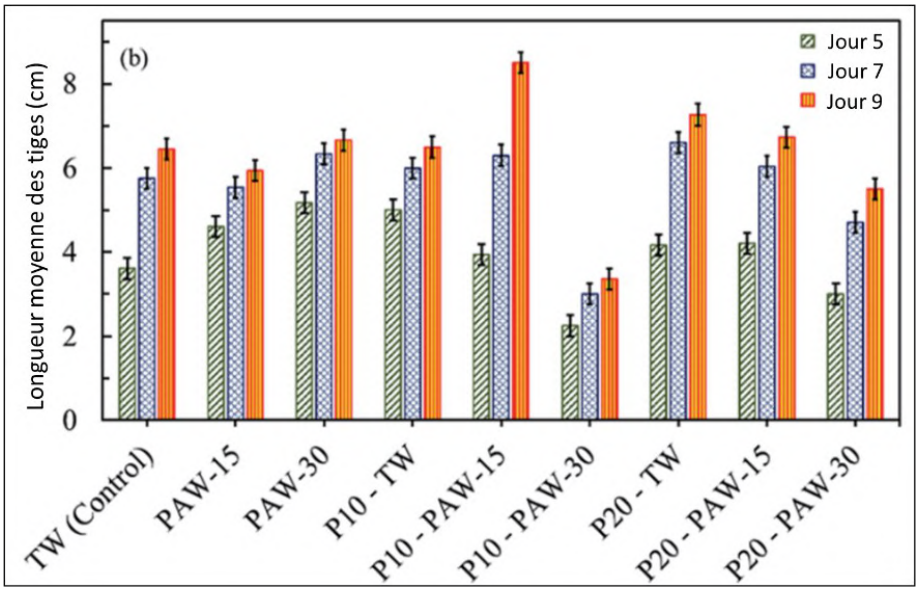


Figure I-13 : Diagramme de la longueur moyenne des tiges de radis (*Raphanus sativus*) après 5, 7 et 9 jours en fonction de différents traitements plasma utilisant l'eau activée par plasma (PAW). *Digramme adapté de (Sivachandiran & Khacef 2017). TW : Eau du robinet, PAW : eau activée par plasma pendant 15 ou 30 min, P10 et P20 : graines traitées par plasma pendant 10 et 20 min.*

Sivachandiran et Khacef en 2017 [81] ont voulu comprendre les effets directs du plasma mais aussi les effets indirects *via* l'eau activée par plasma (PAW) sur le développement des semences. Le traitement a été fait grâce à un dispositif de type double DBD avec des électrodes cylindriques en envoyant le plasma d'air synthétique dans l'eau traitée avec un débit de 1 $L.min^{-1}$. Les durées choisies pour le traitement de l'eau étaient de 10 à 30 minutes. Des graines de radis (*Raphanus sativus*) ont été utilisées pour mettre en évidence ces effets de l'eau activée par plasma (PAW) (Figure I-13).

Dans tous les cas, la longueur de la tige augmentait avec la durée de culture. Au 5ème jour, il est noté une amélioration, les données montrent que la longueur de la tige augmente de 28 et 45 % respectivement pour PAW 15 et 30 minutes. Pour essayer d'expliquer l'effet du plasma sur la croissance, les auteurs ont mesuré plusieurs caractéristiques de l'eau activée par plasma (PAW) telles que le pH, la conductivité électrique ainsi que la teneur de H_2O_2, NO_2^- et NO_3^- en les comparant notamment à ceux de l'eau de robinet non activée (TW). Ils observent clairement pour PAW une baisse du pH et de la conductivité et une augmentation des nitrates. Ils concluent que la production de nitrates et l'acidification de l'eau seraient à l'origine des effets positifs observés car le nitrate en particulier est impliqué dans le processus métabolique cellulaire.

Li et al dans leur étude de 2018 [82], se sont intéressés aux effets d'un plasma d'hélium à basse pression (150 Pa soit environ 1 Torr) sur le développement des plantes de *Brassica napus* (colza). La durée du traitement est de 15 secondes sans que les raisons du choix de cette durée ne soient clairement mentionnées et les résultats les plus probants sont obtenus pour une puissance RF de 100 W appliqués entre deux électrodes planes parallèles couvertes de diélectriques. Trois stades de développement sont notés : jeune pousse, bourgeonnement et floraison. Plusieurs caractéristiques du développement sont prises en compte. Pour commencer, la hauteur de la plante est mesurée et une augmentation de 17,89 %, 10,67 % et 10,16 % respectivement aux stades de jeune pousse, de bourgeonnement et de floraison par rapport au témoin est observée. Le diamètre des tiges est également mesuré, une augmentation de 12,98% est observée pour le premier stade et 8,96 % pour le second. Enfin, le poids sec des plantes a été mesuré et une augmentation entre 8,7 et 12,68 % due au traitement plasma est notée en fonction du stade de développement et de la partie de la plante (aérienne ou racinaire) considérée.

Ici encore, on peut retrouver un grand nombre de conditions différentes ne permettant pas de mettre en avant un effet précis du traitement par plasma. La plupart des études présentées durant ce chapitre sont souvent descriptives et n'apportent pas pour l'instant de réponse vraiment claire quant aux mécanismes activés par les plasmas sur la germination des graines et le développement des plantes.

I.4.4 Les effets du plasma sur la surface des graines

Certaines études ont tenté d'expliquer les effets du plasma sur le taux de germination par la modification du contenu de la graine ou encore la modification de ses propriétés de surface.

L'étude de Zahoranová et al [83] utilise des graines de maïs (*Zea mays L.*) traitées avec un dispositif DCSBD dans l'air ambiant. Le traitement est effectué pendant 10 à 300 s. Afin d'observer les changements de la surface, l'angle de contact (WCA) a été mesuré (Figure I-14). L'échantillon témoin a un angle de contact de 107,9 ° ce qui indique une surface hydrophobe. Après 10 s de traitement plasma, on note une réduction de presque 50 % de l'angle de contact et donc de l'augmentation de l'hydrophilie de la surface de la graine. Les résultats de cette étude permettent de supposer que ce changement pourrait entraîner une meilleure absorption d'eau et une accélération des processus de germination. Cet effet pourrait, d'après les auteurs, être expliqué par une concentration plus élevée de groupements polaires contenant de l'oxygène ou de l'azote à la surface des graines traitées.

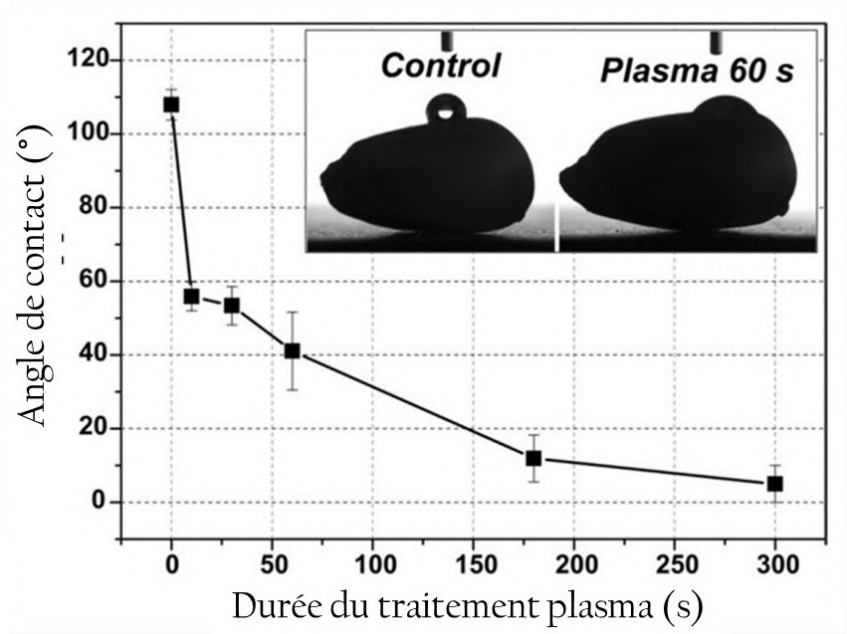


Figure I-14 Courbe de l'angle de contact (WCA) en fonction du temps de traitement au plasma sur des graines de* Zea mays. *[83]

L'étude de Shapira et al [84] s'est intéressée aux changements de propriétés de surface des graines de piment (*Capsicum annuum*). Tout d'abord, l'angle de contact a été mesuré et peut être corrélé avec la mouillabilité de la surface des graines. L'angle est mesuré à la surface des graines avant et après traitement plasma, on note une réduction de l'angle passant de 76 à 53 °. Ceci indique donc que la graine a une plus grande mouillabilité après traitement au plasma. En effet plus l'angle de contact est petit plus la goutte est étalée et plus la graine est mouillée. Dans

une deuxième partie, ils se sont intéressés à la flottabilité des graines. Après 24h seulement 10 % des graines contrôles ont coulées alors que 50% des traitées avaient déjà coulées après 4h. Ils concluent donc sur le fait que le traitement au plasma influence positivement la mouillabilité des graines.

Dans l'étude de Dobrin et al [4], il a également été mis en évidence une réduction de l'angle de contact passant de 92 à 53° après 15 minutes de traitement sur des graines de blé tendre (*Triticum aestivum*), Figure I-15.

***Figure I-15 : Photo du test d'angle de contact. Figure extraite de Dobrin et al., 2015 [4]. a** : surface de graine témoin ; b : surface de graine traitée au plasma*

Les trois études citées nous montrent un effet similaire du traitement au plasma sur la surface des graines. Bien que les graines et les dispositifs plasma soient tous différents, on observe à chaque fois une goutte plus plane après traitement ce qui signifie une augmentation de la mouillabilité due au traitement par plasma.

1.4.5 La décontamination par plasma

Même si cette revue bibliographique porte principalement sur la stimulation par plasma de la germination des graines et leur croissance, il nous a paru utile d'évoquer dans ce domaine plasma-agriculture, les études qui se sont penchées sur les caractéristiques antifongiques et bactéricides des plasmas pour la décontamination des graines. Ces traitements sont utilisés afin d'éliminer les parasites et les pathogènes qui peuvent provoquer des dégâts significatifs. Par exemple, lors du stockage des graines, ces organismes peuvent produire des micro-toxines dangereuses pour la santé ou encore l'invasion du tégument par des champignons peut diminuer la viabilité de graines ou provoquer des semis anormaux.

On peut citer par exemple, l'étude de 2008 de Selcuk et al [85] qui s'est intéressée à la décontamination de différentes graines (tomate, blé, haricot, pois chiche, soja, avoine, orge, seigle et maïs) volontairement contaminées par deux champignons phytopathogènes du blé (*Aspergillus paraciticus* et *Penicillum spp.*). Les graines ont été ensuite traitées par plasma à base d'air synthétique et d'hexafluorure de soufre (SF_6). Ce type de milieu plasmagène était ensuite conditionné à basse pression (0.5 Torr) dans le cas d'un dispositif utilisant un générateur de fréquence à 1kHz délivrant une puissance de 300 Watts. Les temps d'exposition au plasma

généré dans un tube de verre vont de 30 secondes à 30 minutes. Un des résultats les plus significatifs est celui du traitement des graines de blé avec le plasma de SF_6, le nombre de microorganismes (*Penicillum spp.*) passe de $4{,}1 \times 10^7$ CFU/g avant traitement à moins de $1{,}6 \times 10^4$ CFU/g après 20 minutes d'exposition. À une densité d'inoculation initiale de 10^3 CFU/g avec *Penicillum spp.*, on observe une réduction de 99 % de la population après 15 minutes de traitement.

Il est également montré que l'efficacité du traitement dépend de la graine traitée et donc par conséquent de la surface en contact avec le plasma. Des graines de blé, orge, avoine et maïs ont été inoculées avec une densité de 5×10^6 CFU/g d'*Aspergillus spp.*, il est noté une réduction significative pour toutes les graines de colonie de pathogène après 15 minutes de traitement au plasma de SF_6. Les auteurs obtiennent une très bonne efficacité de réduction des micro-organismes (de 99,8 % pour le blé ; de 96,6 % pour l'orge ; de 93,2 % pour l'avoine et de 69,6 % pour le maïs). Le taux de germination a été également testé afin de vérifier que le traitement n'affecte pas négativement la viabilité des graines. Aucune différence significative n'est observée sur la germination des graines utilisées ni sur le développement précoce des plantes.
On peut également signaler les travaux de 2014 de Zhang et al [82] qui, grâce à un jet de plasma DBD utilisant un mélange He/O_2, montrent comment lutter contre certaines maladies des plantes dont les feuilles sont infectées de champignons parasites. Les auteurs soulignent que le jet de plasma projetant par définition des espèces submicrométriques (donc à l'échelle atomique) capables de traverser aisément les pores épidermiques micrométriques des feuilles, induisent de forts effets oxydants sur les cellules pathogènes visées par le plasma entrainant leur inactivation avec une grande efficacité.

Une autre étude de Šerá et al [87] faite en 2019 concerne le traitement par plasma du *Fusarium circinatum* qui est un parasite ravageur des arbres car il cause la maladie du chancre du poix chez de nombreuses espèces de pins. En présence de ce champignon, les graines infectées après trois jours de culture développent des filaments fongiques. Afin de traiter cela, Šerá et al [87] utilisent un dispositif de DCSBD à pression atmosphérique dans l'air ambiant pour traiter des graines infectées de *Pinus radiata*. Après 12 jours de culture, les graines témoins sont toutes infectées. Après 5 s de traitement, on note une réduction de l'infection mais 86 % des graines présentent encore des champignons. C'est à partir de 60 s de traitement que l'on peut observer une désinfection totale des graines puisqu'il n'y a aucun développement de filament.

Dans cette revue sur la décontamination par traitement plasmas, il est également intéressant de signaler des travaux consacrés au conditionnement de plusieurs aliments frais dans le but de retarder l'apparition des moisissures liées à certains champignons.

Par exemple Misra et al en 2014 [88] ont effectué des travaux sur les fraises à l'aide d'un plasma froid à la pression atmosphérique généré avec une décharge à barrière diélectrique (DBD) de 60 kV pulsée à 50 Hz, à travers un espace inter-électrodes de 40 mm, qui a été généré à l'intérieur d'un emballage scellé contenant de l'air ambiant (avec 42 % d'humidité). Les caractéristiques courant-tension ont révélé que le plasma fonctionnait en régime filamentaire. La microflore sur les fraises (bactéries aérobies mésophiles, levures et moisissures) a été traitée pendant 5 min et a été réduite de 2 décades dans les 24 h suivant le traitement plasma. Ce qui montre que le plasma peut être aussi un outil pour conserver plus longtemps en bon état certains aliments frais.

I.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons passé en revue les principales notions de la biologie végétale dont certaines nous serviront dans les chapitres suivants à l'analyse des effets des espèces plasmas sur la germination des graines et la croissance des plantes. Ensuite, pour familiariser les non-initiés, nous avons donné les principales indications sur les plasmas froids ainsi que les conditions très variées en termes de composition gazeuse, de pression, d'alimentation électrique et de configuration d'électrodes qui amènent à leur formation en vue de leur application en biologie végétale. Puis nous avons passé en revue une sélection de travaux de recherche effectués dans le domaine plasma-agriculture, travaux amorcés par un premier brevet en 1994 puis poursuivis avec la parution de quelques publications au début des années 2000 avant d'être étudiés de façon plus intense durant ces toutes dernières années. Il ressort de cette étude bibliographique que la plupart des travaux effectués sont consacrés à des constations souvent qualitatives des effets positifs des plasmas générés par les divers dispositifs considérés (corona, DBD, DCSDBD, FE-DBD, RF, MW, etc.) sur la germination et la croissance d'une multitude de graines (colza, chanvre, pois, tournesol, haricot, lentille, radis, soja, avoine, orge, blé, tomate, …) sans pour autant décrire ni les mécanismes biologiques sous-jacents à cette augmentation des taux de germination ni les espèces plasmas réellement responsables de tels effets sur la germination et la croissance.

C'est dans ce contexte que cette thèse a démarré pour apporter des éléments supplémentaires de compréhension sur les mécanismes biologiques par le traitement plasma durant la germination des graines et la croissance des plantes. Le but de cette étude est donc de comprendre par le biais de l'utilisation de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (graine très bien adaptée en raison de son cycle de vie court et d'un génome parfaitement connu et séquencé) et en utilisant certains dispositifs plasmas, les effets directs et indirects (via l'eau activée) du plasma sur la germination des graines et la croissance des plantes. D'autres graines ont également été testées dans le cadre de cette étude. Il faut en particulier souligner que dans cette revue bibliographique, les travaux commencés en 2015 par nos deux équipes (équipe PRHE du Laplace et équipe Peroxydase en biologie végétale du LRSV) puis poursuivis dans le cadre de cette thèse n'ont volontairement pas été cités car ils feront l'objet des chapitres suivants.

Chapitre II Matériels et méthodes

II.1 Introduction

Ce deuxième chapitre est consacré à la description détaillée des plasmas utilisés, des différentes expériences menées au cours mes travaux de thèse et des moyens utilisés pour analyser les effets plasmas.

Dans une première partie, nous évoquerons des différents dispositifs plasma mis en place pour le traitement des graines ou pour l'activation de l'eau ainsi que leur fonctionnement et une synthèse de leurs caractéristiques énergétiques et chimiques. Puis nous détaillerons le matériel biologique, à savoir les différentes graines utilisées, les intérêts de leur utilisation dans cette thèse et les méthodes de leur exposition à différents types de traitement plasma. Enfin, nous décrirons les nombreuses expériences mises en place pour étudier les effets du plasma sur la germination des graines et leur développement ainsi que pour analyser l'eau activée par plasma utilisée lors de la croissance des plantes.

II.2 Les dispositifs plasma

Durant cette étude, trois dispositifs ont été utilisés afin de produire des plasmas basse température à pression atmosphérique.

II.2.1. FE-DBD dans l'air ambiant

Le premier dispositif est une décharge à barrière diélectrique (FE-DBD), Figure II-1. Ce plasma est initié dans l'air ambiant. La première électrode est un cylindre de 8 mm de diamètre, reliée à la haute tension et recouverte par un tube de verre ajusté pour ne pas laisser d'air entre l'électrode et le tube. Les graines sont placées entre ce tube et une lame de verre, d'une épaisseur de 1 mm, elle-même posée sur une électrode reliée à la masse.

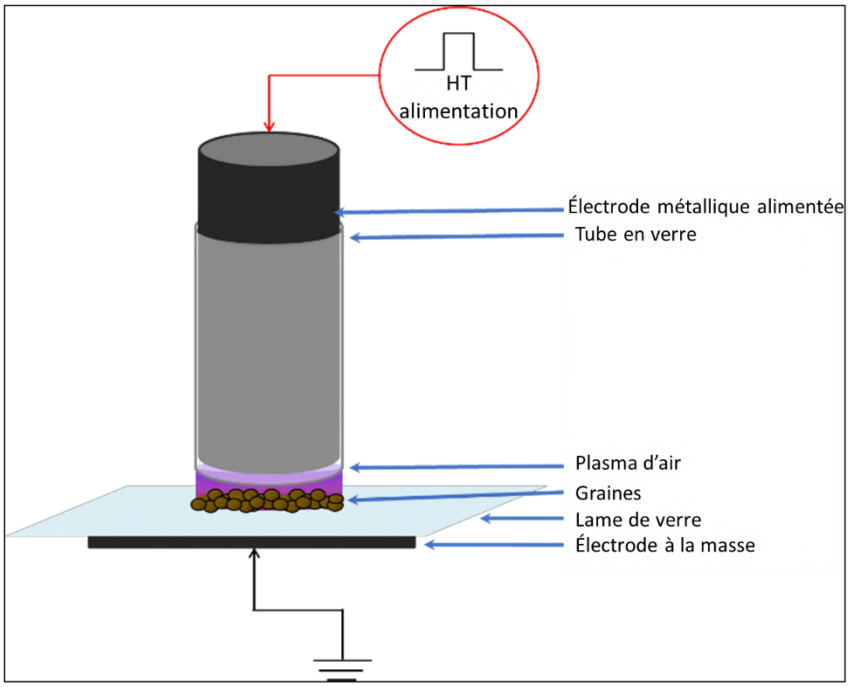


Figure II-1 : Schéma du dispositif plasma de décharge de barrière diélectrique (DBD) dans l'air ambiant. [89]

Les graines sont placées au sein du dispositif, c'est-à-dire entre les deux électrodes, là où se produit la décharge plasma. La distance entre les électrodes et les graines est quasi-nulle. De plus, les électrodes ne peuvent être éloignée de plus de 3 mm au risque de ne plus initier une décharge plasma uniforme à moins de disposer d'une alimentation pulsée capable de délivrer plusieurs dizaines de kV (ce qui n'est pas le cas de notre alimentation plafonnée à 10 kV).

II.2.2 Jet DBD de plasma d'hélium dans l'air ambiant

Le deuxième dispositif génère un jet de plasma à travers un tube de verre (diamètre intérieur de 2 mm) autour duquel sont placées deux électrodes annulaires, Figure II-2. Ici, le plasma est généré avec de l'hélium qui traverse le tube à un flux de 3 $L.m^{-1}$. Ce jet de plasma d'hélium entre en contact à la sortie du tube avec l'air ambiant et forme une plume plasma. Nous avons utilisé ce dispositif pour le traitement direct des semences mais aussi pour l'activation de l'eau.

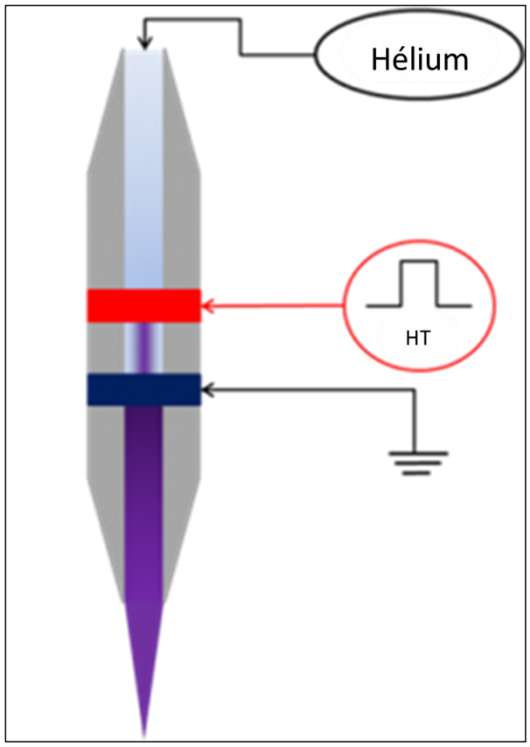


Figure II-2: Schéma du dispositif de jet de plasma d'hélium. Adapté de Bafoil et al, 2018 *[90]. Le gaz injecté dans le dispositif, ici l'hélium, est ionisé grâce aux électrodes et passe de l'état gazeux (en bleu) à l'état plasma (en violet).*

Ce deuxième dispositif est utilisé pour plusieurs types de traitement à la fois direct et indirect. Avec l'utilisation du jet plasma, les graines sont mises en contact avec la plume plasma en dehors du réacteur et ne sont pas présentes à l'endroit de la décharge. Ici la distance entre la cible et la décharge peut varier cependant plus la plume est éloignée de l'échantillon moins il recevra d'effets.

II.2.3 Corona multi-pointes dans l'air ambiant

Le dispositif de type Corona multi-pointes est basé sur la production d'une décharge de type pointe-plan, Figure II-3. Le plasma d'air est généré grâce à une ou plusieurs pointes reliées à la haute tension. En présence de plusieurs pointes, on forme un rideau de plasma dans l'air ambiant qui permet de traiter les graines lorsqu'elles sont placées entre les pointes et le plan. Dans le cas de ce dispositif, le logiciel NanoGen1 **(**Smart HV Pulses Generator, RLC Electronic, Clermont-Ferrand, France) est utilisé pour contrôler l'alimentation électrique pulsée qui a été utilisée comme pour les 2 autres dispositifs plasmas.

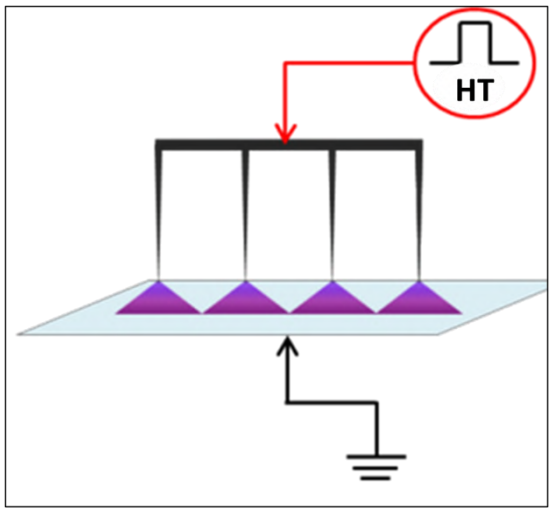


Figure II-3 : Schéma du dispositif de décharge corona. *Les quatre pointes en tungstène vont ioniser+ l'air ambiant et créer une forme de pyramide de plasma (zone violette).*

Le dernier dispositif mis en place permet le traitement d'échantillons plus grand de par la distance inter-électrode pouvant atteindre 2 cm. Dans cette géométrie, les échantillons sont placés à l'endroit de la décharge.

II.2.4 Alimentation électrique utilisée

L'alimentation impulsionnelle utilisée pour les trois dispositifs plasmas (FE-DBD, corona et Jet DBD He) possède les caractéristiques suivantes :

- Alimentation mono-polaire positive sous forme d'une impulsion ;
- Fréquence de répétition, durée et amplitude des impulsions réglables ;
- Temps de montée et de descente de l'impulsion de l'ordre de quelques dizaines de ns.

C'est une source de tension impulsionnelle à base de semi-conducteurs de puissance utilisant la technologie MOSFET ***(****de la série HTS-GSM 303-31* BEHLKE Power Electronics) permettant de supporter des tensions jusqu'à environ 30 kV et un courant jusqu'à environ 30A, ce qui est une protection utile en cas de claquage dans le plasma de la décharge électrique.

Cette alimentation impulsionnelle de type mono-polaire, est constituée de deux blocs associés en cascade incluant une alimentation haute tension continue (TECHNIX high voltage supply SR 1-3-300 de tension maximale de 10 kV, et un courant de 30 mA) et un bras d'onduleur constitué de deux interrupteurs rapides à base de MOSFET. La fréquence de répétition de l'impulsion de tension peut théoriquement monter jusqu'à plusieurs dizaines de kHz. Elle est fixée avec les autres paramètres de l'impulsion par un générateur d'impulsion T.T.L. permettant donc de choisir la durée de l'impulsion, sa fréquence de répétition et son rapport cyclique tandis que l'amplitude de cette impulsion carrée mono-polaire est fixée à la sortie de l'alimentation continue.

Les temps de montée et de descente de l'impulsion sont de l'ordre de quelques dizaines de ns. Cela représente le temps nécessaire pour que la tension de consigne soit atteinte lors de la montée ou soit coupée lors de la descente. Comme on peut le voir sur la Figure II-4 représentant la tension et le courant dans le cas d'un jet de plasma à base d'hélium, le courant de la décharge électrique générant le plasma est présent deux fois par impulsion de tension, ce qui veut dire que la décharge électrique s'allume deux fois par impulsion: une première fois lors de la montée, où elle se maintient uniquement durant les premiers instants du plateau de la tension pulsée (environ 150 à 200 ns), puis s'allume à nouveau pendant une durée équivalente durant la descente de l'impulsion de tension. Ce double allumage pour chaque impulsion de tension a été confirmé par imagerie rapide (1 image environ toutes les 5ns) dans les travaux antérieurs de l'équipe PRHE [65]

Pour les trois dispositifs plasmas décrits ci-dessus, les paramètres électriques ont été fixés comme suit sur la base de travaux déjà effectués [54] :

- Tension : 10 kV ;
- Fréquence : 10 kHz ;
- Durée de l'impulsion : 1 µs.

Ces paramètres ont été conservés pour l'ensemble des expériences effectuées tout au long de la thèse afin de ne pas ajouter des paramètres supplémentaires qui viendraient complexifier l'interprétation des résultats.

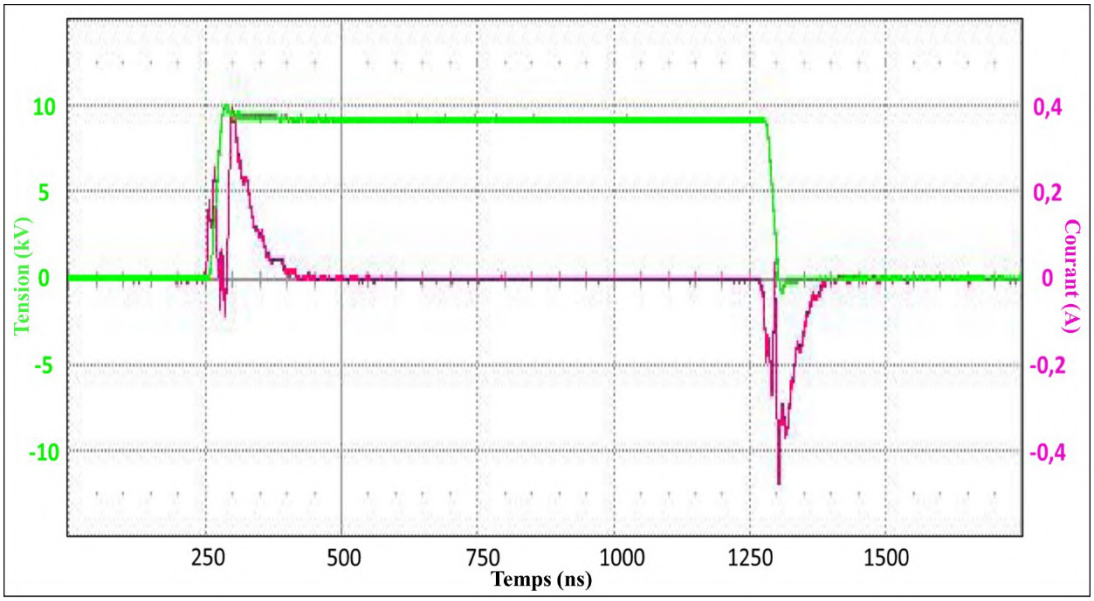


Figure II-4 : Courant et tension instantanés de la décharge DBD dans l'hélium générant le jet de plasma. *À noter que le courant inclut aussi le courant de déplacement (première bosse lors de la montée) issue de [65]*

II.2.5. Caractéristiques énergétiques et chimiques des plasmas utilisés

On commence par comparer les mesures électriques de tension et de courant instantané de décharge dans le cas des 3 dispositifs utilisés dans ce travail et ceci en condition d'utilisation, c'est-à-dire avec des graines placées en conditions de traitement, dans l'espace inter-électrodes dans le cas des dispositifs FE-DEB et corona multi-pointes et à 2 cm à l'extérieur du tube dans le cas du Jet DBD He.

Sachant que la fréquence est bloquée à 10 kHz et la durée de l'impulsion à 1 µs, on obtient pour environ 10 kV pour le courant instantané maximum Imax de décharge dans le cas des 3 dispositifs plasmas (Figure II-5A, II-5B et II-5C):

- Pour la FE-DBD, Imax ≈ 4,25 A pour une distance-inter diélectriques de l'ordre de 1mm
- Pour le dispositif corona multi-pointes (4 pointes et distance inter-électrodes ≈ 2 cm): Imax ≈ 0,15A
- Pour le Jet DBD He : Imax ≈ 0,5 A dans l'espace inter-électrodes, Imax chute à ≈0,03 à 2 cm du tube [62]

Ces courants mesurés sont très cohérents avec les résultats déjà obtenus dans le groupe PRHE [65-67] dans le cas du jet DBD d'hélium et des plasmas dans l'air. Le courant instantané est comme prévu le plus important dans le cas du dispositif FE-DBD (Figure II-5A) en raison de la distance inter-électrodes utilisée qui est la plus faible (environ 1 mm) et inversement Imax est le plus petit dans le cas de la corona multi-pointes (Figure II-B) en raison de sa distance inter-électrodes la plus élevée (1 cm) si on se place dans la zone de décharge électrique dans l'espace inter-électrodes des 3 dispositifs. Mais si on se place dans les conditions de traitement, c'est dans le cas du jet DBD He à 2 cm de la sortie du tube (Figure II-C) que le courant Imax est le plus faible.

Dans ce dernier cas (Figure II-C), on constate que le courant instantané du jet DBD He à 2 cm de la sortie du tube est décalé temporellement par rapport à celui mesuré directement dans la zone de décharge qui reste inclus à l'intérieur de la durée de l'impulsion (Figure II-4), d'ailleurs c'est aussi le cas des 2 autres dispositifs FE-DBD et corona multi-pointes (Figure II-5A et II-5B). Ce décalage qui se fait avec un temps de retard de l'ordre de quelques centaines de ns pendant la montée du courant indique que le champ de charge d'espace à 2 cm est formé avec un retard temporel par rapport au début de l'impulsion (ce retard d'environ 300 ns correspond au temps nécessaire à l'onde d'ionisation pour arriver à la position 2 cm le long de l'axe du tube) et la longue décroissance du courant instantané indique que le champ électrique de charge

d'espace à 2 cm du tube reste actif pendant tout ce temps où la charge d'espace (électrons et ions en présence) se maintient à un niveau suffisant pour permettre un champ de charge d'espace à 2 cm toujours capable de provoquer des avalanches électroniques se traduisant par ce courant instantané observé qui décroit lentement.

En résumé, ces mesures tension-courant- instantanées qui sont un très bon indicateur de la puissance dissipée pour allumer la décharge et générer le plasma (environ **4W** pour générer je Jet DBD He, **10 W** pour la FE-DBD et **0,5W** pour le corona multi-pointes), ne sont pas du tout suffisantes pour donner la bonne information ni sur l'énergie (ou le flux de puissance) déposée sur les graines ni sur la nature et la quantité des espèces RONS qui sont entrées en interactions avec les graines. C'est pourquoi, j'ai ajouté le tableau II.1 dans lequel j'ai mis notamment des informations quantitatives sur les espèces produites et les ordres de grandeur du champ électrique, de la puissance dissipée nécessaire à la génération le plasma et sur le flux de puissance plasma (ou d'énergie) déposée sur les graines.

Les mesures ont été effectuées en présence de graines ou d'eau, si la présence de l'eau a un effet certain sur les mesures cour/tension et donc sur les propriétés du plasma, il est à noter que la présence de graines ne change pas dans nos conditions expérimentales les mesures de courant/tension ce qui veut dire la présence de graines *d'A. thaliana* ne semble pas affecter les propriétés des plasmas. Mais ceci devrait être confirmé une étude paramétrique plus fine non effectuée dans le cadre de cette thèse.

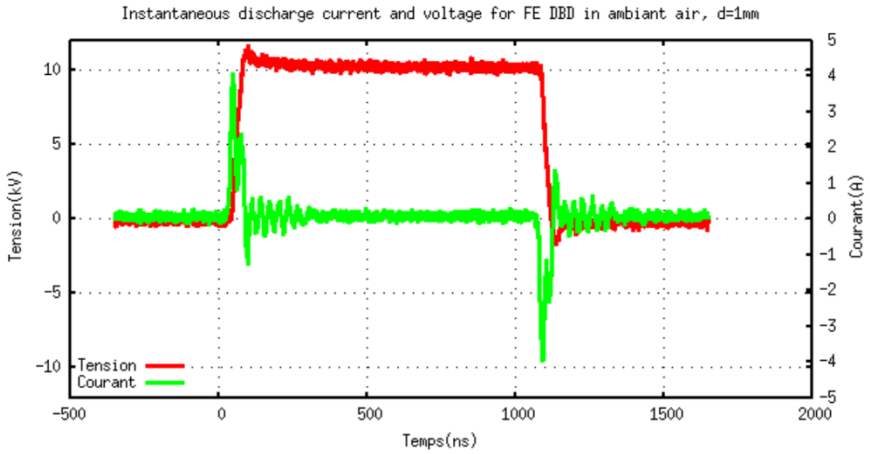


Figure II-5A : Tension pulsée et courant instantané mesurés sur le dispositif FE-DBD

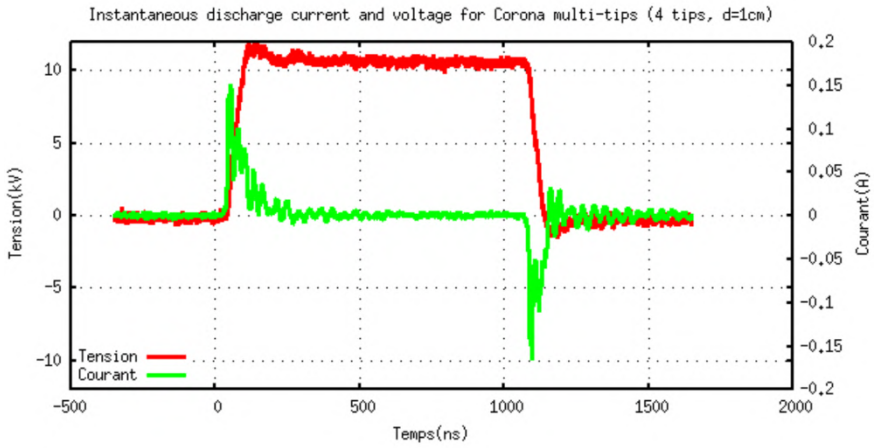


Figure II-5B : Tension pulsée et courant instantané mesurés sur le dispositif corona multi-pointes

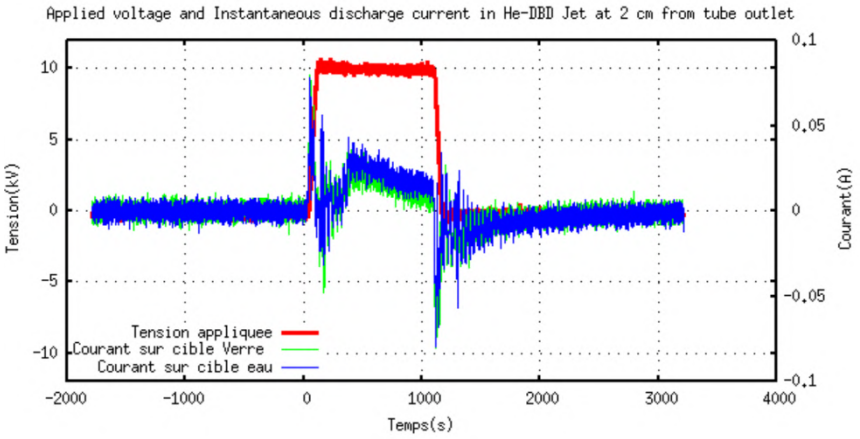


Figure II-5C : Jet DBD He à 2 cm : courant instantané sur une cible d'eau (courbe bleue) et diélectrique (verre, courbe verte) [66]

Le Tableau II-I, issu des travaux de l'équipe PRHE [67-68] donne les espèces chimiques produites par les 3 types de dispositifs plasmas utilisés dans le cadre de cette thèse. Ce sont ces espèces chimiques ou en tout cas une partie d'entre elles qui peuvent être actives lors du traitement plasma sur les graines ou qui sont générés lors de l'activation de l'eau (PAW).

Dans le cas du jet DBD d'Hélium, on observe qu'il peut émettre aussi bien des UV (A, B et C) que des électrons et des ions du gaz porteur (He) ou de l'air ambiant ainsi que des métastables (d'hélium mais aussi d'air). Ces émissions ayant une énergie interne importante et participant activement aussi bien à la propagation du jet de plasma dans l'air ambiant et qu'à la formation des espèces actives de courte (états radiatifs) et aussi de plus longue durée de vie (comme par exemple $OH^{\cdot}$, O_3, H_2O_2, NO_3, etc.) qui sont les autres RONS jouant très souvent un rôle essentiel dans les traitements qui nous intéressent. Le champ électrique de charge d'espace à environ 2 cm de la sortie du tube (endroit où on fait les traitements plasma) est plutôt assez

faible (environ 15 Td ou plus avec 1 Td=10^{-17} V.cm^2 [65]) et les densités de la plupart des espèces indiquées sont plutôt faibles (généralement < 10^{12} cm^{-3} à l'exception des électrons qui est proche de 10^{13}cm^{-3} et celles des atomes d'oxygène qui peut être proche de 10^{14} cm^{-3}). Ceci est synonyme d'un plasma faiblement ionisé (degré d'ionisation c'est-à-dire le rapport entre la densité des électrons et des neutres < 10^{-6}) tandis que la température de la quasi-totalité des espèces lourdes (ions et neutres) reste proche de la température ambiante à l'exception de celle des électrons qui peut atteindre une énergie moyenne de l'ordre de 3 eV.

Dans le cas du plasma de décharge couronne en forme de jet (sans contre-électrode en face de la pointe et alimenté en DC), [91] déjà testé pour le traitement des graines mais dont les résultats n'ont pas été retenus car moins intéressants que celle du plasma corona multi-pointes, on retrouve la plupart espèces formées à partir des processus dissociation/recombinaison des molécules de l'air (azote et oxygène) mais avec des concentrations pouvant aller jusqu'à 10^{13} cm^{-3} y compris pour les RONS et qui pour la plupart sont donc environ 10 fois supérieure à celles du jet DBD de plasma d'hélium, le champ électrique régnant dans la zone de traitements des graines est également faible (une quinzaine de Td ou Townsend) donnant ainsi des températures des espèces lourdes proches de la température ambiante et une température électronique équivalente à celle du jet DBD d'hélium. En revanche, dans le cas de la décharge couronne multi-pointes [92], le plasma corona est formé entre les pointes alimentées cette fois ci en régime pulsé et une contre-électrode en forme de disque reliée à la masse. Les densités des particules chargées et celles des particules à courte et longue durée de vie s'en trouve singulièrement renforcée en raison du champ électrique moyen qui devient au moins 10 fois plus important que celui du jet corona. C'est ainsi que les densités de certaines espèces actives peuvent dépasser 10^{15} cm^{-3} au niveau de l'électrode de masse où sont placées les graines à traiter à une distance de l'ordre du cm voire un peu plus ce qui permet de traiter des graines de tailles plus importantes que le dispositif FE-DBD, où la séparation inter-électrodes entre le diélectrique en contact avec la haute-tension pulsée et le diélectrique couvrant l'électrode masse est de l'ordre du mm uniquement, limitant ainsi le traitement FE-DBD aux cas des graines de petites tailles comme l'Arabette, à moins de disposer d'une alimentation capable de délivrer plusieurs dizaines de kV.

Dans le cas du dispositif FE-DBD, on voit dans le tableau II-1 que les densités des espèces actives sont bien plus grandes que celle par exemple du jet DBD d'hélium à 2 cm. Elles sont aussi variées que dans le cas du corona multi-pointes ou du jet corona ou du corona multi-

pointes et ont des densités pouvant dépasser 10^{15} cm^{-3} dans les structures filamentaires présentes dans ce type de décharges, d'ailleurs comme dans les décharges générées par les 2 autres dispositifs. En fait les densités, le champ électrique et les températures des particules présentes dans le plasma d'air FE-DBD sont équivalents à ceux du plasma d'air généré par le dispositif corona multi-pointes mais avec un champ électrique un petit peu plus faible (quelques centaines de Td contre plusieurs centaines de Td voire environ 1000 Td dans le cas du corona multi-pointes) et des énergies des électrons également un peu plus importantes dans le cas du corona multi-pointes (proche de 10eV en tête du streamer contre environ une grosse moitié dans le cas FE-DBD).

C'est pour toutes ces raisons d'ordre énergétique (champ électrique et densités de courant et d'énergie des électrons) et chimiques (RONS produits) qu'on a observé comme on le verra dans le chapitre 3, la même efficacité de germination lorsqu'on traite les graines d'arabette durant 15 min avec le dispositif FE-DBD que durant 1,5 min avec la corona multi-pointes. C'est en effet une question de dose plasma (en terme énergétique ou de puissance déposée sur la graine qui dépend du champ électrique et de la densité du courant) et de nature et quantité de RONS actifs qui imposent une durée du traitement et qui fait qu'en dessous de cette durée le traitement plasma est peu efficace et qu'en dessus le traitement peut devenir nocif pour la graine et par conséquent peut aller jusqu'à détruire ses cellules primordiales pour la germination. Dans les travaux précédents de l'équipe (Plewa et al [102]) la dose énergétique du plasma a été déjà estimée à l'aide d'un modèle simplifiée du jet DBD He à 2 cm où le flux de puissance plasma est de l'ordre **0.5 mW/cm²**. Compte tenu des ordres de grandeurs relatifs des densités de courant (produit de la densité des électrons par leur vitesse de dérive) et du champ électrique pour les 2 autres dispositifs, ce flux de puissance plasma peut être approximativement estimé comme étant de l'ordre d'environ **50 mW/cm²** pour le FE-DBD et **100 mW/cm²** pour le corona-multi-pointes.

Tableau II-1 Ordre de grandeur de l'énergie, du champ électrique et des espèces actives, à longue et à courte durée de vie, générées par les 3 dispositifs plasmas à basse température à pression atmosphérique [67-68]

Jet de plasma d'hélium (la concentration en espèce active n'excède pas $10^{12}cm^{-3}$)	NOγ→UVC, OH(A-X) →UVB, N_2(SPS) →UVA, N_2^+(FNS); états radiatifs : He_2*, He*, O*, N*, H*, États métastable : He(2^1S), He(2^3S), N_2 ($A^3\Sigma_u^+$), etc. 10^{11} to 10^{12} cm^{-3} Particules chargées : électrons, O_2^-, He_2^+, He^+, N_2^+, N_4^+, O_4^+, etc. 10^{11} to $10^{12}cm^{-3}$ Radicaux et espèces neutres à longue durée de vie : NO, NO_2, NO_3, OH, HO_2, O_3, H_2O_2 <$10^{12}cm^{-3}$ Champs électriques faibles (environ 15 Td à 2 cm) Énergie dissipée pour initier la décharge : proche de 4 W (environ 600 µJ d'énergie) Flux d'énergie plasma : ≈ 0.5 mW/cm^2
Corona multi-pointes dans l'air ambient (la concentration d'espèces actives est proche de $10^{14}/10^{15}cm^{-3}$ à l'avant du streamer)	N_2(SPS) →UVA, N_2^+(FNS), N_2(FPS) and NO_2 continuum → émission visible États métastables : N_2 ($A^3\Sigma_u^+$), $O_2(a^1\Delta_g)$, etc. États radiatifs : $O_2(b^1\Sigma^+_g)$, N*, O* Concentration élevée de radicaux et des neutres réactifs à longue durée de vie : NO, NO_2, NO_3, OH, HO_2, O_3, H_2O_2, environ 10^{14} ou plus Forte concentration en particules chargées : électrons, O_2^-, N^+, O^+, N_2^+, N_4^+, O_4^+, etc. environ $10^{14}cm^{-3}$ ou plus. Champs électriques très élevés (plusieurs centaines jusqu'à 1000 Td) Puissance dissipée pour allumer la décharge : 0,5 W (environ 60 µJ pour l'énergie dissipée) Flux de puissance plasma: environ cent (≈100) mW / cm^2
FE-DBD dans l'air utilisant des tissus vivants comme électrode flottante (Concentration en espèces actives autour de 10^{14} cm^{-3})	N_2(SPS) →UV-A, N_2^+(FNS), N_2(FPS) et NO_2 continuum → émision visible États métastables : N_2 ($A^3\Sigma_u^+$), $O_2(a^1\Delta_g)$, etc. 10^{14} à 10^{15} cm^{-3} États radiatifs : $O_2(b^1\Sigma^+_g)$, N*, O* Concentration élevée de radicaux et des neutres réactifs à longue durée de vie : NO, NO_2, NO_3, N_2O_5, OH, HO_2, O_3, H_2O_2, environ 10^{14} cm^{-3} Forte concentration en particules chargées : électrons, O_2^-, N^+, O^+, N_2^+, N_4^+, O_4^+, etc. 10^{14} à 10^{15} cm^{-3} Champs électriques élevés (quelques centaines de Td) Puissance dissipée pour allumer la décharge : 10 W (environ 1000 µJ pour l'énergie dissipée) Flux de puissance plasma: ≈ quelques dizaines (≈50) de mW / cm^2

II.3 Le matériel biologique

II.3.1 *Arabidopsis thaliana* : une plante modèle

La plante *Arabidopsis thaliana* est utilisée pour caractériser les effets du plasma. *A. thaliana* est une plante à fleurs utilisée comme organisme modèle en biologie végétale. Cette plante fait partie de la famille du colza et de la moutarde : les Brassicaceae. Arabidopsis n'a aucune importance économique puisque qu'elle n'est pas utilisée en dehors de la recherche, cependant elle possède un certain nombre d'avantages : un génome relativement petit (125 Mb) qui est entièrement séquencé, ses 5 chromosomes étant entièrement annotés ; son cycle de vie est rapide ; sa culture est adaptée aux conditions de laboratoire et enfin il y a une accessibilité à un grand nombre de lignées mutantes. Tous ces avantages font d'Arabidopsis un organisme modèle pour la biologie cellulaire et moléculaire des angiospermes qui fait dire à certains que l'*A. thaliana* est à la biologie végétale ce que la souris ou la drosophile est à la biologie animale.

Pour son utilisation dans cette étude, en plus des avantages précédemment cités, la taille réduite de ses graines (environ 500 µm) permet l'utilisation de la FE-DBD pour le traitement. En effet, une graine plus grosse ne permet pas l'ignition du plasma avec ce dispositif car l'espace entre les électrodes serait trop grand.

Pour approfondir la compréhension des effets des plasmas sur la germination, les mutants d'*A. thaliana* suivant ont été utilisés : *gl2*, *gpat5*, *ttg1* et *tt8*. Ces derniers sont des mutants affectés dans le manteau de la graine.

- Les graines du mutant *gl2* (CS2106121) ont un manteau (couches protectrices de l'embryon) malformé ;
- Les graines du mutant *gpat5* (CS880727) sont plus fragiles à cause de leur manque de subérine et de cutine ;
- Les graines du mutant *ttg1* (CS2105595) ont un déficit en pigment à la surface des graines ce qui va influencer leur germination.
- Les graines du mutant *tt8* (CS2105594) vont également manquer de pigment. De, plus, ces gènes fonctionnent de concert via l'intermédiaire du complexe GL2, TT8 et TTG1 dans l'expression du gène BAN qui contrôle la production de pigments dans l'endothélium des graines.

Tous ces génotypes ont été sélectionnés de par leurs mutations affectant précisément le manteau de la graine qui est en contact direct avec le plasma et qui a une fonction essentielle dans la protection de l'embryon mais aussi dans le contrôle de la germination.

II.3.2 Autres graines d'intérêt agronomique étudiées

Durant cette étude, une première investigation, présentée dans la dernière partie de cette thèse, a également été faite en traitant par plasma plusieurs graines d'intérêt agronomique comme le lin (*Linum usitatissimum*, variété Alyzée, Agronutrition, Carbonne FRANCE), le colza (*Brassica napus*, variété Nelson, Syngenta, Gaillon FRANCE)et le soja (*Glycine max*, Agronutrition).

De plus, dans le but d'en savoir un peu plus les effets des plasmas sur la mouillabilité de la surface des graines, des graines de Caméline (*Camelina sativa*) sont utilisées pour effectuer les expériences d'angle de contact.

II.3.3 Traitement des graines

En fonction de l'objectif fixé, les graines ou les plantes ont été traitées directement et indirectement au plasma respectivement.

(i) Le traitement direct consiste à mettre les graines au contact du plasma. Trois dispositifs ont été utilisés.

- Pour le dispositif FE-DBD et le jet de plasma d'hélium, le temps de traitement a été fixé à 15 minutes, après des études préalables [50]. Environ 500 graines d'*A. thaliana* sont placées sur une lame de verre pour la DBD et mises en contact avec le tube avant ignition du plasma.
- Pour le jet d'hélium les graines sont déposées dans un tube Eppendorf à fond rond de 2 mL, la distance entre le jet et les graines est fixée à 2 cm.
- Concernant le dispositif corona, le temps du traitement varie de 30 secondes à 15 minutes en fonction de la taille et de la quantité des graines traitées.

(ii) Le traitement indirect est fait par l'intermédiaire d'eau. Dans ce type de traitement, le jet de plasma est utilisé pour traiter de l'eau (eau activée par plasma ou PAW). L'eau peut être soit du robinet soit distillée. Le traitement a été effectué par fraction de 30 mL exposés pendant 15 minutes au jet plasma. Après activation le PAW est utilisé pour les tests de germination ou l'arrosage des plantules pour l'analyse du développement. Afin de réduire un biais concernant la qualité de l'eau, le volume nécessaire pour la durée de l'expérimentation sur la croissance des plantes a été prélevé en une fois et stocké à 4°C. De plus, après traitement l'eau est stockée à l'obscurité et à 4°C pour limiter l'altération des RONS.

II.4 Les plans expérimentaux

II.4.1 Test de germination

Pour déterminer l'effet des plasmas sur la germination, des tests de germination sont réalisés selon différentes conditions.

Le taux de germination est quantifié entre 24h et 62h pour certaines conditions, 3 stades sont pris en compte : aucune rupture des enveloppes (Figure II-A), rupture de l'enveloppe externe (testa, Figure II-B) et rupture des deux enveloppes de la graine (testa et endosperme, Figure II-C).

Les tests de germination sont effectués dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre dans lesquelles sont placés des cercles de papier Whatman ™ (papier de chromatographie Chr 3MM : épaisseur moyenne : 0,34 mm). Le papier est préalablement imbibé de 0,5 ml d'eau distillée. Les boîtes sont ensuite scellées grâce à de l'adhésif ANAPORE afin de maintenir une humidité maximum. La germination a lieu dans une chambre de culture dans des conditions fixées (40 % d'humidité, température 22 °C / 20 °C, photopériode 16 h / 8 h, 45-50 µE).

Après traitement, entre 150 et 300 graines d'*A. thaliana* sont réparties par boite. Des graines non traitées sont utilisées comme contrôle pour déterminer l'effet du traitement plasma. Chaque expérience a été répétée au moins trois fois de façon indépendante.

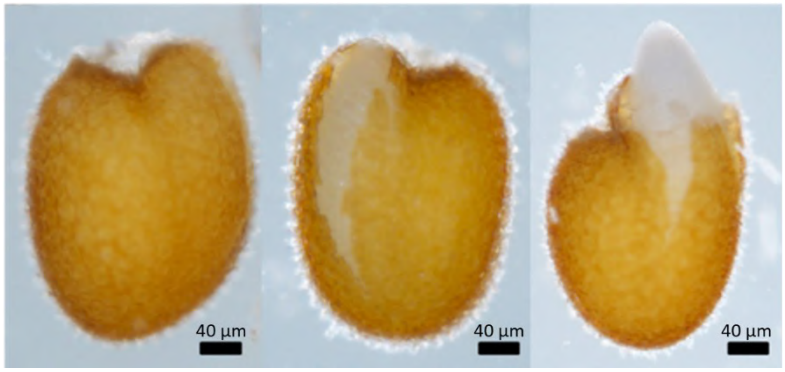


Figure II-6 : Photos (X340) de graines d'*A. thaliana *à trois stades de germination *: graine imbibée non germée (A) ; graine présentant une rupture du testa (B) ; graine présentant une rupture des deux enveloppes (testa et endosperme) (C).*

De plus afin d'observer ces effets en condition de stress osmotique ou hydrique, des graines traitées ou non sont déposées sur papier Whatman préalablement imbibé d'une solution de NaCl (0, 25, 50, 75 ou 100 mM) ou de PEG6000 (0, 5, 10, 15 et 20 %) (Polyéthylène glycol, BioUltra, Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Des graines non traitées et déposées sur les différentes conditions de milieux sont utilisées comme contrôle.

Concernant les effets directs du traitement plasma, nous avons aussi cherché à déterminer si ces effets positifs perduraient dans le temps. Pour cela, les graines ont été semées jusqu'à 9 jours après le traitement plasma : t0 = le jour du traitement plasma ; t2 = deux jours après le traitement ; t7 et t9 soit 7 ou 9 jours après le traitement avec la FE-DBD d'air. Des graines non traitées et conservées jusqu'à 9 jours sont utilisées comme contrôle pour déterminer l'effet du traitement plasma. Chaque expérience a été répétée au moins trois fois de façon indépendante.
Pour déterminer les effets indirects du plasma sur la germination, le papier est imbibé d'eau du robinet (tap) ou d'eau activée par plasma (PAW) et les graines sèches y sont déposées directement.

II.4.2 La microscopie

Afin d'analyser les effets du traitement au plasma sur la surface des graines, différentes techniques d'imagerie ont été utilisées.
Dans un premier temps, les modifications de la surface des graines d'*A. thaliana* sont observées grâce à des images au microscope électronique à balayage. Les graines sont fixées à la surface d'un talon en aluminium à l'aide du ruban adhésif de carbone et une pulvérisation de ~ 10 nm de platine est réalisée à la surface. Le microscope électronique à balayage (MEB) utilisé est un Quanta 250 FEG (FEI Company). Les paramètres sont fixés comme suit : une tension d'accélération de 5 kV, une taille de spot de 3,0 et, une pression de 3,50 x 10^{-4} Pa. Les observations sont faites tout de suite après le traitement ainsi que 7 jours après sur une trentaine de graines exposées ou non au plasma d'air avec la FE-DBD
Dans un deuxième temps, des images sont réalisées à l'aide d'un microscope confocal monophotonique (Leica SP8). Les caractéristiques optiques sont réglées comme suit : laser d'excitation à 488 nm ; réflexion de 484 nm à 494 nm ; fluorescence 505–560 nm et 570–640 nm. La lentille utilisée est un 10×0,3 à sec. La distance entre les plans focaux est fixée à 3 µm. Durant ces observations, les graines ont été colorées avec un composé fluorescent, auramine-O (Sigma Aldrich) à 0,003 % dans de l'éthanol à 70 %. La coloration est réalisée en plongeant les graines traitées et également les graines contrôle (30 graines par observation) dans la solution pendant 5 min. L'auramine-O permet la localisation de différents composés hydrophobes tels que les lipides.

II.4.3 L'analyse de la surface

i – La perméabilité

Le test de perméabilité des graines d'*A. thaliana* a été réalisé en utilisant du chlorure de triphényltétrazolium 2,3-5 (rouge de Tetrazolium, Sigma Aldrich). Ce sel a la propriété d'être réduit en formazan de couleur rouge lorsqu'il traverse la membrane plasmique.

Cent µg de graines contrôles et traitées avec le plasma à basse température ont été immergées dans 1,5 mL de solution aqueuse de rouge de tétrazolium à 1 % et mise à incuber pendant 40 h à 28 °C. Les graines sont ensuite rincées à l'eau distillée trois fois afin d'enlever tous les restes de réactif dans la solution et broyées dans 1,5 ml d'éthanol à 95 % à l'aide de 3 billes en acier dans un broyeur à bille Retsh pendant 3 minutes à 30 $rt.s^{-1}$. Après centrifugation à 3500 tr / min pendant 3 min, le formazan contenu dans le surnageant a été évalué en mesurant l'absorbance à 492 nm. L'absorbance est alors corrélée à la perméabilité de la graine. Le test a été répété au moins trois fois de façon indépendante (réplicas biologiques). Des réplicas techniques ont été effectués pour chaque test.

ii – Analyses lipidiques

Afin de déterminer la nature des modifications de surface, des analyses lipidiques ont été effectuées à partir de graines contrôles et traitées.

Dans un premier temps, 100 mg de graines d'*A. thaliana* traitées ou non sont placés dans un tube en verre avec 1 mL de chloroforme pour solubiliser les composés lipidiques de surface. Les tubes sont vortexés pendant 1 min puis le chloroforme est récupéré. Après évaporation du chloroforme, 0,5 mL de BF3 Méthanol est ajouté puis les tubes sont incubés 5 minutes à 60 °C. 1 mL d'eau est ajouté pour stopper la réaction du BF3. L'extraction des lipides est faite grâce à 1 mL d'éther diéthylique (étape répétée trois fois), les tubes sont ensuite séchés à l'aide d'une fontaine à azote. La dérivation des lipides extraits est faite grâce à du triméthylsilyle (TMS) puis l'incubation de 15 minutes à 80 °C est réalisée. Une fois terminé, les tubes sont séchés puis repris dans 0.1 mL de mélange hexane-éthanol 50 %.

Les échantillons (1 µL) sont analysés en GCMS (chromatographie en phase gaz/Spectrométrie de Masse), à l'aide d'un analyseur TSQ quantum thermo scientific avec un type « full scan » en mode spitless. Le cycle utilise le gradient suivant : 100 °C pendant 2 minutes, puis une augmentation de 20 °C par minute jusqu'à 190 °C, et 6 °C par minute jusqu'à 270 °C suivi de 15 °C par minute jusqu'à 340 °C pendant 2 minutes. La température de l'injecteur était de

230 °C, celles de la source et de la ligne de transfert de 250 °C. L'énergie de collision est fixée à 70 eV, et la gamme de masse (m/z) de 50 à 650.

iii- Le mucilage

La couche de cellules épidermique des graines d'*A. thaliana* relargue un gel polysaccharidique, le mucilage. Dans le but de contrôler l'intégrité fonctionnelle de ces cellules, l'observation de l'état du mucilage après traitement au plasma est nécessaire.

Les graines *d'A. thaliana* sont placées dans un tube Eppendorf avec de la solution de Tris (0.01 M) puis placées sur un agitateur pendant 1 heure à 250 rpm. Après rinçage à l'eau distillée, une solution de rouge de ruthénium à 0,02% est ajoutée puis les tubes sont agités une nouvelle fois pendant 1 h à 250 rpm. Cette double agitation permet de colorer uniquement le mucilage adhérent aux graines. Les graines sont une nouvelle fois rincées puis observées à l'aide d'un stéréo-microscope nikon smz18 et un anneau de LED permettant l'éclairage supérieur des échantillons.

Des analyses d'images sont effectuées par la suite grâce au logiciel Fiji qui permet de calculer l'aire du mucilage en fonction de l'aire de la graine.

iv- L'angle de contact

Pour les expérimentations sur l'angle de contact, des graines de *Camelina sativa* sont utilisées. Ces graines sont très proches de celle d'*A. thaliana* en termes de morphologie mais plus grande (2 à 3 mm) permettant la faisabilité de cette expérimentation.

Les graines traitées au plasma avec la FE-DBD pendant 15 min ou les graines contrôles sont placée une à une sur un support muni de scotch® double face afin de les fixer. Une goutte 0.3 µL d'H_2O est déposée à l'aide d'une pipette Eppendorf® de 0.2-1 µL.

Des photos et vidéo des graines sont prises avant pendant et après le dépôt de la goutte. Les images sont acquises avec une picamera V2 (caméra couleur 8 Mpixels) montée sur un Raspberry Pi 2B. Les films sont acquis à 90 images/secondes (90 fps) en format 640x480 pixels pendant 7 secondes. La lentille est ajustée pour être à 1 cm environ de la graine ce qui donne une taille de pixel de 5,065µm. L'analyse des images est ensuite effectuée à l'aide du logiciel Fiji® et un test de Mann Withney.

II.4.4 Visualisation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'activité peroxydase

Le plasma va produire de nombreuses espèces réactives de l'oxygène (ROS)[63]. Ces espèces vont donc entrer en contact avec les graines pendant le traitement. Afin de les visualiser, une coloration au NBT (Nitro Blue tetrazolium chloride, Sigma-Aldrich) a été utilisée, le précipité formé va mettre en évidence la présence d'ion superoxyde.

Cent mg de graines sont plongés dans une solution aqueuse à 2 mM de NBT et incubées pendant 30 min à température ambiante dans l'obscurité afin de ne pas altérer les ROS qui se dégradent à la lumière. La présence de l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) est visualisée par une coloration bleue à la surface des graines.

Pour réguler l'homéostasie des ROS, les plantes vont produire des peroxydases de classe III [39]. La localisation de l'activité de ces peroxydases est réalisée par l'oxydation du guaïacol. Les graines sont incubées dans l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min dans 1 mL de tampon phosphate 200 mM, pH 6,1, contenant 0,125 % de guaïacol. (Fluka-Sigma-Aldrich, Steinheim, Suisse) et 150 µL de 11 mM de peroxyde d'hydrogène. L'oxydation du guaïacol par l'activité peroxydase forme un précipité brun de tétra-guaiacol qui permet sa visualisation.

Par la suite, les graines sont directement observées grâce à un stéréomicroscope Zeiss Axiozoom V16 et une caméra couleur Zeiss HRC.

II.4.5 Le développement

L'effet de traitement indirect du plasma à l'aide de l'eau activée par plasma (PAW) a été observé sur le développement des plantes. Pour ce faire des graines sont semées et cultivées en chambre de culture (75 % d'humidité, température 24 °C / 20 °C, photopériode 16h / 8h). Dix plantes sont étudiées par réplica et deux réplicas sont effectués. Elles sont arrosées à un intervalle de 2 à 3,5 jours entre 10 et 30 mL par semaine d'eau distillée activée au plasma ou non, d'eau du robinet activée au plasma ou non (toutes les plantes sont arrosées avec la même quantité d'eau mais cette quantité augmente en fonction des semaines). Afin de quantifier la croissance des plantes des photos sont prises à intervalles réguliers et différents paramètres tels que la taille de la rosette ou le nombre de feuilles sont notés.

Après avoir étudié le développement aérien en réponse au plasma, nous nous sommes intéressés à la croissance des racines. Des graines contrôles ou ayant subi un traitement de 15 minutes avec la FE-DBD sont semées dans des boites de Petri carrées de 12 cm^2 sur du milieu ½ MS qui apporte tous les nutriments nécessaires pour le développement des plantes. Elles sont placées verticalement pendant 7 jours. Des images sont prises tous les jours grâce à un scanner.

II.4.6 Les analyses de l'eau activée par plasma

Pour le traitement indirect des graines durant leur croissance, on utilisera pour leur arrosage de l'eau qui a été préalablement activée avec le jet DBD d'hélium comme indiqué sur la
Figure II-.

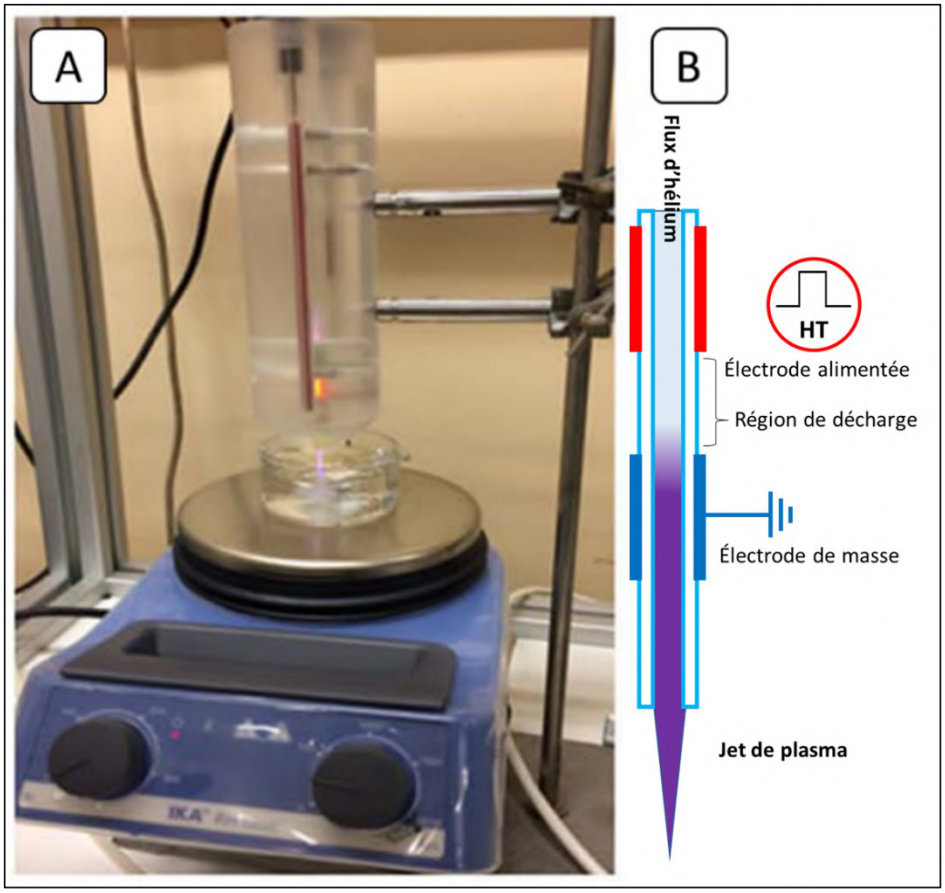


Figure II-7 Aperçu sur l'installation utilisée pour activer l'eau à l'aide du jet de plasma d'Helium. *Photographie de l'installation (A): la distance entre la sortie du tube et la surface de l'eau placée dans le bécher est fixée à 2 cm. Le bécher est posé sur un agitateur magnétique permettant de remuer régulièrement l'eau pendant les 15 min de son traitement par plasma. Schéma du dispositif de jet de plasma d'hélium (B).*

Le traitement par plasma est réalisé avec 30 mL d'eau (sans mise à la masse du bécher) pendant 15 min qui est une durée optimale choisie pour ce volume d'eau après plusieurs essais qui nous ont permis de constater que l'eau a été suffisamment activée par plasma. Ce traitement va induire de nombreuses réactions chimiques d'abord en phase gaz puis à l'interface gaz-liquide et surtout en phase liquide qui vont entrainer notamment la production d'espèces réactives d'oxygène et d'azote (RONS) variées qui seront discutées et en partie analysées dans la section III.4 Le développement des plantes.

Afin de quantifier certaines de ces espèces actives produites, l'eau est analysée grâce à aux différents kits de réactifs conditionnées en tubes pré-dosés (Orchidis Laboratoire, Champigny s/ Marne, France) qui permettent la détection des espèces par spectrophotométrie. Cette dernière est une méthode d'analyse quantitative ou qualitative qui mesure l'absorbance (densité optique) d'une solution et permet de remonter à la concentration de l'espèce étudiée grâce à la loi de Beer-Lambert. Plus l'échantillon sera concentré plus la densité optique (DO) sera importante. C'est le spectrophotomètre UVline 9100C d'Aqualabo avec une gamme spectrale allant de 320 à 1100nm et une bonne résolution optique (4nm) qui a été utilisé pour les quantifications. Grace au logiciel Spectralab de pilotage du spectrophotomètre, les concentrations des espèces étudiées sont directement affichées en unité absolue (par exemple en mg/L).

Dans cette étude, les espèces que nous cherchons à analyser sont incolores, pour pouvoir les quantifier, nous utilisons des kits de coloration. Ces kits vont réagir en fonction des espèces recherchées et colorer les solutions proportionnellement à la quantité d'espèce chimiques présentes.

Pour ces analyses, les espèces suivantes sont analysées : Nitrate (NO_3^-), Nitrites (NO_2^-), Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), Ammonium (NH_4^+), Carbonate de Calcium ($CaCO_3$), Hydrazine (N_2H_4) Potassium (P) et Ozone (O_3). Ces trois dernières n'étant présentes qu'à l'état de traces dans nos analyses.

Les mesures sont réalisées directement après le traitement au plasma et répétées sur 3 traitements indépendants pour chaque espèce analysée.

Chapitre III Résultats

III.1 Introduction

Dans le monde agricole, l'augmentation du taux et de la vitesse de germination mais aussi le contrôle de la qualité sanitaire des semences, sont des objectifs qui s'élèvent sans cesse pour réussir à couvrir la demande alimentaire croissante. L'objectif de ces analyses consiste donc à déterminer l'impact des plasmas froids générés avec de l'air ou de l'hélium grâce à différents dispositifs sur la germination ainsi que sur le développement d'*Arabidopsis thaliana* par l'intermédiaire d'eau activée par plasma.

Les études mises en avant précédemment montrent différents effets dépendants de la graine ou du dispositif utilisé. Ici, la graine de la plante modèle est utilisée afin de mettre en place des pistes pour la compréhension globale des effets des plasmas.

Pour ce faire, dans un premier temps, nous allons examiner les effets sur le génotype de référence Col-0. Nous utiliserons les deux méthodes de traitements (directe ou indirecte) afin de déterminer l'approche la plus efficace pour la stimulation de la germination.

Pour établir des réponses plus précises quant à l'effet des plasmas sur la germination, des mutants affectés dans le manteau de la graine de différentes manières (manque de pigment ou encore de subérine) sont utilisés.

Dans un contexte de changement climatique global, nous assistons à une augmentation de la salinité des sols mais aussi à une augmentation du stress hydrique dans certaines régions. De ce fait, il est important de voir si les effets des plasmas sont aussi observables dans des conditions de stress affectant la germination. En laboratoire l'utilisation du NaCl ainsi que du PEG permet de modéliser au mieux les stress hydriques et osmotiques qui peuvent se produire dans un sol.

À des fins d'applicabilité, il est nécessaire de déterminer la longévité des effets du traitement afin d'obtenir encore une fois des pistes de compréhension des mécanismes induits par le plasma.

Par la suite, nous chercherons à obtenir des informations plus précises sur les effets du plasma en regardant la surface des graines. Différentes méthodes d'observation sont mises en place (MEB et confocal) afin d'observer des changements.

En lien direct avec les changements sur la surface mais aussi sur la germination, la perméabilité des graines est testée. De là, une analyse des composés de surface est réalisée.

À la surface des graines d'*A. thaliana*, on retrouve une couche de cellules sécrétrice du mucilage, un gel polysaccharidique relargué autour de la graine dès son imbibition. Dans cette partie nous chercherons à savoir si le traitement au plasma altère ou non le relargage du mucilage.

Le plasma produit beaucoup de RONS qui peuvent se fixer sur les graines durant le traitement. De ce fait, une quantification (dans le plasma) et une visualisation (sur les graines) de ces espèces réactives est réalisée.

Dans une dernière partie, les effets du traitement via de l'eau activée par plasma (PAW) sont testés sur le développement d'*A. thaliana*. Des analyses de l'eau permettent de déterminer les espèces produites par le plasma et donc leurs effets sur la croissance des plantes.

III.2 Les effets sur la germination

III.2.1. Col-0 le génotype de référence

Dans un premier temps afin de diriger de plus amples expériences, les effets de différents traitements sur la germination de Col-0 sont examinés. Pour rappel le génotype Col-0 est le génotype de référence pour *A. thaliana*.

Nous allons observer, les effets des différents plasmas (FE-DBD et jet d'hélium) en traitement direct et de l'eau activée en traitement indirect, et déterminer quels sont les traitements les plus efficaces,

Figure III-1.

Les graines traitées avec le plasma d'air (FE-DBD) montrent une augmentation significative du taux de la rupture des deux enveloppes externes de la graine (testa et endosperme) à 24 h et 40 h après l'imbibition par rapport aux graines non traitées. Pour le traitement avec le jet de plasma Hélium, l'effet sur la germination n'est significatif qu'après 24 h avec une augmentation de la rupture du testa (p-valeur = 0,01068).

L'activation de l'eau par plasma et la mise en contact de celle-ci pour la germination n'a en revanche aucun effet sur la rupture du testa ou de l'endosperme dans les conditions de l'étude. Cela peut être dû aux conditions de culture (en salle de culture in vitro, à la lumière, sur papier filtre) qui peuvent altérer les RONS présents dans l'eau activée par plasma.

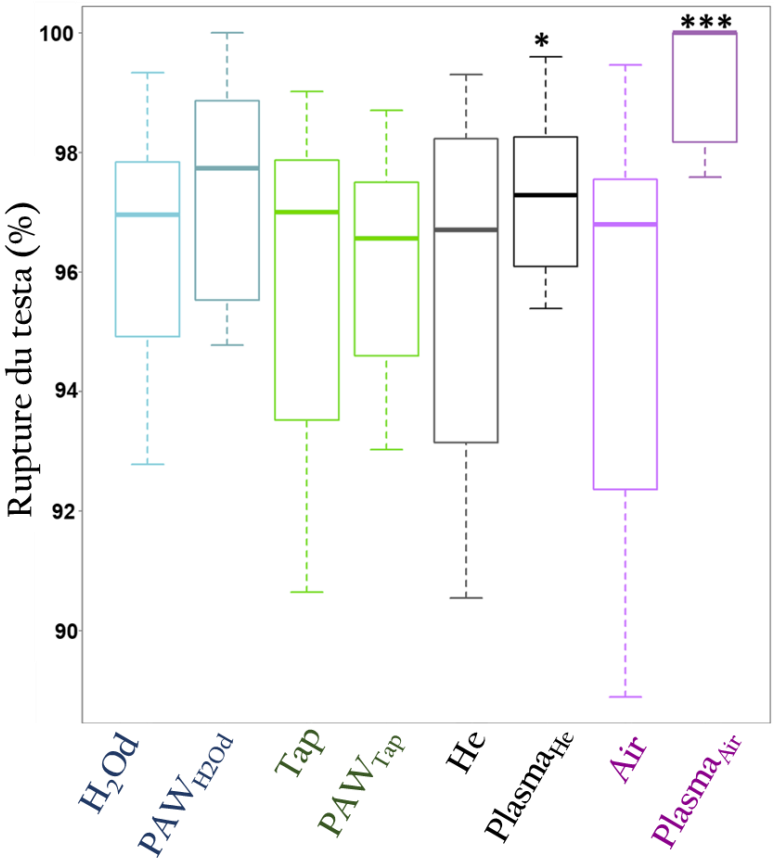


Figure III-1: Effet du traitement direct et indirect au plasma sur la germination des graines d'*A. thaliana. *Les boxplots montrent les effets des différents traitements sur la rupture du testa. Les observations sont faites sur quatre différents réplicas à t0 + 24h. Six cents graines comptées pour chaque répétition. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour la significativité entre les moyennes, la p-valeur est : .= 0,1 ; *= 0,05 ; ** = 0,005 ; *** = 0,002.*

Après ces expériences, il apparait donc que le traitement de 15 minutes avec la FE-DBD a l'effet recherché (augmentation du taux de germination) le plus important et c'est pour cela que les expérimentations suivantes sur les effets directs du plasma seront effectuées avec ce dispositif avec les mêmes paramètres opératoires

III.2.2 Les effets sur les différents mutants

Deux génotypes ont été choisis (*gl2* et gpat5) afin d'identifier plus précisément les effets du plasma sur les graines. Ces mutants sont affectés sur le bon développement du manteau de la graine. Or, comme cela a déjà été souligné, le manteau de la graine a un rôle essentiel dans la protection de l'embryon et dans le contrôle de la germination. Après avoir observé des effets positifs sur la germination de Col-0, il est donc intéressant de déterminer si ces différences sont encore observables sur les deux autres génotypes considérés.

De plus, les graines mutants *ttg1*et *tt8* sont aussi utilisés. Le gène TTG1 est requis pour l'accumulation d'anthocyanines dans les feuilles et les tiges. Il est aussi impliqué dans le contrôle de la spécification du devenir des cellules épidermiques. Le gène TT8 est un facteur de régulation qui agit dans une action concertée avec TTG1 sur la régulation des voies de biosynthèse de la proanthocyanidine et de l'anthocyanine.

Les gènes TTG1, TT8 et GL2 forme un complexe essentiel dans la régulation du gène BAN, ce dernier contrôle la synthèse des flavonoïdes dans l'endothélium des graines, des composés importants pour la protection de la graine.

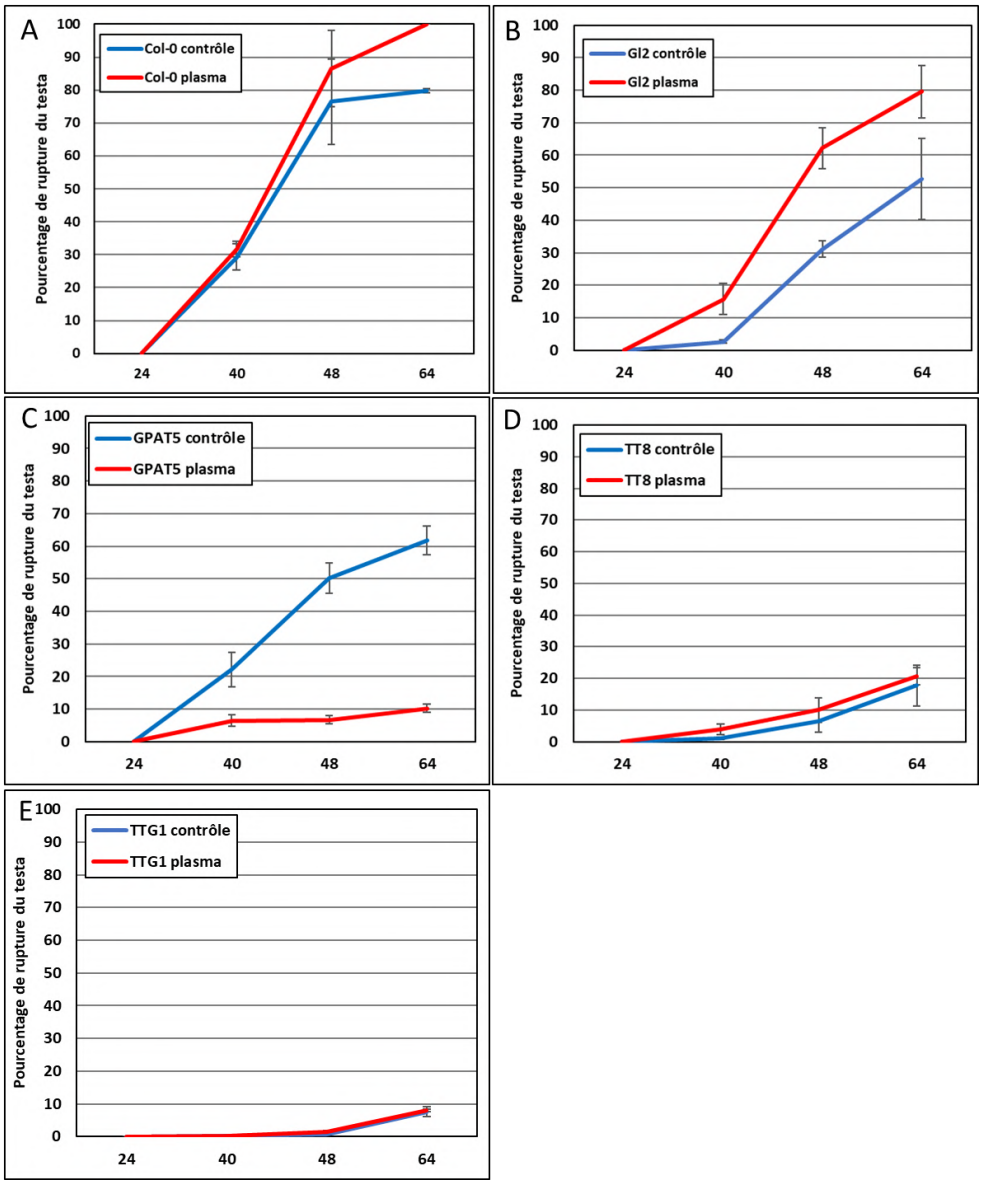


Figure III-2 : Effet du traitement au plasma d'air par la FE-DBD sur la rupture du testa de graines d'*A. thaliana *en fonction du temps. *Les courbes rouges représentent les graines traitées au plasma et les bleues les contrôles. L'effet du plasma sur la rupture du testa est toujours positif excepté sur gpat5. Les premières observations sont réalisées 24 h après mise en germination qui arrive le même jour que le traitement au plasma.*

La germination des différents mutants d'*A. thaliana* a été analysée et comparée à Col-0 (Figure III-2). Le taux et la vitesse de germination des graines des mutants *gl2* et *gpat5* sont considérablement réduits par rapport à ceux du Col-0 à 95 % à 50 % après 64 h. Malgré cela, le traitement au plasma augmente la germination des graines de *gl2*. Pour ce mutant, on peut observer jusqu'à deux fois plus de rupture du testa (Figure III-2B) à 48h de germination passant de 31 à 62 %.

Les mutants *tt8* et *ttg2* quant à eux ont une germination très faible par rapport au Col-0. L'augmentation du taux de rupture du testa dû au traitement plasma sur ces deux mutants n'est donc qu'une tendance visuelle sans significativité statistique (Figure III-2D et E).

III.2.3 La résistance aux stress

Après avoir mis en évidence les différents effets selon les génotypes des plantes, nous avons cherché à observer les effets en conditions stressantes.

Deux stress parmi les plus communs dans la nature ont été donc choisis : le stress salin et le stress osmotique. Dans le contexte du changement climatique mondial, l'effet du plasma à basse température sur la germination des graines sous stress salins ou osmotiques est très intéressant à analyser.

Pour ce faire, les tests de germination sont effectués en présence de NaCl (stress salin) ou de PEG (stress osmotique qui va mimer la difficulté d'accessibilité à l'eau). Ici, les génotypes sauvage Col-0, et les deux mutants *gpat5* et *gl2* sont utilisés. Comme cela a déjà été souligné, les mutants *gl2* et *gpat5* ont été choisis car ils ont un manteau altéré par rapport au sauvage.

En conditions de stress salin, la stimulation de la germination observée par le traitement au plasma des graines est toujours visible. Les graines traitées au plasma ont un meilleur taux de germination que les graines témoins pour Col-0 et le mutant *gl2*. Cependant, le taux de germination des graines traitées au plasma est moins important que pour les graines stressées et diminue avec l'augmentation de la concentration de NaCl (de 0 à 50 mM). Il est à noter que la germination est totalement inhibée à partir de 100 mM de NaCl. Par conséquent, le traitement au plasma à basse température rétablit partiellement l'inhibition du taux de germination dans des conditions de stress salin. Par exemple, 64 h après semis avec 25 mM de NaCl, les graines traitées au plasma atteignent un taux de 78 % de rupture du testa alors que les graines non traitées ne sont qu'à 29 % pour *gl2 (*

Figure III-3E).

En condition de stress salin, les graines du mutant *gpat5* réagissent de la même manière au traitement qu'en condition normale, c'est-à-dire qu'elles montrent un taux très faible de germination.

Les diagrammes en bâtons représentent les effets du plasma sur le pourcentage de rupture du testa par rapport aux graines témoins. L'effet est calculé suivant la formule suivante :

$$\boldsymbol{Effet} = \frac{\%\boldsymbol{TR}_{\boldsymbol{plasma}}}{\%\boldsymbol{TR}_{\boldsymbol{controle}}} \times \mathbf{100}$$

Quand le pourcentage de rupture du testa (TR) des graines contrôle est à 0 %, l'effet est noté +∞.

On note la constance de l'effet négatif (c'est-à-dire l'inhibition de la rupture du testa) du plasma sur la rupture du testa des graines mutantes *gpat5*.

De plus, l'effet positif sur les graines de Col-0 (c'est-à-dire l'augmentation de la proportion TR) est inversement proportionnel à l'augmentation de la concentration en sel, cela montre que l'effet est moins important lorsque la concentration de NaCl augmente. Notons tout de même que les graines non-traitées sont plus sensibles que les traitées (diminution plus forte du pourcentage de rupture entre les différentes concentrations).

Notons également que l'effet positif du plasma est plus important sur les graines du mutant *gl2*, cependant cet effet diminue avec le temps puisque les graines non traitées rattrapent le retard (Figure III-3J, K et L).

Afin de séparer les effets des stress osmotiques et salins, les graines d'*A. thaliana *ont germé en présence de différents pourcentages de PEG 6000 (

Figure III-4). L'augmentation du pourcentage de PEG a un impact néfaste sur le taux de germination. Avec 15 % de PEG, les graines témoins et traitées au plasma n'ont pas germé. Comme observé dans le cas du stress NaCl, le traitement des graines avec du plasma restaure partiellement le taux de germination des graines cultivées sur 5 % de PEG pour Col-0 et *gl2*. En utilisant la littérature, une pression osmotique équivalente exprimée en bar pourrait être calculée, 25 mM de NaCl est équivalent à 10 % de PEG. Mais, la germination à 25 mM de NaCl est supérieure à la germination observée avec 10 % de PEG. Ensuite, à pression osmotique égale, le PEG a plus d'effet inhibiteur que le NaCl. Parallèlement, l'effet positif du traitement au plasma semble être plus faible dans le cas de graines germées en présence de PEG.

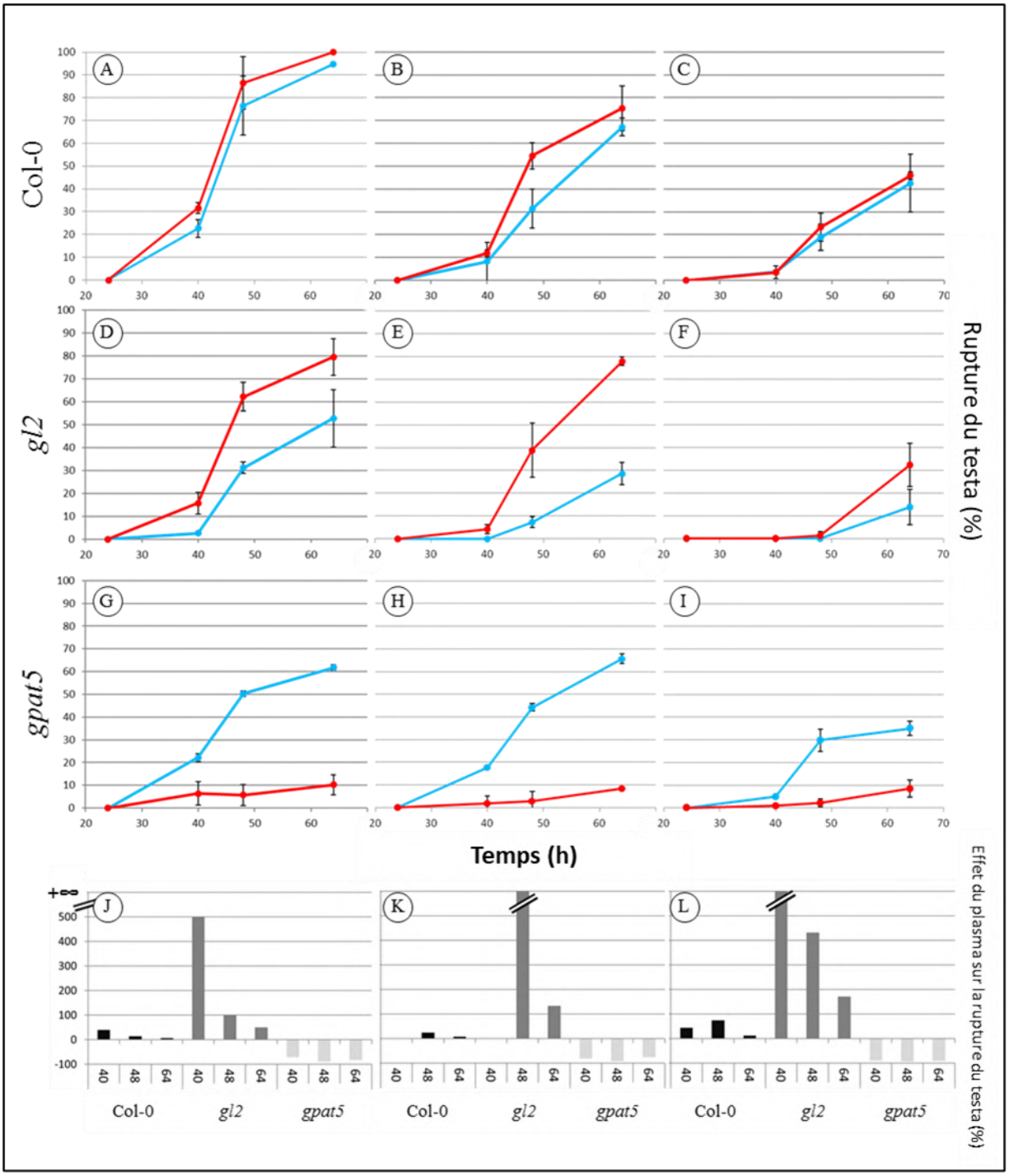


Figure III-3 : Le traitement au plasma a un effet opposé sur la germination des graines d'*A. thaliana *Col-0, et des mutants* gl2 *et* gpat5 *en condition saline. *La rupture du testa a été évaluée en fonction du temps et des différents génotypes. Les courbes bleues représentent les graines témoins et les rouges les graines traitées au plasma. Col-0 (A, B, C);* gl2 *(D, E, F);* gpat5 *(G, H, I). Trois conditions de germination différentes ont été testées : contrôle sans NaCl (A, D, G, J) ; 25 mM de NaCl (B, E, H, K) ; 50 mM de NaCl (C, F, I, L). En raison de l'absence de germination avec une concentration en NaCl supérieure à 50 mM, le pourcentage de rupture du testa obtenu n'est pas indiqué. Les diagrammes en bâton représentent l'effet du plasma sur la rupture du testa par rapport à celui du contrôle (J, K, L).*

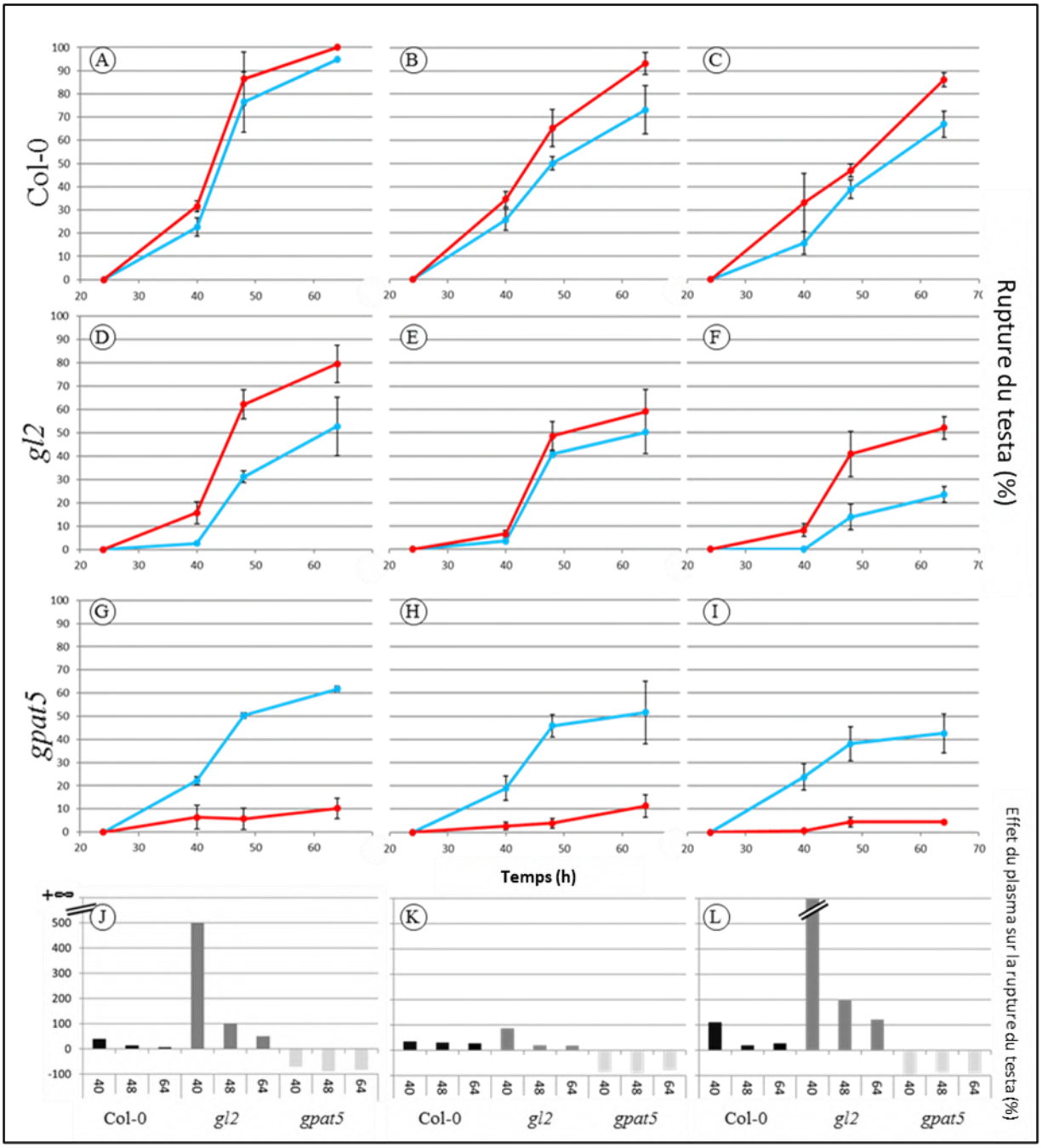


Figure III-4 : Le traitement au plasma a un effet opposé sur la germination des graines d'*A. Thaliana *Col-0, et des mutants* gl2 *et* gpat5 *dans des conditions de stress osmotiques. *La rupture du testa a été évaluée en fonction du temps et des différents génotypes. Les courbes bleues représentent les graines témoins et les rouges les graines traitées au plasma. Col-0 (A, B, C);* gl2 *(D, E, F);* gpat5 *(G, H, I). Trois conditions de germination différentes ont été testées : contrôle sans PEG (A, D, G, J) ; 2,5 % de PEG (B, E, H, K) ; 5 % de PEG (C, F, I, L). En raison de l'absence de germination avec une teneur en PEG supérieure à 5 %, le pourcentage de rupture du testa obtenu n'est pas indiqué. Les diagrammes en bâton représentent l'effet du plasma sur la rupture du testa par rapport à celui du contrôle (J, K, L).*

III.2.4 La longévité des effets

Le but de cette partie est d'observer si les effets du plasma sur l'augmentation du taux de germination sont durables dans le temps. Pour étudier ce phénomène, une cinétique de mise en germination est réalisée de t0 (le jour du traitement plasma) jusqu'à t9 (9 jours après le traitement) en passant par t2 (2 jours après le traitement) et t7 (7 jours après).

Comme observé dans la partie III.2.1. Col-0 le génotype de référence, les effets les plus importants observés sont dus au traitement par le plasma d'air avec la FE-DBD, de ce fait ce traitement sera celui utilisé pour cette partie. Nous pouvons observer une tendance de germination plus rapide jusqu'à 9 jours post traitement plasma, mais elle n'est pas significative (

Figure III-5).

Un effet significatif a été observé pour t2 concernant la rupture des deux enveloppes de la graine (testa et endosperme) et pour le temps t7 seulement la rupture du testa à 40 h est significativement plus élevé que le témoin.

Une différence atteignant +12,2 % de rupture du testa entre le plasma d'air et son témoin a été observée aux temps t0 + 24 h (p-valeur = 0,001182), t2 + 24 h (p-valeur= 0,031200) et t9 + 24 h (p-valeur= 0,010410). Une différence significative entre le contrôle et les semences traitées est visible aux moments t0 + 40 h et t2 + 40 h avec respectivement des p-valeurde 0,001851 et 0,025970 du test de Wilcoxon. Notons que pour t0 + 40 h, une augmentation de 16,6 % du taux de germination a été observée.

Immédiatement après le traitement au plasma l'effet d'augmentation de la germination était très significatif puis cet effet s'est progressivement réduit au fur et à mesure que le temps entre le traitement et la mise en germination augmentait.

La significativité de l'augmentation de la germination étant de plus en plus faible, le délai de mise en germination n'a pas été effectué après 9 jours.

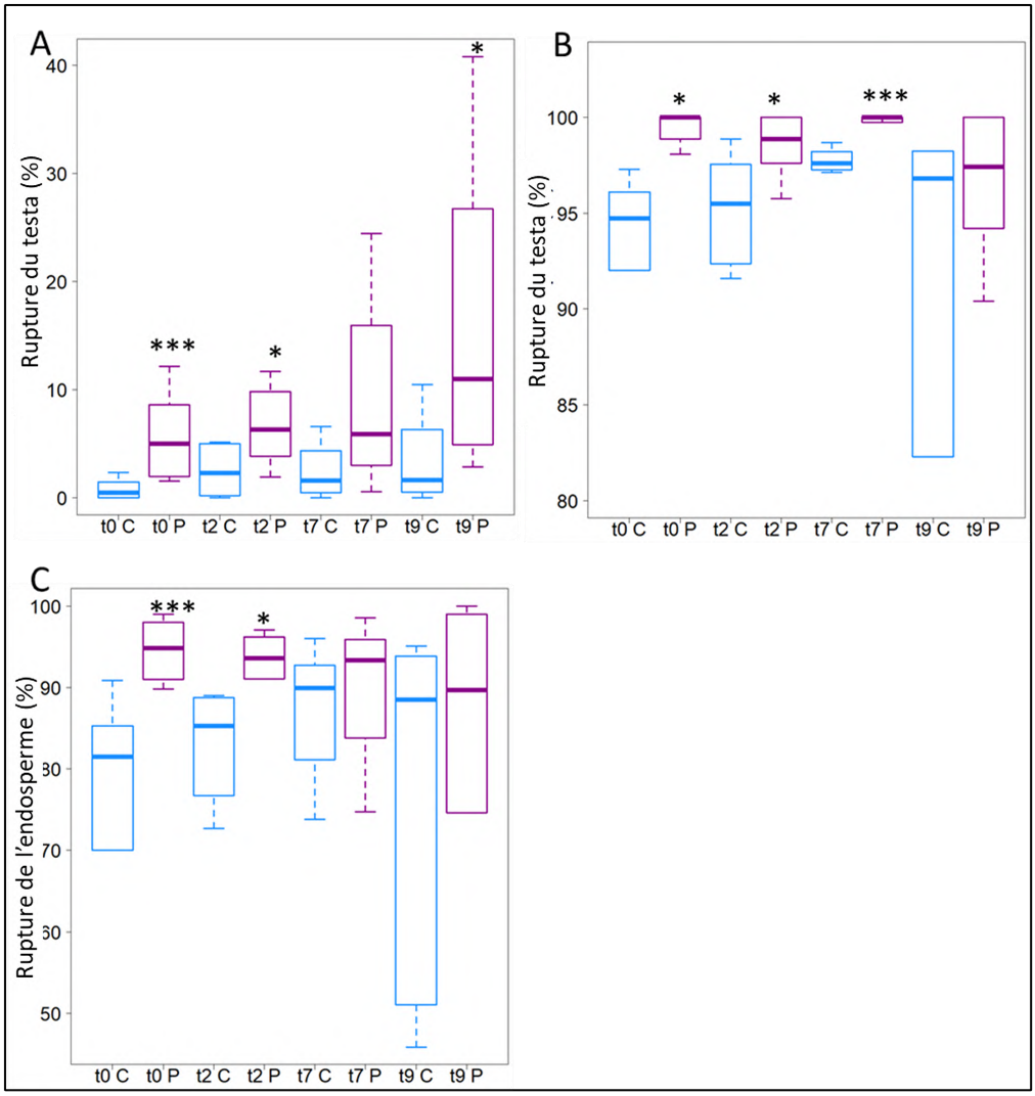


Figure III-5 : Longévité de la stimulation de la germination de graines d'*A. thaliana *après traitement par plasma d'air. *Boxplots du pourcentage de la rupture du testa en fonction du traitement à différents temps ti après traitement (A). Les observations sont faites 24 h après imbibition. Boxplots du pourcentage de la rupture du testa en fonction du traitement à différents temps ti après traitement (B). Les observations sont faites 40 h après imbibition. Boxplots du pourcentage de rupture de l'endosperme en fonction du temps de latence après le traitement (observations à 40 h) (C). L'axe x représente le temps de mise en germination (t0, t2, t7, t9) et le traitement, C pour contrôle et P pour traiter au plasma. Six cents graines comptées pour chaque répétition. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour la significativité entre les moyennes, la p-**valeur**est : .= 0,1 ; *= 0,05 ; ** = 0,005 ; *** = 0,002.*

III.3 Les effets sur la surface des graines

III.3.1 L'imagerie

Nous savons que l'embryon est entouré par le manteau de la graine. Ces couches peuvent avoir plusieurs fonctions, comme la protection de la future plante contre des stress abiotiques (conditions environnementales) ou biotiques comme l'infection par des champignons. Cependant ces téguments représentent également une contrainte mécanique pour la germination, car ce manteau peut restreindre la protrusion de la radicule.

Il est donc important d'observer l'état de la surface de la graine et les possibles changements dus aux traitements plasma.

Pour ce faire, des images sont prises grâce à un microscope électronique à balayage (MEB) sur des graines traitées grâce à le dispositif FE-DBD, Figure III-6. Le MEB permet une analyse détaillée de la morphologie des surfaces du tégument des graines.

Les images entre les graines traitées et contrôles sont nettement différentes. On observe une réduction de la forme de la columelle ainsi qu'une accumulation d'une certaine « cire » à la surface des graines traitées ce qui entraine un certain lissage de la surface. Cet effet pouvant être appelé gravure physico-chimique de la surface par plasma indique la présence d'une structure macromoléculaire déposée ou réarrangée par rapport au contrôle.

De plus, les images ont également été réalisées sur des graines à t7 (c'est-à-dire 7 jours après le traitement au plasma) et les mêmes observations ont été faites ce qui démontre que ce changement n'est pas transitoire.

Ce lissage est directement relié à l'effet physique du plasma sur les graines. De plus, il peut apparaitre comme ayant un aspect de cire fondue. Il est évident que cet effet de gravure joue un rôle dans l'augmentation de la germination, c'est pour cela que des expériences d'identification sont par la suite mises en place.

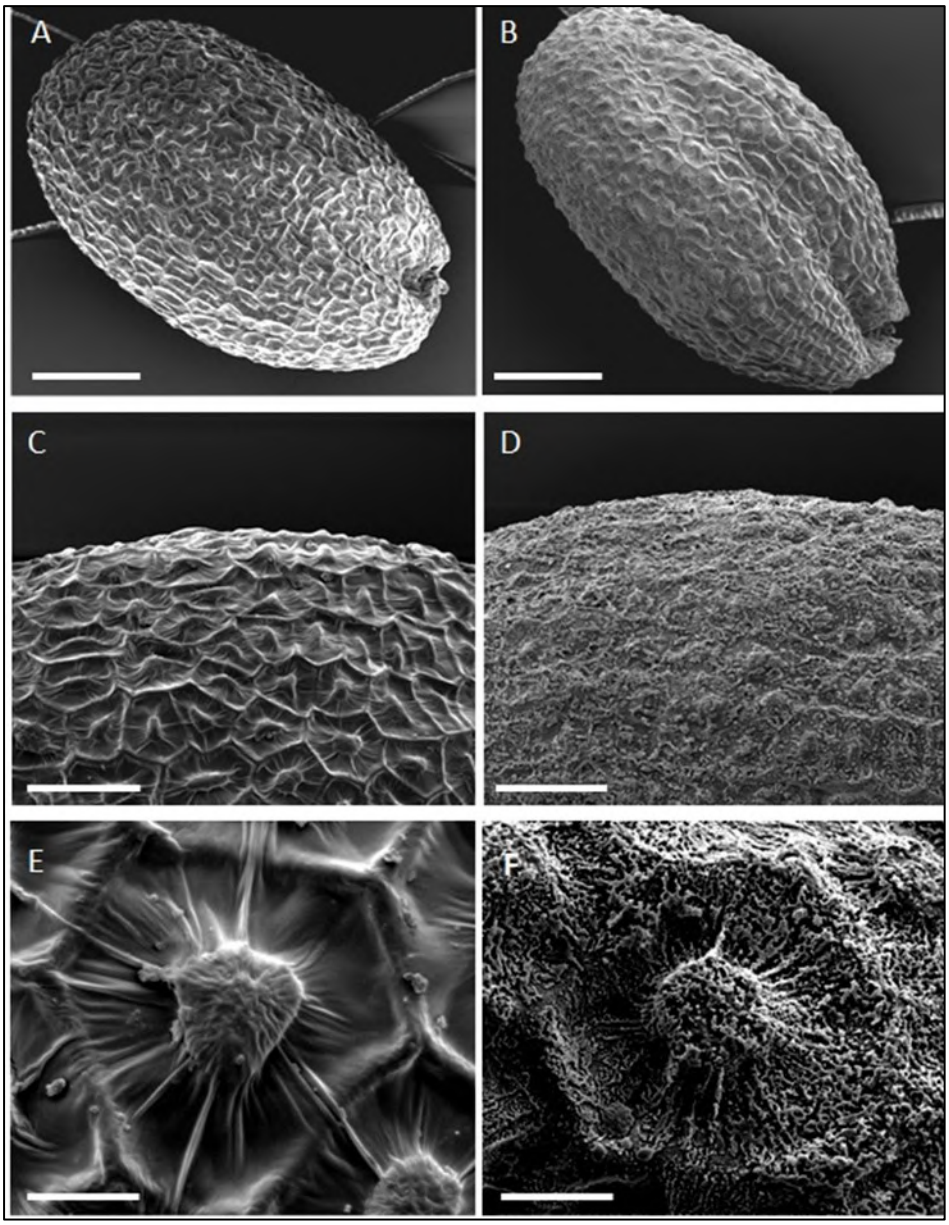


Figure III-6 : Photos de graines d'*A. thaliana *au microscope électronique à balayage. *Graines contrôles (A, C et E) et graines traitées avec la FE-DBD (B, D et F). L'échelle est 100 µm pour la graine entière (A et B), 50 µm pour le zoom sur le manteau (C et D), et 10 µm pour la columelle (E et F).*

Nous avons également cherché à savoir s'il y avait des différences à la surface des graines entre Col-0 et deux mutants (*gl2* et *gpat5*) en fonction du traitement. De plus, l'aspect de la gravure plasma sur la surface des graines nous a orienté sur une présence possible de lipides sur cette surface. Dans ce but, les graines sont colorées grâce à de l'auramine-O permettant la visualisation des lipides.

Aucune différence n'est observée entre les différents génotypes sans traitement au plasma (Figure III-7B$_{1,2,3}$).

La coloration à l'auramine-O permet de visualiser par fluorescence les composés hydrophobes tels que la lignine qui est l'un des composés structuraux de la graine. Les parois des cellules épithéliales et de la columelle sont visibles sur tous les plans.

Dans le cas d'images obtenues pour des graines traitées au plasma, des modifications de surface sont observées. Sur l'écotype de référence Col-0 (Figure III-7B$_{2,4}$), le signal fluorescent est diminué, les contours des cellules et de la columelle sont très peu visibles pour les graines traitées. Pour les graines du mutant *gl2*, il y a une très forte diminution du signal fluorescent ; néanmoins, les parois et la columelle restent reconnaissables. Pour le mutant *gpat5*, nous observons une perte de signal plus faible et même une augmentation de la fluorescence rouge sur la columelle par rapport aux graines Col-0 traitées. Il apparait que la fluorescence moins importante après traitement pourrait être associée à la réorganisation de la couche de cire présente naturellement à la surface des graines et ce réarrangement ne permet pas une bonne efficacité de la coloration. Il est possible que cet effet de surface soit en partie responsable de l'augmentation de la germination.

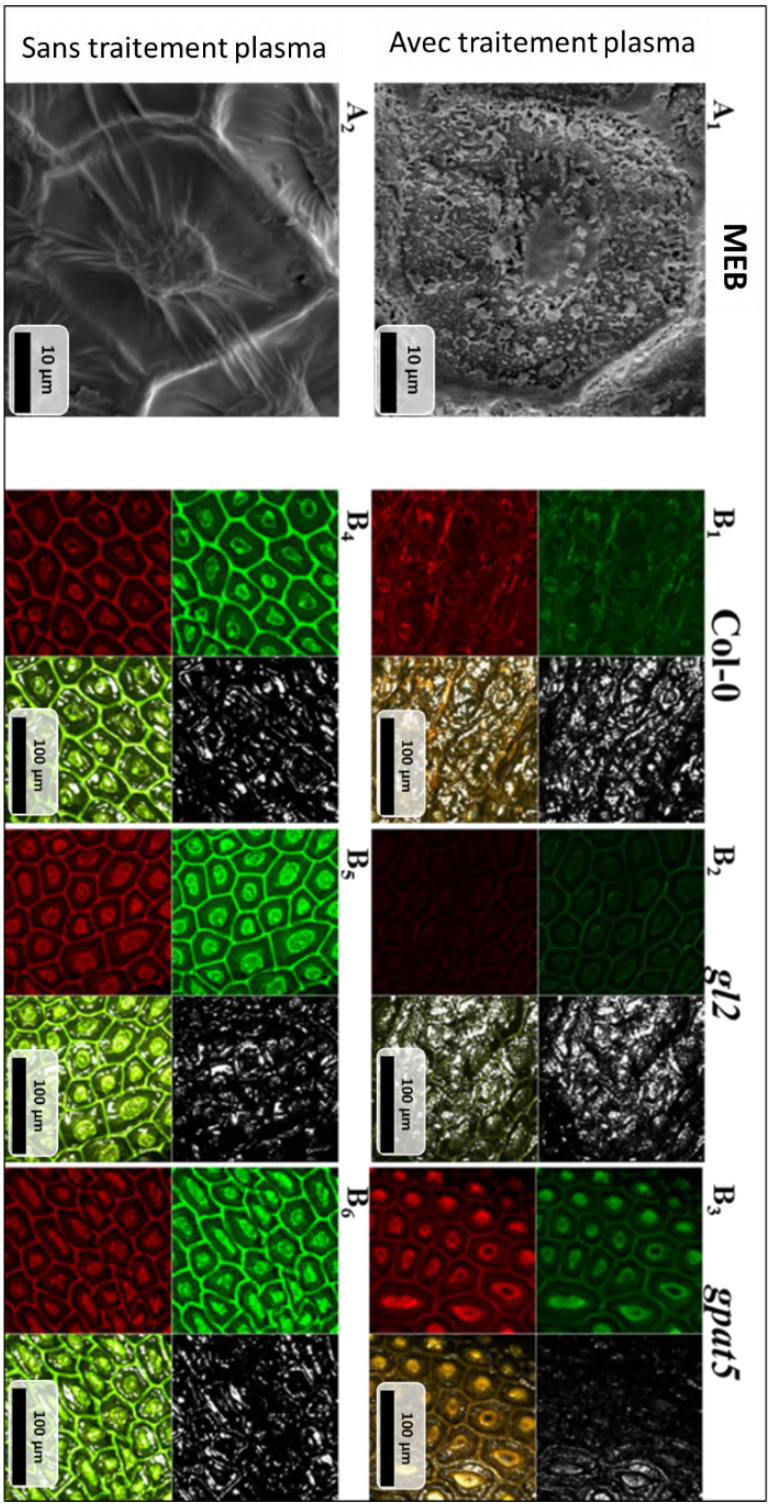


***Figure III-7 : Effets du plasma basse température sur la surface des graines d'*A. thaliana**. Columelle des graines d'*A. thaliana *Col-0 avec (1) ou sans (2) traitement au plasma, observée au microscope électronique à balayage (A). Observations de graines de Col-0 et des mutants* gl2 *et* gpat5 *d'*A. thaliana *au microscope confocal (10X zoom x9) avec ou sans traitement au plasma (B). Les graines sont préalablement colorées dans de l'auramine-O. Laser d'excitation fixé à 488 nm, réflexion : 484-494 nm (gris), fluorescence : 505-560 nm (vert) et 572-642 nm (rouge). La case en bas à droite correspond à la fusion de trois images.*

III.3.2 La perméabilité des graines

Après les observations de changement de la surface des graines, et en sachant que l'imbibition de la graine sèche est essentielle à la reprise de l'activité cellulaire et donc à la germination.

Nous avons testé la perméabilité des graines avant et après traitement avec le dispositif de plasma d'air FE-DBD grâce au rouge de tétrazolium.

Lorsqu'il traverse la paroi cellulaire végétale, le rouge de tétrazolium est oxydé via les déshydrogénases de la chaîne respiratoire et devient rouge. La quantification de la coloration rouge est donc proportionnelle à la perméabilité des graines, plus la graine est perméable plus la coloration est intense.

Ce test a été effectué sur les graines d'*A. thaliana *de 3 lignées différentes, Col-0, et les deux mutants* gl2 *et* gpat5 *(

Figure III-8). Pour Col-0, l'absorbance est diminuée d'un facteur 1/3 (p-valeur= 0,02857). La diminution de la perméabilité pour les graines du mutant *gl2* n'est pas suffisamment significative bien qu'observée. La perméabilité des germes des mutants gl2 étant initialement faible, il semble qu'il soit difficile de réduire la perméabilité de ces graines. L'absorbance des graines du mutant *gpat5* était beaucoup plus élevée dans les conditions contrôle en raison de l'absence de cuticule et a été réduite de moitié après le traitement au plasma passant de 0,8 à 0,4 (p-valeur= 0,01481)

Quels que soient les génotypes, la perméabilité des graines diminue avec le traitement plasma à basse température. Le traitement imperméabilise donc les graines d'*A. thaliana*.

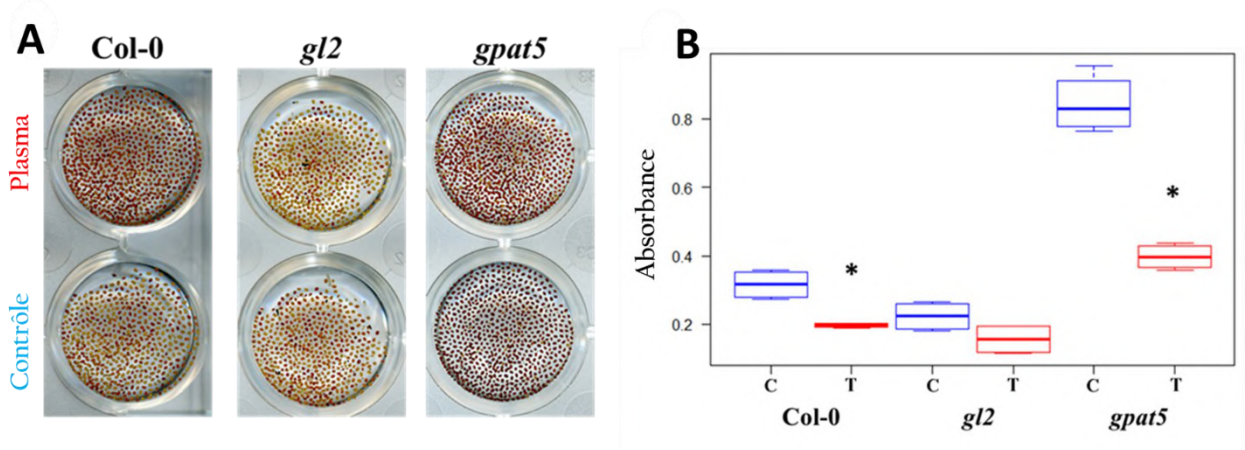


***Figure III-8: Le traitement avec le plasma d'air modifie la perméabilité des graines d'*A. thaliana.** *Scan des trois génotypes d'Arabidopsis (Col-0,* gl2, gpat5*) avec ou sans traitement au plasma (A). Les graines ont été incubées pendant 48 h dans du rouge de tétrazolium. Boxplots de l'absorbance de broyat de graines incubées dans du rouge de tétrazolium en fonction du traitement (C : contrôle ; T : traitées*

au plasma d'air avec la FE-DBD) (B). Trois réplicas de 100 µg de graines pour chaque génotypes et traitement ont été fait.

La modification de la surface des graines qui a été observée en microscopie peut être due au changement de la structure lipidique et ceci pourrait donc expliquer la diminution de la perméabilité des graines traitées au plasma par rapport aux témoins.

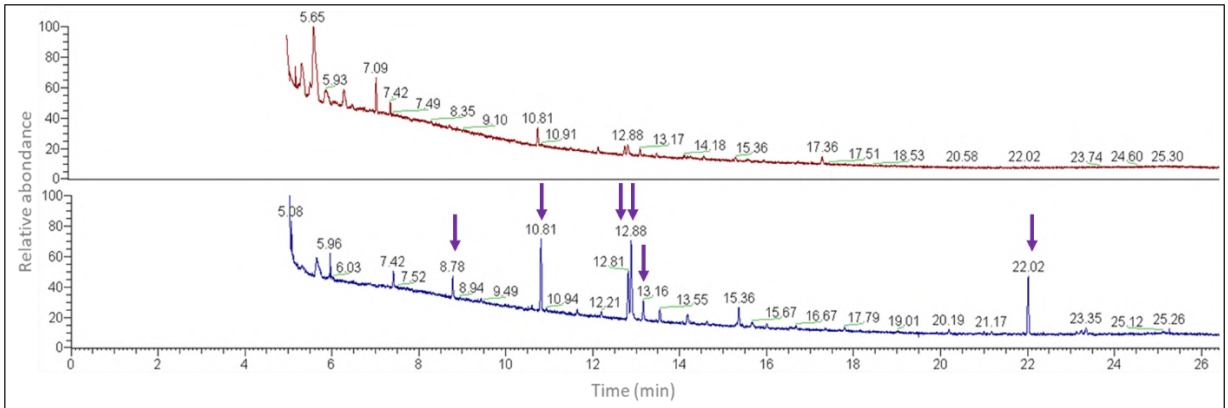
Il est intéressant d'observer la diminution significative de la perméabilité des graines de *gpat5*. En effet, les mêmes observations sont faites au niveau des observations de la surface et de la modification de la perméabilité des graines de Col-0 et de *gpat5* néanmoins les graines de ce dernier génotype ne germent plus après traitement. Cela indique clairement la complexité des effets plasmas.

De plus, la baisse de la perméabilité semble être en contradiction avec l'augmentation de la germination observée même si la baisse de la perméabilité pourrait être perçue comme un moyen de piéger efficacement l'humidité déjà présente à l'intérieur de la graine et donc de favoriser la germination même en milieu hostile (par exemple en présence des stress de type salin ou osmotique). Cependant, une des hypothèses émises serait que cette perméabilité testée avec du sel de tétrazolium pourrait ne pas être représentative de la perméabilité à l'eau car les molécules d'eau sont plus petites que celles du sel de tétrazolium. Des expériences non réalisées sur la prise d'eau (water takeup) durant l'imbibition pourrait aider à approfondir cet effet.

III.3.3 Analyses des lipides de surface

Afin d'analyser les composés observés sur la surface grâce à la microscopie, une extraction est réalisée grâce à du chloroforme. Ce produit permet la solubilisation de tous les lipides présents à la surface de la graine. Une fois solubilisés, les composés sont dérivés et analysés grâce à la GCMS (Chromatographie en phase Gaz/Spectroscopie de Masse).

Les analyses sont faites en triplica et des standards sont injectés pour pouvoir identifier les composés observés. Les graines traitées sont donc mises en parallèle aux graines contrôles pour une comparaison de la composition lipidique de surface (Figure III-9).



Coordonnées du pic	Identification	Formule
8,79	Methyltetradecanoate (acide myristique)	$C_{15}H_{30}O_2$
10,81	Acide palmitique	$C_{17}H_{34}O_2$
12,81	Acide Linoléique	$C_{19}H_{34}O_2$
12,88	Chlorure d'acide linoléique	$C_{18}H_{31}ClO$
13,17	Methyl stearate (acide octadecanoique)	$C_{19}H_{38}O_2$
22,01	Octacosane	$C_{28}H_{58}$

Figure III-9 : Analyse lipidique des résidus de surface des graines d'*A. thaliana *traitées au plasma. Le traitement au plasma diminue fortement la quantité des acides gras simples présents sur la surface des graines après le traitement direct au plasma d'air. *La courbe rouge correspond à l'extrait provenant de graines traitées et la courbe bleue de graines contrôles.*

Il peut être observé sur ce comparatif, une diminution des lipides identifiés avec cette méthode pour l'extrait provenant de graines traitées. Il est observé 3,9 fois moins d'acide palmitique après traitement, de même, la quantité d'acide linoléique est divisée par 6,3. L'acide myristique et l'octacosane sont quant à eux observés dans l'échantillon témoin et plus du tout dans l'échantillon provenant des graines traitées au plasma.

On peut noter l'apparition de pic de plus faible temps de rétention comme celui à 7.09. Celui-ci étant un acide gras d'une chaîne carbonée de 10 C. cependant l'identification de ce pic n'est pas possible de par sa faible abondance.

III.3.4 L'effet des traitements sur le mucilage

Après avoir observé les changements à la surface, nous avons cherché à voir s'il y avait une modification dans le relargage du mucilage suite au traitement plasma des graines. La surface des graines de certaines espèces, et notamment d'*A. thaliana*, présente une spécialisation de la couche cellulaire épidermique la plus externe constituant les cellules sécrétrices du mucilage. Après imbibition, cette couche cellulaire est capable de libérer le mucilage qui est un gel polysaccharidique entourant la graine.

Ce gel ayant un possible impact sur la germination, il est donc intéressant d'observer s'il y a un quelconque changement.

Après imbibition, les graines, traitées ou non, sont placées à incuber dans du rouge de ruthénium qui va colorer le mucilage. Les observations réalisées au microscope permettent d'observer l'entièreté du mucilage des graines, Figure III-10. De plus des scans et une analyse d'image sont réalisés à l'aide du logiciel imageJ qui permet d'obtenir l'aire du mucilage des graines.

Par la suite, une Anova ainsi qu'un test de Duncan sont réalisés afin de savoir si le traitement au plasma froid engendre des différences statistiques sur l'aire du mucilage en fonction des génotypes.

Le relargage du mucilage des graines des mutants *ttg1* et *gl2* ainsi que celui du génotype de référence Col-0 ne sont pas statistiquement différente entre les graines traitées et non traitées (Figure III-11). Cependant, l'aire du mucilage des graines de mutant *gpat5* est supérieure après traitement passant de 92968 μm^2 à 108113 μm^2. À l'inverse, les graines du mutant *tt8* ont un mucilage réduit après traitement de 17 % (de 128342 μm^2 avant traitement à 109256 μm^2 après contact avec le plasma).

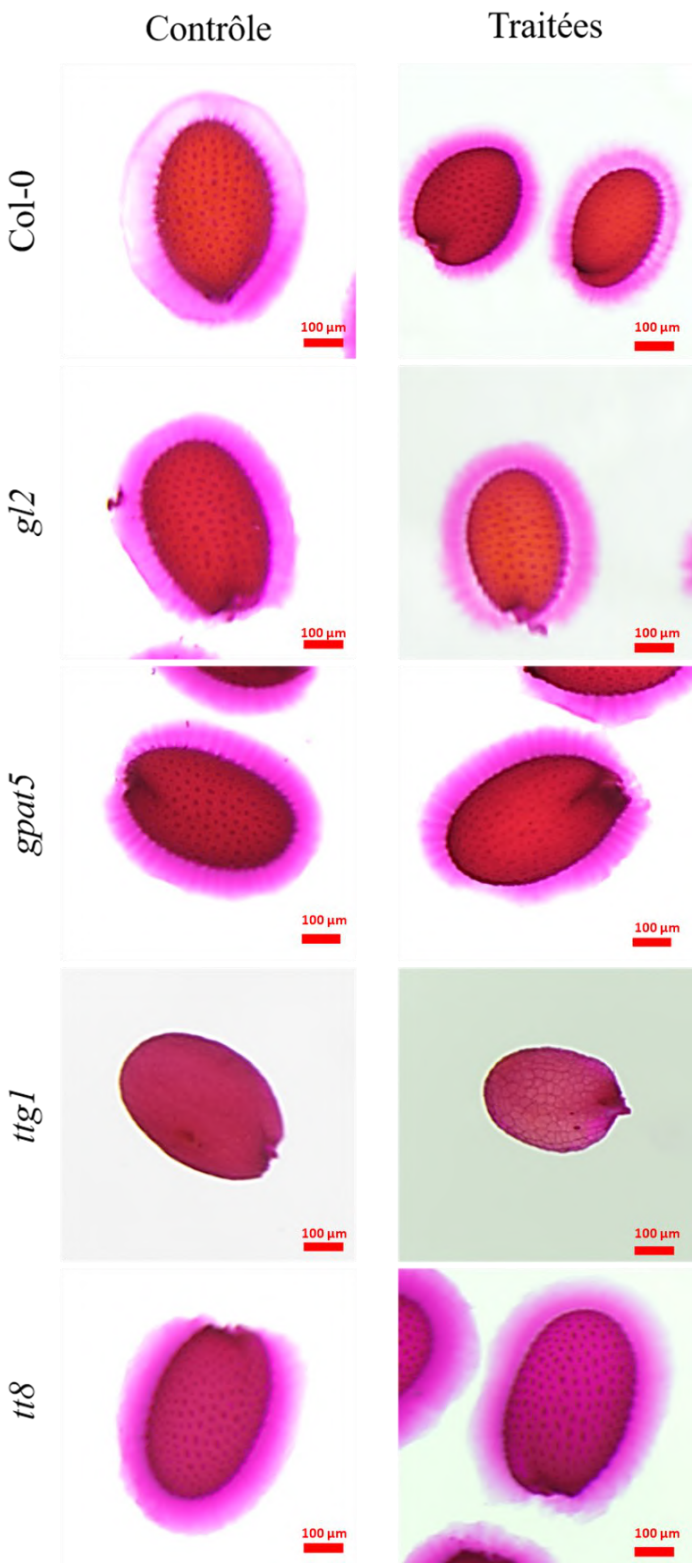


Figure III-10 : Aspect du mucilage adhérent d'A. thaliana avec ou sans traitement au plasma. *Photographies au microscope optique du mucilage adhérent de graines d'A. thaliana colorées au rouge de ruthénium 0,02 %. 100 graines de chaque génotype et traitement sont colorées et observées au microscope.*

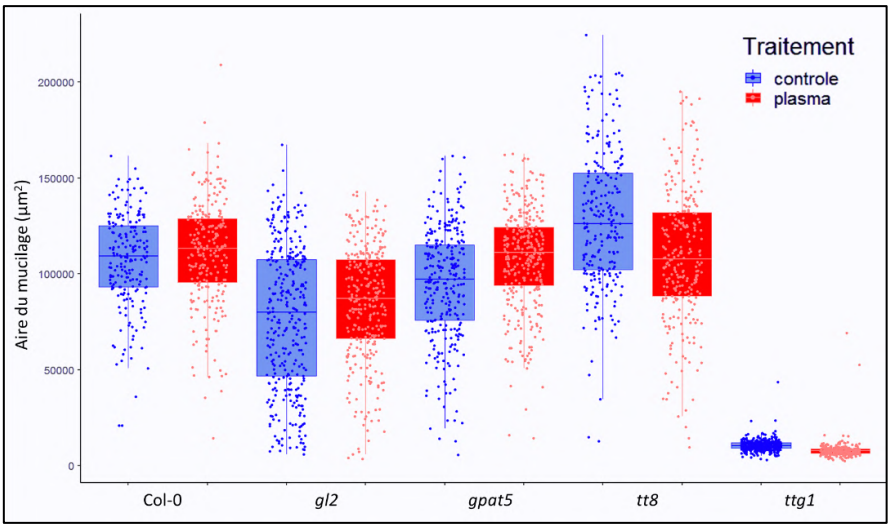


Figure III-11 : Boxplot de l'aire du mucilage en fonction du génotype et du traitement plasma avec la FE-DBD. *L'aire du mucilage, mesurée en µm² est quantifiée grâce à une analyse d'image de graines colorées au rouge de ruthénium.*

Ces résultats contrastés entre les différents génotypes ne permettent pas de conclure sur un effet positif du traitement plasma sur le relargage du mucilage.

Cependant, il est possible d'affirmer que le traitement plasma effectué ici n'aboutit pas à la dégradation des cellules sécrétrices du mucilage et donc à leur perte de fonction puisque ce dernier est relargué après le traitement chez tous les génotypes.

III.3.5 Visualisation des ROS et de l'activité peroxydases

Dans les paragraphes précédents, nous avons montré une augmentation de la vitesse de rupture des couches du manteau après traitement au plasma par comparaison avec les graines témoins. Il est démontré que les premiers stades de la germination sont contrôlés en partie par les ROS. Les plasmas dans l'air générant une certaine quantité de ROS, il est cohérent d'analyser les ROS présentes sur les graines en germination.

L'activité des peroxydases de classe III ainsi que l'ion superoxyde ne sont pas détectées avec la rupture de l'enveloppe externe et sont ensuite détectés dans les cellules voisines de la région de rupture. Leurs détections deviennent plus intense au fur et mesure de la rupture de l'endosperme.

Aucune différence significative des colorations n'a été observée entre les graines traitées et non traitées à des stades de développement identique Figure III-12). En effet les graines traitées apparaissent plus colorées (ce qui indique la présence d'ion superoxyde et de peroxydase) car elles sont plus avancées dans leur germination. Cela indique que le traitement au plasma n'a pas

modifié la quantité d'espèces réactives d'oxygène et de peroxydases produites, mais peut accélérer leurs productions. Cela explique évidemment le taux de germination plus élevé dans le cas de semences traitées au plasma au même stade de développement.

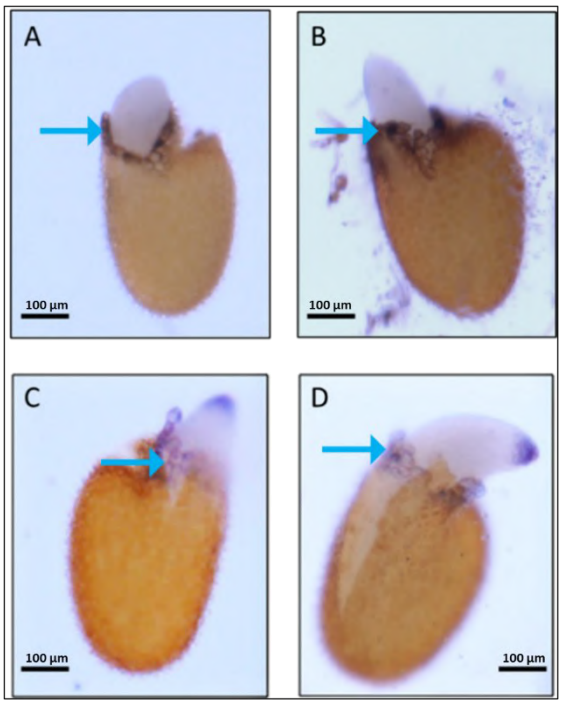


***Figure III-12 : Photos de graines d'*A. thaliana*, Activité des peroxydases de classe III et détection des ROS**. *L'activité peroxydase est détecté grâce au guaïacol (A & B). La présence de l'ion superoxyde $O2^{-}$ est observée avec du NBT (C & D). Graines contrôles (A & C) et graines traitées (B & D). L'intensité de la coloration apparait identique au même niveau de germination.*

III.3.6 Étude sur la graine de *Camelina sativa*

i - Angle de contact

Dans les parties précédentes, nous avons cherché à visualiser des effets du traitement plasma sur la surface des graines. Il a été montré une réduction de la perméabilité du manteau ainsi qu'une réorganisation des lipides de surface. Ces différences impactant la surface nous amènent naturellement à regarder le comportement de cette surface par rapport à l'eau présente dans l'environnement. C'est dans ce but que l'angle de contact est mesuré entre la surface de graines traitées ou non et une goutte d'eau déposée à la surface.

L'angle de contact permet la visualisation de l'hydrophobie de la surface de la graine Figure III-13. Ces expérimentations ne peuvent pas être réalisées sur les graines d'*A. thaliana* dans le matériel dont je dispose du fait de leur petite taille (inférieur au mm). D'ailleurs, il n'existe pas dans la littérature d'étude d'angle de contact effectuée sur les graines d'*A. thaliana*. Cependant

les graines de *Camelina sativa* sont morphologiquement très similaires et les deux espèces sont phylogénétiquement proches. Les résultats obtenus avec *C. sativa* pourront être, dans une certaine mesure, extrapolés à *A. thaliana*.

Le schéma de la Figure III-13$_C$ montre la manière donc a été mesuré l'angle de contact. Plus l'angle est petit, plus la goutte est étalée sur la surface de la graine.

Les violin plot, Figure III-13$_D$, montrent la répartition des mesures d'angle. Grâce au test de Mann-Whitney il est possible d'affirmer que les mesures sont bien différentes entre les graines contrôles et traitées au plasma (p-valeur< 0.001).

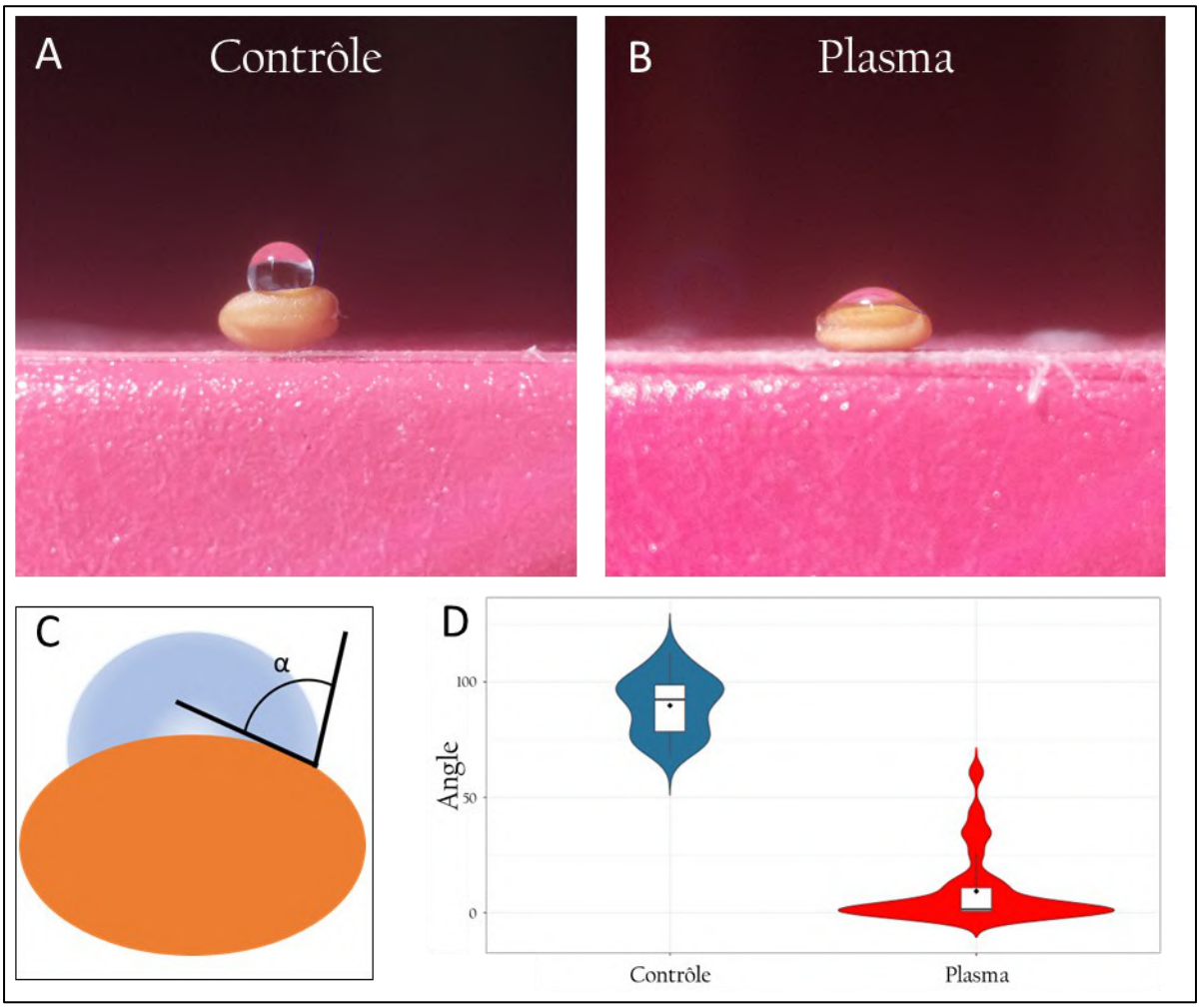


***Figure III-13 : Le traitement au plasma diminue l'angle de contact des graines de* Camelina sativa.** *Photos des graines de* C. sativa *après dépôt de la goutte de 0.3 µL. Graine contrôle (A), ou traitée grâce à la FE-DBD pendant 15 min (B). Schéma du calcul de l'angle de contact α (C). Violin plot des mesures d'angles de contact sur 30 graines par traitement (D).*

On observe très clairement une augmentation de la mouillabilité de la surface de la graine traitée par plasma. C'est un résultat qui est conforme à ceux de la littérature (voir chapitre 1) dans le cas de graines de tailles plus grandes qu'*A. thaliana*.

ii – Perméabilité de la graine de C. sativa

La question de la variation de la perméabilité de *Camelina sativa* se pose sachant que la perméabilité de l'*A. thaliana* traitée au plasma a baissé et que l'on n'a pas la possibilité de faire des mesures d'angle de contact sur l'*A. thaliana* du fait de sa petite taille pour savoir dans quel sens aurait varié sa mouillabilité lorsqu'elle est traitée par plasma. C'est pourquoi la perméabilité de la *Camelina sativa* a été mesurée (morphologiquement proche d'*A. thaliana* mais de taille plus grosse) dont on sait déjà que sa mouillabilité augmente lorsqu'elle est traitée au plasma (voir paragraphe précédent).

Dans cette expérience, 30 graines de *C. sativa* sont incubées dans le sel de tétrazolium pendant 40 h. L'absorbance mesurée est directement corrélée à la perméabilité de la graine.

Une première tendance à la réduction de la perméabilité se dégage après traitement de 15 min avec la FE-DBD. Cette tendance à la baisse de la perméabilité de la *C. sativa* traitée au plasma nous conforte d'une certaine manière sur la cohérence de l'augmentation observée du taux de germination l'*A. thaliana* traitée au plasma avec la baisse de sa perméabilité. Cependant cette réduction de la *C. sativa* traitée au plasma n'est pas significativement prouvée avec le test non-paramétrique de Mann Whitney ($p = 0.56$) et nécessite une confirmation dans le futur.

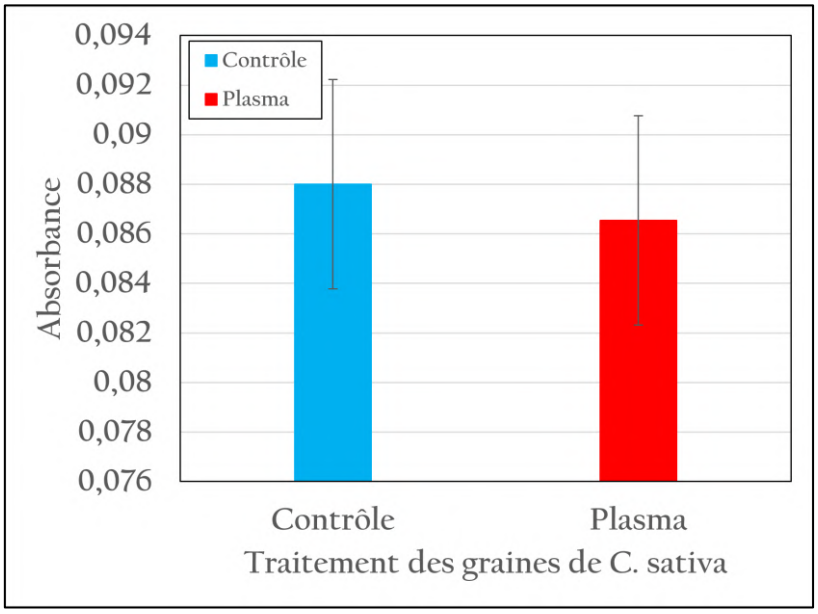


Figure III-14 : Diagramme en bâton de l'absorbance du broyat de graines de* C. sativa *incubées pendant 40 h dans une solution de 1% de sel de tétrazolium en fonction du traitement. *La barre bleue représente l'absorbance des lots de graines contrôles et la rouge de graines traitées à la FE-DBD pendant 15 min. l'expérimentation a été réalisé sur 30 graines et répétées 3 fois.*

III.4 Le développement des plantes

Après avoir observé différents effets du traitement plasma sur la germination et essayé de comprendre comment ces effets se mettent en place, nous nous sommes intéressés aux effets indirects du plasma sur le développement et la croissance d'*A. thaliana*.

III.4.1 L'eau activée par plasma

Dans cette partie, les effets du plasma sont observés sur le développement des parties aériennes des plantes. Le traitement au plasma se fait ici de manière indirecte *via* l'eau activée par plasma (PAW). Cette eau est traitée grâce au jet de plasma d'hélium pendant 15 minutes. Ce traitement fait réagir le plasma d'hélium avec l'eau et de nombreuses réactions chimiques peuvent avoir lieu entre ces différents acteurs qui sont aussi au contact de l'air.

En fait, comme déjà souligné l'interaction plasma/eau permet d'activer l'eau en générant des RONS (espèces réactives d'oxygène et d'azote) de durées de vie variables. La demi-vie des espèces à longue durée de vie peut aller de plusieurs mois (nitrates, NO_3^-) à plusieurs jours (nitrites, NO_2^- et ammonium, NH_4^+), ou quelques heures (peroxyde d'hydrogène, H_2O_2) à plusieurs dizaines de minutes (ozone, O_3). À l'inverse les espèces radicalaires comme $OH^{\cdot}$ (Hydroxyle) où NO (monoxyde d'azote), où $O_2^{\cdot -}$ (ion superoxyde) ou $OONO_2^-$ (peroxynitrates) ou ONO^- (peroxynitrites) ont des durées de vie bien plus courtes voire très courtes (inférieures à la seconde voire à quelques ns). Cela va donc influencer l'utilisation que l'on peut faire par la suite de l'eau activée en fonction des espèces qui nous intéressent.

Cette eau activée par plasma (PAW) riche en RONS a été utilisée notamment dans les applications liées à l'agriculture pour améliorer les taux de germination, la croissance des semis ainsi que le développement des racines, de la tige et des feuilles jusqu'à la floraison de la plante. On sait que la disponibilité de l'azote (N) est un facteur majeur déterminant pour une bonne croissance des plantes. Les plantes acquièrent l'azote (N) inorganique du sol, principalement sous forme de nitrate (NO_3-) et d'ammonium (NH_4+). Il a été montré que les mélanges de nitrate et d'ammonium sont bénéfiques pour la croissance par rapport au nitrate ou à l'ammonium seul. Les réponses synergiques à ces deux sources d'azote grâce aux interactions entre le nitrate et l'ammonium permettent donc une meilleure efficacité lors des différentes étapes de la croissance en partant de l'absorption de l'azote, son allocation, son assimilation et sa signalisation [95].

Dans certains cas, l'eau activée (PAW) est également utilisée pour inactiver les micro-organismes pathogènes et les champignons susceptibles d'infecter la plante. Le principe actif de cette eau activée est naturellement corrélé à la présence des RONS générés par le plasma. Par exemple, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut déclencher la libération de dormance en réduisant le blocage de l'acide abscissique (ABA). Cela permet de réguler positivement les influences significatives sur le développement et la croissance des plantes tout en réduisant à la fois la virulence des agents pathogènes et l'expression des symptômes de la maladie, ainsi que l'inhibition de la croissance des feuilles rudimentaires [96]

De plus, on sait que les RNS jouent deux rôles principaux dans l'agriculture moderne: (1) ils sont absorbés comme déjà souligné précédemment en tant que nutriment par les enzymes végétales (comme la nitrate réductase en abaissant l'énergie d'activation) ce qui entraîne la génération de composés azotés et d'acides aminés; et (2) ils peuvent contrôler certains aspects du métabolisme et du développement des plantes, notamment en tant que molécule de signalisation [97].

Lorsque le plasma entre en contact avec l'eau notamment à l'aide du dispositif décrit dans le paragraphe II.4.6, la formation des RONS résulte d'une succession de processus réactionnels ou de phénomènes physico-chimiques complexes. Cela commence en premier par les mécanismes de génération de ces espèces réactives ou de leurs précurseurs formés d'abord dans la phase gaz d'un mélange hélium-air, puis c'est au tour de leur transport de la phase gazeuse à la phase liquide. Ceci est ensuite suivi par la solvatation des espèces réactives qui sont sujettes à des réactions d'association moléculaire dans le liquide, ainsi que par des interactions plasma-liquide.

Par exemple, il est admis que la formation de H_2O_{2aq} en phase liquide (ou aqueuse indice aq) qu'on retrouve dans l'eau activée peut se faire suivant les schémas réactionnels suivants en partant des espèces déjà formées en phase gaz (indice g) :

$H_2O \rightarrow Haq + OHaq$ (irradiation par UV ou électrons énergétiques de H_2O)

$OHg \rightarrow OHaq + OHaq \rightarrow H_2O_2aq$

$OHg + OHg \rightarrow H_2O_2g \rightarrow H_2O_2aq$

L'ozone connu pour ces propriétés antioxydante et antimicrobienne par excellence peut être formé aussi bien en phase gaz O_3g à partir de réactions à trois corps incluant l'oxygène atomique (radical .O) issu de la dissociation de l'oxygène moléculaire par impacts électroniques et un troisième corps M. Ensuite O_3g est transporté dans le liquide mais l'ozone (O_3aq) peut également être directement formé en phase liquide. Ceci peut être résumé par ce type de réactions :

$e + O_2 \rightarrow .O + .O$

$.O + O_2 + M \rightarrow O_3g \rightarrow O_3aq$

Les nitrites sont générés dans l'eau activée par plasma grâce à la dissolution des NOx générés par les réactions de N_2 et d'O_2 en phase gaz. Une fois que NO_2^- coexiste avec des agents oxydants tels que H_2O_2 ou O_3, il sera facilement converti en nitrate (NO_3^-) avec les réactions associées comme par exemple à partir de la molécule NO_2 elle-même formée à partir de NO résultant de la dissociation des molécules d'azote et d'oxygène par impacts électroniques :

$NO_2 + NO_2 + H_2O \rightarrow NO_2^- + NO_3^- + 2H^+$

La voie de formation de l'ion d'ammonium, qui permet avec le nitrate d'apporter l'azote nécessaire à la croissance de la plante, peut être résumée par une série de réactions d'abord dans la phase gaz en partant de l'hydrogène atomique H (issu de la dissociation de la vapeur d'eau) et de l'azote atomique N (issu de la dissociation de N_2) pour former d'abord l'ammoniac NH_3g [98] qui est ensuite solvaté dans l'eau (NH_3aq) avant de former l'ion d'ammonium (NH_4^+aq):

$N + H \rightarrow NH + H \rightarrow NH_2 + H \rightarrow NH_3g \rightarrow NH_3aq$

$NH_3aq + H^+ \rightarrow NH_4^+aq$

Dans les travaux de Judée et al qui ont analysé 16 espèces radicalaires RONS dans l'eau activée par plasma, il est proposé une voie de formation de NH_3 en phase gaz différente passant par l'état métastable de l'azote moléculaire et l'hydrogène moléculaire [95].

Dans le présent travail, on a commencé par doser quelques RONS comme le nitrite, le nitrate, le peroxyde d'hydrogène, le carbonate de calcium, le potassium (P) et l'ozone (O_3). D'autres espèces comme notamment l'ammonium seront dosées dans un second temps. À noter que dans nos conditions d'activation de l'eau, le potassium (P) et l'ozone (O_3) sont à l'état de trace.

Dans le Tableau III-1, nous observons une augmentation de la concentration des espèces dosées après traitement par le jet d'hélium. De plus, nous pouvons noter une augmentation de l'acidité de l'eau activée à travers une diminution du pH ainsi qu'une augmentation de la conductivité

des PAW qui s'explique par l'augmentation des espèces chargées en phase aqueuse. Enfin l'eau du robinet contient plus d'espèces actives que l'eau désionisée comme cela était attendu. De tels résultats sont en accord avec ceux de la littérature [83-97].

Tableau III-1 : Paramètres physico-chimiques des eaux. *Paramètres électriques et chimiques de l'eau désionisée (H2Od), de l'eau du robinet (Tap) et de l'eau activée par plasma (PAW). La conductivité est exprimée mS.cm^{-1} et les concentrations en mg.L^{-1}. Les mesures des concentrations, du pH et de la conductivité sont effectuées 3 fois indépendamment.*

Eau	Nitrates [NO_3^-] mg.L^{-1}	Nitrites [NO_2^-] mg.L^{-1}	Peroxyde d'hydrogène [H_2O_2] mg.L^{-1}	Carbonate de Calcium [$CaCO_3$] mg.L^{-1}	Ammonium [NH_4^+] mg.L^{-1}	Conductivité S.m^{-1}	pH
H_2Od	faible	0,00	0,05 ±0	5,95 ±0,14	0,00	8,25 ±2,3	7,53 ±0,34
PAW_{H_2Od}	faible	1,94 ±0,1	1,65 ±0,12	10,9 ±0,16	0,33 ±0,01	26,42 ±0,86	7,16 ±0,07
Tap	2,12 ±0,02	0,00	0,07 ±0,01	15,45 ±1,38	0,00	10,96 ±0,03	8,07 ±0,16
PAW_{Tap}	**5,90 ±0,01**	3,02 ±0,06	3,03 ±0,02	20,45 ±0,37	**0,83 ±0,02**	16,07 ±0,46	7,57 ±0,18

Le nitrate et l'ammonium étant deux espèces essentielles dans la nutrition azotée, il est important d'observer leur durée de vie dans l'eau activée. Dans la Figure III-15, les concentrations de NO_3^- et de NH_4^+ sont analysées en fonction du temps (entre l'instant où l'eau a été traitée et elle sera analysée) qui varient entre 0 et 96 h. Les analyses ont été également faites en fonction de la température de stockage de l'eau qui a été fait dans deux conditions : à température ambiante et à 4°C. La température de stockage n'a pas affecté la concentration en NO_3^- qui est restée quasi identique dans les deux conditions de températures de stockage. Ce qui d'une certaine manière est pratique pour l'utilisation de l'eau activée, au vu de sa teneur en nitrates, qui n'a pas besoin de conditions particulière de stockage avant son utilisation. En revanche, la concentration en NH_4^+ est plus élevée quand le stockage est fait à température ambiante. Ce qui présente aussi un aspect pratique puisqu'à température ambiante on maintient mieux la concentration d'ammonium. À noter que cette dernière chute durant la première heure après le traitement passant de 0.83 à 0.31 ou 0.36 mg.L^{-1}. De plus, la concentration en ammonium devient négligeable au bout de 3 jours après le traitement quand l'eau est stockée à 4 °C et après 4 jours à température ambiante. Ces paramètres de durée de vie sont importants à connaitre lorsqu'on veut utiliser l'eau activée par plasma pour l'arrosage des plantes durant leur développement comme il a été fait et décrit dans le paragraphe suivant.

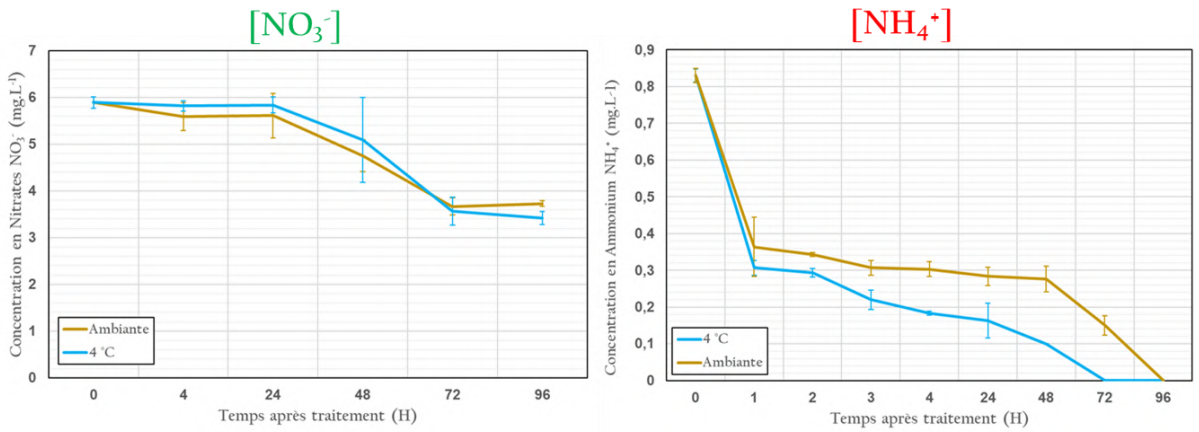


Figure III-15 : Courbe de l'évolution de la concentration en ammonium et nitrates en fonction du temps et du stockage dans l'eau du robinet activée par plasma PAW_{Tap}.

Un autre aspect de l'étude de l'eau activée est celui du temps de génération des espèces en fonction du temps de traitement (Figure III-15). Ici nous avons choisi d'observer les concentrations en Nitrate et en Ammonium en fonction du temps d'exposition au jet de plasma d'hélium.

Le temps d'exposition a été varié entre 5 et 30 min (Figure III-16). Pour l'ammonium, la concentration reste très faible avant 10 min de traitement et atteint par la suite un plateau autour de 0.85 $mg.L^{-1}$ après 15 min d'exposition au plasma. Pour la concentration en nitrate, après 5 min, on observe 4.45 $mg.L^{-1}$ puis l'augmentation est quasiment constante et n'atteint pas de plateau même après 30 min d'exposition où on observe une concentration approchant les 8 $mg.L^{-1}$. Pour toutes nos expériences d'arrosage des plantes durant leur croissance (voir paragraphe suivant) nous avons choisi le temps médian de 15 min pour le traitement de l'eau par plasma.

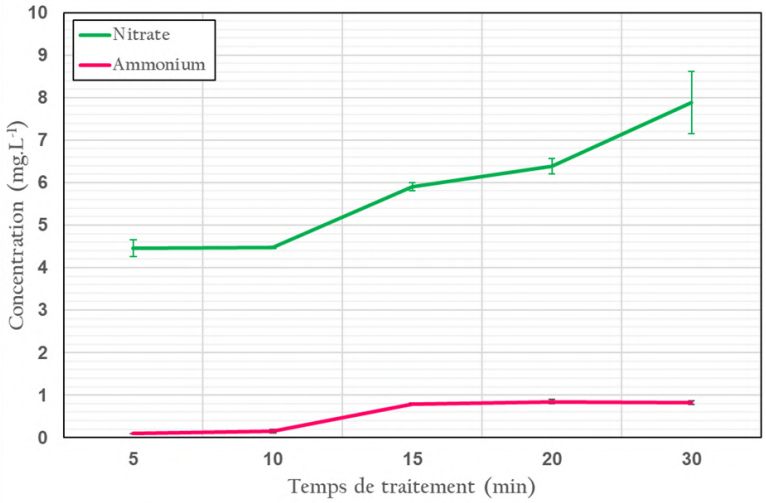


Figure III-16 : Courbe des concentrations en ammonium et nitrate en fonction du temps d'exposition au jet de plasma d'hélium dans l'eau activée par plasma PAW_{Tap}. *La courbe verte représente la concentration en NO_3^- et la courbe rose la concentration en NH_4^+ en $mg.L^{-1}$.*

III.4.2 Les différents effets sur le développement d'*Arabidopsis thaliana*

Un autre aspect des effets du plasma est le traitement indirect par le biais de l'eau activée (PAW). Dans cette partie, de l'eau est mise en contact avec le jet de plasma d'hélium, pendant ce traitement de nombreuses espèces réactives de l'oxygène et de l'azote sont produites et sont susceptibles d'influencer la croissance des plantes (section III.4.1 L'eau activée par plasma)

Afin de tester cela, des plantes d'*A. thaliana* sont mises en culture puis arrosées de manière régulière et contrôlée avec différentes eaux. L'eau d'arrosage peut être de l'eau du robinet (Tap) activée ou non et de l'eau désionisée activée ou non. Les plantes sont prises en photo à intervalle régulier (jusqu'à 42 jours de développement) pour suivre leur croissance jusqu'à la floraison. Notons que seule l'eau du robinet activée a eu un effet par rapport au contrôle. Les plantes arrosées avec l'eau déionisée activée montrent la même croissance que les eaux non-activées.

Afin de suivre le développement des plantes, différents paramètres végétaux tels que le nombre de feuilles, le diamètre de la rosette, la surface foliaire et le nombre total de plantes à fleurs sont mesurés.

i. Sur le nombre de feuilles total (Figure III-17C), un effet significatif a été observé 21 jours après le semis (p-valeur= 0,03161), avec une augmentation moyenne d'une feuille par plante pour les plantes arrosées avec le PAWtap. On retrouve cet effet à 28 jours après semis (p-valeur= 0,0035).

ii. Pour l'effet sur la surface foliaire de la plante, (Figure III-17D) une augmentation significative de la surface foliaire est notée lors des trois premières observations. À la première observation (21 jours), il y a une augmentation de + 191 mm^2 (± 53) (p-valeur= 0,0020). À la deuxième (28 jours), l'augmentation est égale à + 419 mm^2 (± 81) (p-valeur= 0,0097) tandis qu'à la troisième observation (35 jours), la surface a atteint environ + 743 mm^2 (p-valeur= 0,0995).

iii. Les effets significatifs suivants sont notés concernant le diamètre de la rosette (Figure III-17E) : à 21 jours, il y a une augmentation de 0,83 cm (p-valeur= 0,0064). À 28 jours, une extension de 1,28 cm du diamètre est relevée (p-valeur= 0,0005) tandis qu'à 35 jours, le diamètre moyen des plantes arrosées à l'eau du robinet activées par plasma (PAWtap) est plus grand de 1,03 cm avec une p-valeur de 0,0106.

iv. Enfin, l'évolution de la tige florale a été notée (Figure III-17F). D'après les observations, nous pouvons noter que le nombre de plantes ayant un début de floraison est logiquement plus important en fonction du temps. De plus, l'apparition de la tige florale se fait plus précocement dans le cas des plantes arrosées avec le PAW. À partir du 35ème jour, toutes les plantes arrosées avec du PAWtap sont au stade de floraison.

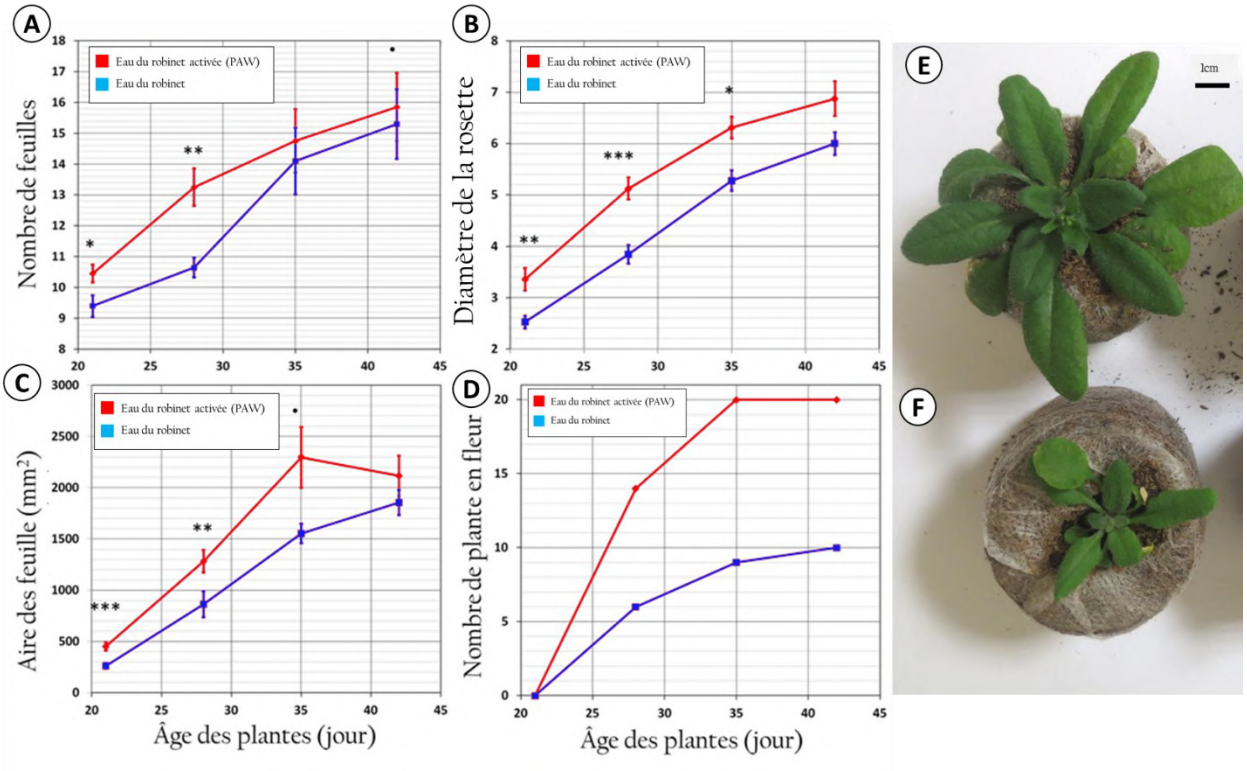


Figure III-17 : Évolution des différents caractères de la plante pendant son développement en fonction du temps utilisant de l'eau du robinet (Watertap) ou de l'eau du robinet activé par jet de plasma d'hélium (PAWtap). *Nombre de feuilles en fonction de l'âge de la plante et du traitement (A); Diamètre de la rosette (B); Aire des feuilles (C); Nombre total de plante en floraison (D). Photos de deux plantes d'A. thaliana à 28 jours de développement (E & F), la photo du haut correspond à une plante arrosée avec du PAW et celle du bas contrôle (arrosée avec de l'eau du robinet) Le test de Wilcoxon a été utilisé pour la significativité entre les moyennes, la p-**valeur**est : · = 0,1; *=0,05 ; **=0,005 ; ***=0,002.*

Dans un deuxième temps, le développement du système racinaire a été étudié. Ici les graines ont subi un traitement direct avec la FE-DBD dans l'air puis ont été semées sur du milieu nutritif de culture. Les observations faites des plantules n'ont malheureusement pas révélé de changement de taille du système racinaire après traitement. Le traitement plasma direct tel que réalisé dans cette étude montre des effets positifs sur la germination mais pas sur les étapes plus tardives du développement.

Chapitre IV Discussion, Conclusion et Perspectives

IV.1 Discussion

Dans ce paragraphe, je résume les principaux résultats obtenus dans mes travaux de thèse en les interprétant afin de mesurer jusqu'à quel point ils permettent de répondre aux objectifs qu'on s'est fixé au début de ces travaux et qui consistent à amener des éléments de compréhension des mécanismes biologiques actionnés par les plasmas.

Dans un premier temps, une phase de mise au point du traitement a été réalisée pour trouver quel plasma utiliser, dans quelles conditions et pour quelle durée d'exposition afin d'observer des effets positifs sur la germination (augmentation de la vitesse ou du taux).
Parmi les dispositifs à notre disposition (Jet DBD d'Hélium, Jet Corona, Corona multi-pointes et FE-DBD sans oublier le plasma micro-onde basse pression utilisée dans des mélanges N_2-O_2 en début de la collaboration Laplace-LRSV), le plasma d'air FE-DBD en traitement direct semble donc être le plus intéressant pour les effets recherchés sur la germination. Pour la majorité des expérimentations suivantes, le traitement prédéfini en mode direct est donc celui utilisant le dispositif FE-DBD pour une durée d'exposition de 15 min. Il est à noter que le jet de plasma d'hélium induit un flux de plasma sur les graines cent fois inférieur à celui de la FE-DBD (environ 0.5 mW/cm^2 contre 50 mW/cm^2) c'est pour cela que le plasma d'air créé avec le dispositif FE-DBD a un effet plus important et plus significatif sur le taux de rupture que les graines traitées avec le jet d'hélium. À noter aussi que le dispositif Corona multi-pointes partiellement testé dans ce travail et qui a un flux de puissance plasma est encore plus grand (100 mW/cm^2) que les 2 autres a clairement montré qu'une durée de traitement de 1,5 min (donc beaucoup plus courte que les 15 min du FE-DBD) suffit largement pour donner le même taux de germination. Il est clair que la dose plasma ou le flux de puissance plasma vu par la graine lors de son traitement est d'une importance capitale pour expliquer en partie l'augmentation des vitesses de germination des graines traitées aux plasmas. En plus du flux de puissance plasma appelé aussi dose plasma (dépendant de la densité de courant des particules chargées et du champ électrique), les RONS générés par ces plasmas contribuent également à l'augmentation de la germination des graines traitées.

Par la suite, les mutants *gl2* et *gpat5* sont utilisés. Le gène *GL2* est un facteur de transcription qui permet le développement normal du tégument et du mucilage [100, 101]. Le mutant *gpat5* présente un manque de cuticule dans le tégument [102, 103]. Mes résultats ont confirmé certains résultats de la littérature [104, 105] montrant des taux de germination des mutants *gl2* et *gpat5* réduits par rapport à l'écotype Col-0. Pour les mutants *gl2*, les observations sont similaires à celles faites pour l'écotype Col-0 car le plasma à basse température augmente le taux et la vitesse de germination. Cela pourrait s'expliquer par l'affaiblissement des couches externes. En revanche, les graines de mutant *gpat5* ne présentent plus la capacité de germer après le traitement au plasma. Comme ce mutant *gpat5* spécifique est altéré dans ses couches protectrices [106], l'hypothèse sous-jacente est que les graines sont plus sensibles au traitement par plasma et que la survie de l'embryon est altérée de façon permanente.

Pour rappel, les plasmas à basse température ont généralement un effet dose-dépendant comme démontré sur les graines de tomate [107]. À faible dose, c'est à dire les temps d'exposition plus court, cela augmente la division cellulaire et à forte dose cela l'inhibe [108, 109].

Deux autres mutants (*ttg1* et *tt8* [110, 111]) sont aussi utilisés mais ne montrent pas de réponse significative au plasma. Le gène *TTG1* code pour une protéine indispensable à l'accumulation de pigment (les anthocyanes). Il agit de pair avec les protéines codées par les gènes *GL2* et *TT8*. Le gène *TT8* est un facteur de transcription essentiel pour la voie de biosynthèse des anthocyanes et proanthocyanidines. Aucune différence n'a pu être observée entre les graines contrôles et traitées du fait de leur germination déjà très basse.

Comme expliqué dans le début de ce travail, la germination est un phénomène complexe régulé par de nombreux facteurs tels que les hormones, les dormances, le vieillissement des graines ou encore les stress environnementaux [112-113]. C'est sur ce dernier point qu'est concentré la partie suivante. Cependant des études complémentaires sont proposées en perspectives afin de répondre à d'autres facteurs concernant le contrôle de la germination.

Dans un contexte de changement climatique et de salinisation des sols [114-116], il est intéressant d'observer la germination sous stress. De plus, *A. thaliana* est une plante à germination rapide et l'application de stress permet de retarder la germination, puisque la plante va devoir se protéger de ce stress, et donc de mieux apprécier les effets des traitements au plasma [117]. Cette étude met en évidence la neutralisation partielle par traitement plasma des effets néfastes du sel et du stress osmotique sur la germination des graines.

Le stress salin a des effets négatifs sur la germination en grande partie dus aux déséquilibres ioniques mais aussi aux interférences dans l'absorption de l'eau et des nutriments essentiels au développement des plantes [118]. En présence d'une concentration élevée de NaCl, le taux et la vitesse de germination diminuent fortement [119].

Les graines traitées au plasma à basse température et germées en condition saline sont affectées par ce stress ; néanmoins, il faut noter que le taux de germination des graines traitées est plus élevé que celui des graines témoins. Cela signifie que l'effet plasma neutralise partiellement l'effet négatif du stress salin.

La mise en germination de graines en condition de stress osmotique et en présence de PEG a eu pour effet une réduction et un retard du taux de germination. Le traitement au PEG inhibe plus fortement la germination des graines que le traitement au NaCl [120]. Cela pourrait s'expliquer par le déséquilibre ionique des tissus de la graine, l'entrée de NaCl réduirait la pression osmotique mais les cellules végétales n'étant pas perméables au PEG, l'équilibre ionique reste trop fort pour une germination optimale des graines [120, 121]. Cependant, il est à noter que le plasma à basse température réduit l'effet du stress osmotique en permettant un meilleur taux de germination.

Dans un but d'application des résultats, il est essentiel de voir si les effets du traitement par le plasma sont durables dans le temps ou non. En effet, une longévité de l'effet du traitement permettrait à terme un stockage des graines avant semis. Dans ce cas-ci, la cinétique de germination mise en place, allant de t0 à t0 + 9 jours après traitement, montre bien que les effets positifs du plasma sur la germination s'amenuisent avec le temps. Nous pouvons émettre l'hypothèse de l'importance des RONS produits par le traitement plasma sur la surface des graines, pour expliquer l'augmentation du taux et de la vitesse de germination puisque nous savons que ces espèces ont une durée de vie limitée de plus, il est déjà bien décrit dans la littérature l'importance de ces espèces dans le contrôle de la germination [122-123]. De plus, il serait intéressant d'observer les effets du traitement plasma à plus longue durée (jusqu'à un an par exemple) afin d'observer si le traitement induit un changement de viabilité à long terme.

D'autre part, nous avons étudié les effets possibles du traitement plasma à basse température sur la surface des graines. Le tégument joue un rôle important lors de l'étape de germination car il agit à la fois comme une protection physique [124] mais peut également agir comme une contrainte pour la libération de la radicule [125]. Ainsi, toute modification chimique ou structurale des couches externes peut affecter la germination des graines [12].

La microscopie électronique à balayage a révélé une modification importante de l'aspect de la surface des graines traitées au plasma. Cette altération, qui ressemble à une gravure plasma de la surface, a également été relevée lors de mes observations en microscopie confocale. Quel que soit l'écotype, la surface des différentes graines est similaire au contrôle Col-0 en l'absence de traitement plasma. Après le traitement au plasma, une modification significative est observée à la surface des graines de Col-0 et du mutant *gl2* puisqu'une disparition du signal fluorescent est constatée. L'observation des graines du mutant *gpat5* montre que le traitement au plasma a un effet moindre par rapport aux deux autres génotypes. Cela peut s'expliquer par le déficit en cuticules du mutant *gpat5 ;* de plus son faible taux de germination pourrait être expliqué par une dormance initiale plus profonde des graines de ce mutant [102] et pourrait plaider en faveur d'une structure lipidique formée à la surface des graines après traitement plasma. L'augmentation du taux de germination et le changement de la structure de surface sont donc corrélés [74, 126].

Afin d'expliquer un peu plus la stimulation de la germination par le plasma, l'hypothèse d'un effet de limitation des échanges avec l'environnement direct de la graine après un traitement au plasma est avancée [127]. Il apparaît que les couches protectrices de l'embryon ont été altérées par le traitement plasma réduisant la perméabilité des graines de tous les génotypes. Cela semblait contradictoire avec notamment une étude précédente qui avait montré une augmentation de l'absorption d'eau pour les graines de pois traitées au plasma [74]. Cet écart peut être lié à la difficulté d'effectuer une absorption d'eau avec les graines d'*A. thaliana*, qui ont la capacité d'extruder une couche de mucilage en présence d'eau [128] et qui sont plus petites que les graines de pois. La diminution de la perméabilité due au traitement plasma à basse température pourrait cependant expliquer la réduction de l'effet inhibiteur du NaCl et du PEG. De plus, cette imperméabilisation pourrait participer au piégeage du peu d'eau que contient la graine qui pourrait par la suite servir efficacement à la germination indépendamment des conditions d'humidité exogène.

Les expérimentations concernant l'angle de contact nous montrent une augmentation de l'hydrophilicité de la surface des graines de *C. sativa*. Ces résultats sont en accord avec la littérature [4 ; 83 ; 84] mais en quelque sorte semble contradictoire avec la réduction de la perméabilité observée précédemment sur l'*A. thaliana* traitée au plasma. En fait c'était pour répondre à la question sur la cohérence observée entre l'augmentation du taux de germination et la baisse concomitante de la perméabilité de l'*A. thaliana* traitée au plasma, qu'on a fait des expériences d'abord sur l'angle de contact de *C. sativa* (morphologiquement proche d'*A.*

thaliana mais de taille plus grande) qui a montré une augmentation de sa mouillabilité. Ces expériences ont été suivies par une première série d'expériences sur la perméabilité de *C. sativa*. Ces premières expérimentations sur la perméabilité des graines de Caméline *sativa* montrent comme sur *A. thalina* une tendance à la réduction de la perméabilité qui, pour être plus significative, nécessite d'être confirmées par des expériences futures. Cependant, ces premiers résultats vont dans le bon sens pour montrer la cohérence de ce double effet (baisse de perméabilité et augmentation du taux de germination) observé sur les graines l'*A. thaliana* traitées au plasma. De plus, l'hypothèse du lissage de la surface entrainée par la gravure plasma ainsi que des possibles interactions chimiques et électrostatiques est émise pour expliquer un étalement plus important de la goutte à la surface des graines traitées.

La modification de la surface des graines observée en microscopie ainsi que la baisse de la perméabilité des graines peut nous laisser penser que des composés lipidiques de surface pourraient être modifiés. C'est dans ce but que nous avons cherché à identifier les lipides libres présents sur la surface de la graine.
L'analyse de ces derniers montre un changement de composition après traitement. Nous observons notamment la diminution après traitement de certains lipides comme l'acide palmitique qui est un lipide de base produit par la graine. Ceci indique une réorganisation des lipides se trouvant à la surface des graines par le traitement au plasma. Indépendamment de ces changements structurels, nous ne pouvons pas exclure la formation de nouveaux groupes fonctionnels qui pourraient stimuler la germination des graines [129-130]. De plus l'observation de composés lipidiques de plus petites tailles nous oriente vers la piste d'une réduction de taille des lipides déjà présents à la surface qui affecterait donc la perméabilité et la mouillabilité des graines.

D'autre part, il est montré que les graines d'*A. thaliana* possèdent sur la face extérieure une couche de cellules sécrétrices du mucilage [131].Après avoir observé les changements sur la surface des graines nous nous sommes donc intéressés à observer l'intégrité des cellules sécrétrices du mucilage qui sont les cellules en contact direct avec le plasma. Le mucilage, un gel polysaccharidique, sécrété par cette dernière couche cellulaire peut avoir un impact sur la germination [132-133].. Nous avons noté qu'il n'y a pas de changement quant à l'aspect du mucilage des graines sur Col-0 ainsi que pour les graines des mutants *gl2* et *tt8*. Les changements observés sur les deux autres lignées mutantes peuvent résulter de l'importance des gènes mutés dans le relargage du mucilage. Ces observations nous indiquent que le

changement de surface est uniquement superficiel puisque l'intégrité et la fonctionnalité de ces cellules restent, pour la plupart et notamment pour le génotype de référence, entières.

Malgré la production avérée d'espèces réactives par les plasmas [134, 135], l'observation de ces mêmes espèces sur les graines ne montre aucune différence pour le même stade de germination qui est comme on l'a vu précédemment un peu plus précoce lorsque la graine est traitée par plasma. Parmi les RONS de durée de vie variables créés (voir la section III.4.1), on peut expliquer cela en supposant que seul les RONS à faible durée de vie seraient effectifs lors de la phase de germination. De plus, la quantification de l'activité des peroxydases ne montre également aucune différence avec ou sans traitement plasma. Cela est cohérent avec la constance du niveau de RONS présents sur les graines. Enfin la courte durée de vie de certain RONS peut expliquer l'amenuisement de l'effet du traitement sur la germination.
Cela reste cohérent vis-à-vis de la littérature ou l'importance essentielle des RONS dans le contrôle à la fois positif et négatif est indiqué [41-46 ; 122 ; 123]. De plus, les observations indiquent que la quantité de RONS à un même stade de germination est le même quel que soit le traitement mais cette germination étant avancée on observe plus de RONS après traitement plasma ce qui nous indique clairement leur importance.

En ce qui concerne l'effet de l'eau activée par plasma utilisé pour l'arrosage pendant la phase post-germination durant la croissance des plantes, la conductivité est augmentée dans les deux types d'eaux activées par plasma (eau du robinet qui contient des espèces neutres comme des espèces chargées et eau dé-ionisée qui ne contient plus d'ions mais qui peut contenir des espèces non chargées). De plus, les espèces réactives quantifiées (nitrite, nitrate, ammonium, peroxyde d'hydrogène, etc.) voient également leur concentration augmenter en particulier dans le cas de l'eau de robinet et non dans l'eau distillée. D'ailleurs seule l'eau du robinet a montré un effet significatif sur la croissance. En tous cas toutes ces espèces réactives générées par le plasma en phase aqueuse et notamment le nitrate et l'ammonium ont donc la capacité d'agir, probablement de façon synergique, comme une sorte d'engrais stimulants la croissance et le développement des plantes [136, 137]. ,
De plus, nous avons observé que l'ammonium et le nitrate sont encore présents après plusieurs jours dans l'eau activée. Cette durée de vie assez grande de ces deux RNS nous conforte dans notre démarche de leur attribuer une effet stimulateur certain sur la croissance des plantes.
Enfin la cinétique de traitement de l'eau en fonction du temps d'exposition au plasma nous permet d'affirmer que le traitement de 15 minutes est un bon compromis pour l'activation de

l'eau, compromis entre la quantité de RONS produite et le temps passé à les produire. Ceci ne peut être mis en corrélation avec d'autres études de la littérature puisque le traitement indirect avec de l'eau activé dépend de la géométrie du dispositif ainsi que des paramètres électriques comme souligné par exemple dans l'étude de Park et al en 2013 [82].

IV.2 Conclusion

Cette thèse pluridisciplinaire a été consacrée à la recherche de quelques pistes pour la compréhension de l'effet des traitements directs et indirects au plasma froid sur la germination des graines et le développement des plantes.

Afin de comprendre ces effets, une phase d'optimisation a été nécessaire pour identifier le plasma et ses conditions d'utilisation pour avoir le meilleur effet sur la germination à savoir une augmentation du taux et de la vitesse. Grâce à cela, il est déterminé que le plasma d'air, généré avec la FE-DBD, en traitement direct de 15 minutes avait le plus d'effet positif sur la germination de graines d'*A. thaliana*.

Après cette phase d'optimisation, le traitement de mutants, affectés dans l'intégrité du manteau de la graine, a donnée des résultats contrastés. En effet, le mutant *gl2* est stimulé tandis que le mutant *gpat5* a une germination inhibée après traitement, ce type de traitement n'a aucun effet sur la germination des mutants *tt8* et *ttg1*.

Dans un contexte de changement climatique global, la résistance aux stress salin et osmique a été étudiée. Dans ce but, le génotype sauvage Col-0 ainsi que les mutants *gpat5* et *gl2* sont utilisés. La même tendance sur la germination est observée en présence ou absence de stress osmotique et salin. Cependant il est à noter que l'effet du plasma est plus important en condition saline et permet une neutralisation partielle du stress sur la germination.

Un autre aspect de l'étude des effets du plasma est sa longévité dans le temps. Il a été démontré dans cette étude que l'augmentation de la vitesse de germination n'est plus significative au-delà de 7 jours après le traitement des graines au plasma.

Dans une seconde phase de l'étude, après avoir montré les effets du traitement plasma sur la vitesse de germination, nous nous sommes intéressés de plus près à la surface des graines. Il est observé un changement sur la surface des graines traitées au plasma d'air. Ce changement après analyse est dû à une réorganisation des lipides de surface présents sur la graine. En effet, certains composés tels que les acides palmitiques ou linoléiques ne sont plus ou peu retrouvés après le traitement.

Directement liées à la surface, les analyses de la perméabilité des graines révèlent que le traitement au plasma réduit la perméabilité de la graine à l'eau. Ceci reste cohérent avec le remaniement des lipides de surface ainsi qu'à la résistance accrue au stress salin.

Par la suite, les mesures de l'angle de contact sur la Cameline (graine morphologiquement et phylogénétiquement proche de l'A. *thaliana* mais de taille plus grande) ont montré des résultats opposés à ceux attendus avec la baisse de la perméabilité puisqu'ici la mouillabilité des graines de Cameline a augmenté après traitement au plasma. Après mesure de la perméabilité de cette graine cette réduction est également observée et il est avancé la possibilité d'interactions électrostatiques affectant la tension de surface de la goutte corrélés avec la gravure plasma observée au MEB.

En outre, la couche la plus externe des graines notamment d'A. *thaliana* est constituée de cellules sécrétrices du mucilage qui permettent la libération de ce gel polysaccharidique qui est important dans le processus de germination mais aussi dans l'imbibition. Après observation, il est démontré que l'intégrité de ces cellules reste dans la plupart des cas inchangée après traitement au plasma.

Les ROS étant produits en grande quantité grâce au traitement plasma, leur présence a été analysée. Il s'avère que la quantité de ROS ainsi que l'activité peroxydase correspondante est similaire avant ou après traitement au plasma. À un temps donné la présence est plus importante sur des graines traitées mais cela est corrélé avec l'avancement ou la précocité du processus de germination.

Dans une dernière partie, le développement des plantes est observé après traitement indirect via l'eau activée par plasma. Ici nous pouvons noter que l'eau du robinet activée par plasma a un effet positif sur le développement des parties aériennes des plantes. C'est-à-dire que les plantes arrosées avec l'eau activée sont plus grandes et fleurissent plus vite. De plus l'analyse de l'eau montre que le traitement de 15 minutes est un choix optimal pour créer une quantité suffisante de RONS dans l'eau du robinet activée en un temps de traitement acceptable.

IV.3 Perspectives

En plus du jet de plasma d'hélium et du plasma d'air avec la décharge à barrière diélectrique, nous disposons d'un appareillage corona multi-pointes qui crée un rideau de plasma dans l'air ambiant dans un espace inter-électrode de l'ordre du cm permettant un traitement de graines plus grandes qu'*A. thaliana*. Dans cette optique des expérimentations préliminaires ont été effectuées sur le lin et le colza avec le dispositif corona-multi-pointes. De plus, afin de comparer avec les différents dispositifs, les graines d'*A. thaliana* ont également été traitées avec le dispositif corona.

Les graines d'*A. thaliana* ont été traitées grâce au dispositif corona entre 30 secondes et 3 minutes. L'observation de la germination de ces graines montre une légère augmentation de la rupture du testa à 1,5 min de traitement. Au-delà de 2 minutes, la germination est réduite voire inhibée et en dessous d'une minute, il n'y a pas d'amélioration de la germination.

Une phase d'optimisation de ce traitement est donc nécessaire pour l'appliquer sur *A. thaliana*. Cependant nous pouvons déjà noter que ce dispositif a un effet beaucoup plus intense sur la germination puisqu'elle est inhibée après un court laps de temps. Cela est dû à la quantité d'énergie déposée sur la surface des graines, en effet nous pouvons observer une réduction de 90 % du temps de traitement passant de 900 à 90 secondes. Après calculs grâce aux mesures de courant et de tension, la quantité d'énergie sur cible est de 50 mW pour la FE-DBD et 100 mW pour la corona. L'augmentation de la quantité d'énergie n'est pas proportionnelle avec la diminution du temps de traitement cependant la quantité d'espèces réactives produites rentre également en jeux dans cet effet sur la germination et il est logique d'attendre une quantité plus importante avec le traitement corona.

Dans le but d'observer les effets des plasmas sur d'autres graines, le lin est utilisé avec le dispositif corona. Ici nous pouvons observer que le traitement indépendamment du temps (5 ou 10 min) n'a pas d'effet sur la germination (Figure IV-1).

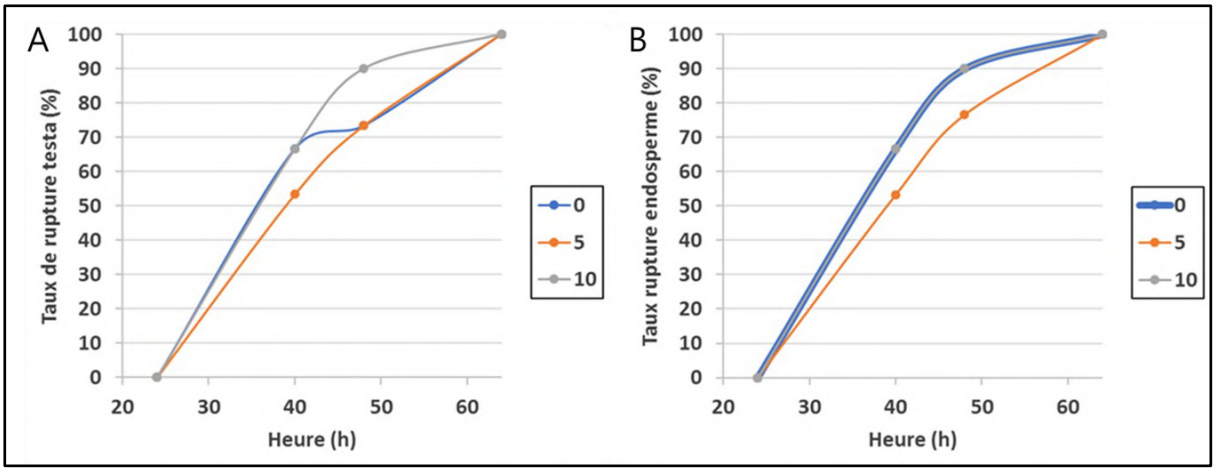


***Figure IV-1 : Modulation de l'effet du temps de traitement par la Corona sur la germination de* Linum usitatissimum.** *Courbe des pourcentages de rupture du testa (A) et de l'endosperme (B) sur des graines de* Linum usitatissimum *en fonction du temps après leur imbibition. Les graines ont subi un traitement au système Corona (10k V, 10 kHz). Chaque courbe représente un temps de traitement différent. Chaque point est le résultat d'un comptage de 90 graines.*

D'autre part, les graines de colza (*Brassica napus*) ont également été testées avec le dispositif corona multi-pointes, cependant la germination étant déjà très rapide, aucune différence de rupture du manteau n'est notée entre les graines contrôles et les graines traitées.
Les expérimentations présentées des traitements avec le dispositif corona sont des études préliminaires servant à l'optimisation de ce type traitement (paramètres électrique, temps de traitement, …), elles permettent de donner une direction pour de futures études sur des graines plus grosses qu'*A. thaliana*.

Enfin, cette étude a permis de donner des pistes quant aux effets du traitement plasma sur la germination, mais, il reste encore à comprendre plus précisément les mécanismes cellulaires et physiologiques induits par ce traitement.

Pour ce faire, dans un futur proche et dans le cadre de la collaboration Laplace-LRSV on envisage d'élargir les études à des graines appartenant à 2 familles différentes tout en poursuivant les travaux sur l'arabette : (i) en premier lieu, il est prévu des graines utilisées en laboratoire comme modèles : *Arabidopsis thaliana* et *Medicago truncatula* (ii) et en second lieu des graines d'intérêt agronomique telles que le colza (*Brassica napus*) et la luzerne (*Medicago sativa*). *A. thaliana* et B. *napus* appartiennent à la famille des Brassicaceae tandis que *M. truncatula* et *M. sativa* à celle des Fabaceae. La continuité de l'utilisation d'*A. thaliana* nous permettra de pousser plus loin la compréhension de la physiologie végétale et des mécanismes

induits par le plasma grâce notamment à des analyses plus fines à l'échelle cellulaire (transcriptomique et protéomique). Tandis que *B. napus* permet d'étendre le champ d'investigation à une plante d'intérêt agronomique. Ensuite on étudiera le *M. truncatula* qui est une petite légumineuse largement utilisée en laboratoire et qui peut former des symbioses avec des bactéries et des champignons tandis que *M. sativa* est une plante d'intérêt agronomique cultivée comme plante fourragère pour sa teneur élevée en protéines.

De plus, il serait intéressant d'observer les effets du plasma en fonction de la dormance primaire ou secondaire (mettre en présence de condition non favorable ou en présence d'hormone induisant la dormance) mais aussi en fonction de l'âge des graines. En effet on sait qu'une graine juste après maturation n'a pas la même capacité germinative qu'une graine plus vieille. Dans le même temps, on continuera le développement du dispositif SC-DBD (surface coplanar dielectric barrier discharge) commencé dans le cadre de cette thèse pour pouvoir traiter des graines de plus grandes tailles et en plus grande quantité, en générant le plasma directement à partir de l'air ambiant sans avoir besoin de système de conditionnement du gaz (donc pas de bouteilles ni de débitmètres, ni de pompes, etc) tout en utilisant une alimentation électrique alternative standard. Naturellement, ce type de plasma devra être minutieusement caractérisé notamment par spectroscopie d'émission et laser ainsi que par des études électriques et d'imagerie du plasma pour identifier et quantifier les densités et énergies des principales espèces actives en biologie végétale en fonction des paramètres opératoires. Ces études expérimentales devront nécessairement être associées à des travaux de modélisation électro-hydrodynamiques et chimiques du plasma afin d'accéder à des informations spatio-temporelles très localisées sur les densités et les températures des espèces actives du plasma et aussi sur le champ électrique de charge d'espace susceptible d'affecter également les effets biologiques généralement observées sur la germination des graines et leur croissance.

Enfin les analyses poussées sur les réactions physiologiques des graines d'*A. thaliana* permettrons de comprendre avec précision les effets du plasma qu'ils soient directement physiques ou induits. De plus, l'équipe EEP du LRSV dispose d'écotype d'*A. thaliana*, qui sont des variants naturels adaptés à leurs environnements. L'utilisation de cette population permettra l'obtention de résultats plus fins que l'utilisation de certains mutants.

Références bibliographiques

1. United Nation. Wolrd population prospect. In: https://population.un.org/wpp/ ,2019.

2. Bentham J, Singh GM, Danaei G, Green R, Lin JK, Stevens GA, Farzadfar F, Bennet JE, Di Cesare M, Dangour D, Ezzati M. Multidimensional characterization of global food supply from 1961 to 2013. Nature Food. 2020;1:70-5. doi: 10.1038/s43016-019-0012-2.

3. Krapivina S, Filippov A, Levitskaya T, Bakhvalov. A, Gas plasma treatment of plant seeds, USPatent US5281315 A, 1994.

4. Dobrin D, Magureanu M, Mandache NB, Ionita MD. The effect of non-thermal plasma treatment on wheat germination and early growth. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2015;29:255-60. doi: 10.1016/j.ifset.2015.02.006.

5. Volin JC, Denes FS, Young RA, Park SMT. Modification of seed germination performance through cold plasma chemistry technology. Crop Science. 2000;40:1706-18. doi: 10.2135/cropsci2000.4061706x.

6. Scholtz V, Sera B, Khun J, Sery M, Julak J. Effects of nonthermal plasma on wheat grains and products. Journal of Food Quality. 2019. doi: 10.1155/2019/7917825.

7. Sera B, Sery M, Gavril B, Gajdova I. Seed germination and early growth responses to seed pre-treatment by non-thermal plasma in hemp cultivars (*Cannabis sativa L.*). Plasma Chemistry and Plasma Processing. 2017;37(1):207-21. doi: 10.1007/s11090-016-9763-9.

8. Marcer A, Vidigal DS, James PMA, Fortin MJ, Mendez-Vigo B, Hilhorst HWM, Bentsink L, Alonso-Blanco C, Picó F. X. Temperature fine-tunes mediterranean *Arabidopsis thaliana* life-cycle phenology geographically. Plant Biology. 2018;20:148-56. doi: 10.1111/plb.12558.

9. Kaul S, Koo HL, Jenkins J, Rizzo M, Rooney T, Tallon LJ, et al. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature. 2000;408(6814):796-815. doi: 10.1038/35048692.

10. Loconte H, Stevenson DW. Cladistics of the spermatophyta. Brittonia. 1990;42(3):197-211. doi: 10.2307/2807216.

11. Baroux C, Grossniklaus U. Seeds - An evolutionary innovation underlying reproductive success in flowering plants. In: Grossniklaus U, editor. Plant Development and Evolution. Current Topics in Developmental Biology. 131. San Diego: Elsevier Academic Press Inc; 2019. p. 605. doi : 10.1016/bs.ctdb.2018.11.017

12. Kelly KM, Vanstaden J, Bell WE. Seed coat structure and dormancy. Plant Growth Regulation. 1992;11(3):201-9. doi: 10.1007/bf00024559.

13. Belmonte MF, Kirkbride RC, Stone SL, Pelletier JM, Bui AQ, Yeung EC, Hashimoto M, Fei J, Harada CM, Munoz MD, Le BH, Drews GN, Brady SM, Goldberg RB, Harada JJ. Comprehensive developmental profiles of gene activity in regions and subregions of the Arabidopsis seed. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;110(5):435-44. doi: 10.1073/pnas.1222061110.

14. Crang R, Lyons-Sobaski S, Wise R. Fruits, seeds, and seedlings. Plant Anatomy: Springer Cham; 2018. doi : 10.1007/978-3-319-77315-5_19.

15. Khera N, Saxena AK, Singh RP. Seed size variability and its influence on germination and seedling growth of five multipurpose tree species. Seed Science and Technology. 2004;32(2):319-30. doi: 10.15258/sst.2004.32.2.05.

16. Edwards PJ, Kollmann J, Fleischmann K. Life history evolution in *Lodoicea maldivica* (Arecaceae). Nordic Journal of Botany. 2002;22(2):227-37. doi: 10.1111/j.1756-1051.2002.tb01371.x.

17. Riefler M, Novak O, Strnad M, Schmulling T. Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. Plant Cell. 2006;18(1):40-54. doi: 10.1105/tpc.105.037796.

18. Bregman R. Forms of seed dispersal in cactaceae. Acta Botanica Neerlandica. 1988;37(3):395-402. doi: 10.1111/j.1438-8677.1988.tb02148.x.

19. Penfield S. Seed dormancy and germination. Current Biology. 2017;27(17):R874-R8. doi: 10.1016/j.cub.2017.05.050.

20. Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. Science. 1998;282(5389):662, 79-82. Epub 1998/10/23. doi: 10.1126/science.282.5389.662.

21. Woodward AW, Bartel B. Biology in bloom: a primer on the *Arabidopsis thaliana* model system. Genetics. 2018;208(4):1337-49. doi: 10.1534/genetics.118.300755.

22. Burghardt LT, Edwards BR, Donohue K. Multiple paths to similar germination behavior in *Arabidopsis thaliana*. New Phytologist. 2016;209(3):1301-12. doi: 10.1111/nph.13685.

23. Michael D. *Arabidopsis thaliana* : from weed to model organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 2019; 19(e38). doi: 10.1002/cpet.38.

24. Bewley D, Black M. Seeds: Springer Science & Business Media New York; 1994.

25. Bewley JD. Seed germination and dormancy. Plant Cell. 1997;9(7):1055-66. doi: 10.1105/tpc.9.7.1055.

26. Linkies A, Graeber K, Knight C, Leubner-Metzger G. The evolution of seeds. New Phytologist. 2010, 186: 817-831. doi : 10.1111/j.1469-8137.2010.03249.x

27. Krishnasamy V, Seshu DV. Seed-germination rate and associated characters in rice. Crop Science. 1989;29(4):904-8. doi: 10.2135/cropsci1989.0011183X002900040012x.

28. Chacon P, Bustamante R, Henriquez C. The effect of seed size on germination and seedling growth of *Cryptocarya alba* (Lauraceae) in Chile. Revista Chilena De Historia Natural. 1998;71(2):189-97.

29. Shu K, Liu XD, Xie Q, He ZH. Two faces of one seed: Hormonal regulation of dormancy and germination. Molecular Plant. 2016;9(1):34-45. doi: 10.1016/j.molp.2015.08.010.

30. Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. Seed Science Research. 2005;15(4):281-307. doi: 10.1079/ssr2005218.

31. Matilla AJ, Matilla-Vazquez MA. Involvement of ethylene in seed physiology. Plant Science. 2008;175(1-2):87-97. doi: 10.1016/j.plantsci.2008.01.014.

32. Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C. Molecular aspects of seed dormancy. Annual Review of Plant Biology. 59. Palo Alto: Annual Reviews; 2008. p. 387-415, doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092740.

33. Sanz L, Albertos P, Mateos I, Sánchez-Vicente I, Lechón T, Fernández-Marcos M, Lorenzo O, Nitric oxide (NO) and phytohormones crosstalk during early plant development, Journal of Experimental Botany, 2015;66:10;2857-2868. doi : 10.1093/jxb/erv213

34. Albertos P, Romero-Puertas M, Tatematsu K, Sánchez-Vicente I, Lorenzo O. S-nitrosylation triggers ABI5 degradation to promote seed germination and seedling growth. Nature Communication. 2015; 6,8669. doi : 10.1038/ncomms9669

35. Pearce S, Huttly AK, Prosser IM, Li Y, Vaughan SP, Gallova B, Patil A, Coghill JA, Dubcovsky J, Hedden P, Phillips AL. Heterologous expression and transcript analysis of gibberellin biosynthetic genes of grasses reveals novel functionality in the GA3ox family. BMC Plant Biology. 2015; 15, 130. doi : 10.1186/s12870-015-0520-7

36. Miransari M, Smith DL. Plant hormones and seed germination. Environmental and Experimental Botany. 2014;99:110-21. doi: 10.1016/j.envexpbot.2013.11.005.

37. Diaz-Vivancos P, Barba-Espin G, Hernandez JA. Elucidating hormonal/ROS networks during seed germination: insights and perspectives. Plant Cell Reports. 2013;32(10):1491-502. doi: 10.1007/s00299-013-1473-7.

38. DeRose HR. Persistence of some plant growth-regulators when applied to the soil in herbicidal treatments. Botanical Gazette. 1946;107(4):583-9. doi: 10.1086/335386.

39. Poppe C, Schafer E. Seed germination of *Arabidopsis thaliana* phyA/phyB double mutants is under phytochrome control. Plant Physiology. 1997;114(4):1487-92. doi: 10.1104/pp.114.4.1487.

40. Lee KP, Piskurewicz U, Tureckova V, Carat S, Chappuis R, Strnad M, Fankhauser C, Lopez-Molina L. Spatially and genetically distinct control of seed germination by phytochromes A and B. Genes & Development. 2012;26(17):1984-96. doi: 10.1101/gad.194266.112.

41. Kranner I, Roach T, Beckett RP, Whitaker C, Minibayeva FV. Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. Journal of Plant Physiology. 2010;167(10):805-11. doi: 10.1016/j.jplph.2010.01.019.

42. Lariguet P, Ranocha P, De Meyer M, Barbier O, Penel C, Dunand C. Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in Arabidopsis. Planta. 2013;238(2):381-95. doi: 10.1007/s00425-013-1901-5.

43. Dunand C, Crevecoeur M, Penel C. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in Arabidopsis root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. New Phytologist. 2007;174(2):332-41. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.01995.x.

44. Pasternak T, Potters G, Caubergs R, Jansen MAK. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. Journal of Experimental Botany. 2005;56(418):1991-2001. doi: 10.1093/jxb/eri196.

45. Grison MS, Brocard L, Fouillen L, Nicolas W, Wewer V, Dörmann P, Nacir H, Benitez-Alfonso Y, Claverol S, Germain V, Boutté Y, Mongrand S, Bayer EM. Specific membrane lipid composition is important for plasmodesmata function in Arabidopsis. The Plant Cell. 2015;27(4):1228-50.

46. Choudhury S, Panda P, Sahoo L, Panda SK. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. Plant Signaling & Behavior. 2013;8(4). doi: 10.4161/psb.23681.

47. Baxter A, Mittler R, Suzuki N. ROS as key players in plant stress signalling. J Exp Bot. 2014;65(5):1229-40. Epub 2013/11/21. doi: 10.1093/jxb/ert375.

48. Cosio C, Dunand C. Specific functions of individual class III peroxidase genes. Journal of Experimental Botany. 2009;60(2):391-408. doi: 10.1093/jxb/ern318.

49. Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C. The class III peroxidase multigenic in land plants family in rice and its evolution. Phytochemistry. 2004;65(13):1879-93. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.06.023.

50. Jiafeng J, Xin H, Ling L. Effect of cold plasma treatment on seed germination and growth of wheat. 2014. doi: 10.1088/1009-0630/16/1/12.

51. Adhikari B, Khanal R. Introduction to the plasma state of matter. The Himalayan Physics. 2013;4(4):60-4. doi: 10.3126/hj.v4i0.9430.

52. Tierno SP, del Rio E, Donoso JM. The fourth state of matter? Plasma introduction for pre-university studies. Revista Eureka Sobre Ensenanza Y Divulgacion De Las Ciencias. 2015;12(3):601-7.

53. Mutaf-Yardimci O, Saveliev AV, Fridman AA, Kennedy LA. Thermal and nonthermal regimes of gliding arc discharge in air flow. Journal of Applied Physics. 2000;87(4):1632-41. doi: 10.1063/1.372071.

54. Jemmat A, Dunand C, Yousfi M, Sarrette J, Wattieaux G, Merbahi N, Judée F. Effects of three low temperature plasmas on early events of *Arabidopsis thaliana* germination. ICPIG XXXII; Lasi Romania 2015.

55. Dudeck M, Doveil F, Arcis N, Zurbach S, Iop, editors. Plasma propulsion for geostationary satellites for telecommunication and interplanetary missions. 1st International Symposium on Electrical Arc and Thermal Plasmas in Africa (ISAPA); 2011 Oct 17-22; Ouagadougou, BURKINA FASO 2012.

56. Agarwal A, Bera K, Kenney J, Likhanskii A, Rauf S. Modeling of low pressure plasma sources for microelectronics fabrication. Journal of Physics D-Applied Physics. 2017;50(42):13. doi: 10.1088/1361-6463/aa88f0.

57. Riazi H, Ashrafizadeh F, Eslami A. Effect of plasma nitriding parameters on corrosion performance of 17-4 PH stainless steel. Canadian Metallurgical Quarterly. 2017;56(3):322-31. doi: 10.1080/00084433.2017.1340542.

58. Sardella E, Detomaso L, Gristina R, Senesi GS, Agheli H, Sutherland DS, Agostina R, Favia P. Nano-structured cell-adhesive and cell-repulsive plasma-deposited coatings: Chemical and topographical effects on keratinocyte adhesion. Plasma Processes and Polymers. 2008;5(6):540-51. doi: 10.1002/ppap.200800005.

59. Samouillan V, Merbahi N, Yousfi M, Gardou J, Delaunay F, Dandurand J, Lacabanna C. Effect of low-temperature plasma jet on thermal stability and physical structure of type I collagen. Transactions on Plasma Science. 2012;40(6):1688-95. doi: 10.1109/tps.2012.2190303.

60. Laroussi M. Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: Review, analysis, and prospects. Ieee Transactions on Plasma Science. 2002;30(4):1409-15. doi: 10.1109/tps.2002.804220.

61. Hung YW, Lee LT, Peng YC, Chang CT, Wong YK, Tung KC. Effect of a nonthermal-atmospheric pressure plasma jet on wound healing: An animal study. Journal of the Chinese Medical Association. 2016;79(6):320-8. doi: 10.1016/j.jcma.2015.06.024.

62. Chauvin J, Gibot L, Griseti E, Golzio M, Rols MP, Merbahi N, Vicendo P. Elucidation of *in vitro* cellular steps induced by antitumor treatment with plasma-activated medium. Scientific Reports. 2019;9. doi: 10.1038/s41598-019-41408-6.

63. Griseti E, Kolosnjaj-Tabi J, Gibot L, Fourquaux I, Rols MP, Yousfi M, Merbaho N, Golzio M. Pulsed electric field treatment enhances the cytotoxicity of plasma-activated liquids in a three-dimensional human colorectal cancer cell model. Scientific Reports. 2019;9. doi: 10.1038/s41598-019-44087-5.

64. Akimoto Y, Ikehara S, Yamaguchi T, Kim J, Kawakami H, Shimizu N, Hori M, Sakakita H, Ikehara Y. Galectin expression in healing wounded skin treated with low-temperature plasma: Comparison with treatment by electronical coagulation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2016;605:86-94. doi: 10.1016/j.abb.2016.01.012.

65. Yousfi M, Eichwald O, Merbahi N, Jomaa N. Analysis of ionization wave dynamics in low-temperature plasma jets from fluid modeling supported by experimental investigations. Plasma Sources Science & Technology. 2012;21(4). doi: 10.1088/0963-0252/21/4/045003.

66. Cosimi J, Marchal F, Merbahi N, Caractérisations d'un jet de plasma froid d'hélium à pression atmosphérique, Thèse 2020.

67. Yousfi M, Merbahi N, Pathak A, Eichwald O. Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: toward new pharmaceutical treatments in medicine. Fundamental & Clinical Pharmacology. 2014;28(2):123-35. doi: 10.1111/fcp.12018.

68. Mraihi A, Merbahi N, Yousfi M, Abahazem A, Eichwald O. Electrical and spectroscopic analysis of mono- and multi-tip pulsed corona discharges in air at atmospheric pressure. Plasma Sources Sci. Technol. 2011, 20:065002. doi: 10.1088/0963-0252/20/6/065002

69. Graves DB. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. Journal of Physics D-Applied Physics. 2012;45(26). doi: 10.1088/0022-3727/45/26/263001.

70. Zhou RW, Zhou RS, Zhang XH, Zhuang JX, Yang SZ, Bazaka K, Ostrikov K. Effects of atmospheric-pressure N-2, He, Air, and O-2 microplasmas on mung bean seed germination and seedling growth. Scientific Reports. 2016;6. doi: 10.1038/srep32603.

71. Dubinov A, Lazarenko E, Selemir V. Effect of glow discharge air plasma on grain crops seed. Transactions on Plasma Science. 2000;28(1):180-3. doi: 10.1109/27.842898.

72. Jiang JF, Lu YF, Li JG, Li L, He X, Shao HL, Dong Y. Effect of seed treatment by cold plasma on the resistance of tomato to *Ralstonia solanacearum* (bacterial wilt). Plos One. 2014;9(5). doi: 10.1371/journal.pone.0097753.

73. Puac N, Zivkovic S, Selakovic N, Milutinovic M, Boljevic J, Malovic G, Petrovic ZL. Long and short term effects of plasma treatment on meristematic plant cells. Applied Physics Letters. 2014;104(21). doi: 10.1063/1.4880360.

74. Stolarik T, Henselova M, Martinka M, Novak O, Zahoranova A, Cernak M. Effect of low-temperature plasma on the structure of seeds, growth and metabolism of endogenous phytohormones in pea (*Pisum sativum L.*). Plasma Chemistry and Plasma Processing. 2015;35(4):659-76. doi: 10.1007/s11090-015-9627-8.

75. Butscher D, Van Loon H, Waskow A, von Rohr PR, Schuppler M. Plasma inactivation of microorganisms on sprout seeds in a dielectric barrier discharge. International Journal of Food Microbiology. 2016;238:222-32. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.006.

76. Ahn C, Gill J, Ruzic DN. Growth of plasma-treated corn seeds under realistic conditions. Scientific Reports. 2019;9:7. doi: 10.1038/s41598-019-40700-9.

77. Fadhlalmawla SA, Mohamed AAH, Almarashi JQM, Boutraa T. The impact of cold atmospheric pressure plasma jet on seed germination and seedlings growth of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). Plasma Science & Technology. 2019;21(10):12. doi: 10.1088/2058-6272/ab2a3e.

78. Alves C, Vitoriano JD, da Silva DLS, Farias MD, Dantas NBD. Water uptake mechanism and germination of *Erythrina velutina* seeds treated with atmospheric plasma. Scientific Reports. 2016;6:7. doi: 10.1038/srep33722.

79. Kucerova K, Henselova M, Slovakova L, Hensel K. Effects of plasma activated water on wheat: Germination, growth parameters, photosynthetic pigments, soluble protein content, and antioxidant enzymes activity. Plasma Processes and Polymers. 2019;16(3):14. doi: 10.1002/ppap.201800131.

80. Ji SH, Kim T, Panngom K, Hong YJ, Pengkit A, Park DH. Assessment of the effects of nitrogen plasma and plasma-generated nitric oxide on early development of *Coriandum sativum*. Plasma Processes and Polymers. 2015;12(10):1164-73. doi: 10.1002/ppap.201500021.

81. Meng Y, Qu G, Wang T, Sun Q, Liang D, Hu S. Enhancement of germination and seedling growth of wheat seed using dielectric barrier discharge plasma with various gas sources. Plasma Chem Plasma Process. 2017; 37:1105–1119. doi: 10.1007/s11090-017-9799-5.

82. Park DP, Davis K, Gilani S, Alonzo CA, Dobrynin D, Friedman G, Fridman A, Rabinovich A, Fridman G. Reactive nitrogen species produced in water by non-equilibrium plasma increase plant growth rate and nutritional yield. Current Applied Physics. 2013;13:S19-S29. doi: 10.1016/j.cap.2012.12.019.

83. Sivachandiran L, Khacef A. Enhanced seed germination and plant growth by atmospheric pressure cold air plasma: combined effect of seed and water treatment. Rsc Advances. 2017;7(4):1822-32. doi: 10.1039/c6ra24762h.

84. Li L, Li JG, Shao HL, Dong YH. Effects of low-vacuum helium cold plasma treatment on seed germination, plant growth and yield of oilseed rape. Plasma Science & Technology. 2018;20(9):7. doi: 10.1088/2058-6272/aac3d0.

85. Zahoranova A, Hoppanova L, Simoncicova J, Tuekova Z, Medvecka V, Hudecova D, Kalinakova B, Kovacik D, Cernak M. Effect of cold atmospheric pressure plasma on maize seeds: enhancement of seedlings growth and surface microorganisms inactivation. Plasma Chemistry and Plasma Processing. 2018;38(5):969-88. doi: 10.1007/s11090-018-9913-3.

86. Shapira Y, Bormashenko E, Whyman G, Drori E, Chen R, Avraham L. Impact of conditions of water supply on the germination of tomato and pepper seeds. Advances in Seed Biology2017. p. 123-39, doi: 10.5772/intechopen.70386.

87. Selcuk M, Oksuz L, Basaran P. Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus spp.* and *Penicillum spp.* by cold plasma treatment. Bioresource Technology. 2008;99(11):5104-9. doi: 10.1016/j.biortech.2007.09.076.

88. Zhang XH, Liu DP, Zhou RW, Song Y, Sun Y, Zhang Q, Niu J, Fan H, Yang S. Atmospheric cold plasma jet for plant disease treatment. Applied Physics Letters. 2014;104(4). doi: 10.1063/1.4863204.

89. Sera B, Zahoranova A, Bujdakova H, Sery M. Disinfection from pine seeds contaminated with *Fusarium circinatum nirenberg & o'donnell* using non-thermal plasma treatment. Romanian Reports in Physics. 2019;71(1):12.

90. Misra NN, Patil S, Moiseev T, Bourke P, Mosnier JP, Keener KM, Cullen PJ. In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of strawberries. Journal of Food Engineering. 2014;125:131-8. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.10.023.

91. Bafoil M, Le Ru A, Merbahi N, Eichwald O, Dunand C, Yousfi M. New insights of low-temperature plasma effects on germination of three genotypes of *Arabidopsis thaliana* seeds under osmotic and saline stresses. Scientific Reports. 2019;9:10. doi: 10.1038/s41598-019-44927-4.

92. Bafoil M, Jemmat A, Martinez Y, Merbahi N, Eichwald O, Dunand C, Yousfi M. Effects of low temperature plasmas and plasma activated waters on *Arabidopsis thaliana* germination and growth. PLoS One. 2018;13(4):e0195512. Epub 2018/04/09. doi: 10.1371/journal.pone.0195512.

93. Merbahi N, Yousfi M, Eichwald O, inventors; UPS & CNRS, assignee. Device for emitting a plasma jet from the atmospheric air at ambient temperature and pressure, and use of said device. France 2011.

94. Yousfi M, Merbahi N, Sarrette JP, Eichwald O, Ricard A, Gardou JP, Ducasse O, Benhenni M. Non thermal plasma sources of production of active species for biomedical uses: analyses, optimization and prospect. In: Fazel PR, editor. Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges 2011

95. Hachiya T, Sakakibara H. Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants. Journal of Experimental Botany. 2017;68(10):2501-12. doi: 10.1093/jxb/erw449.

96. Zhou RW, Li JW, Zhou RS, Zhang XH, Yang SZ. Atmospheric-pressure plasma treated water for seed germination and seedling growth of mung bean and its sterilization effect on mung bean sprouts. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2019;53:36-44. doi: 10.1016/j.ifset.2018.08.006..

97. Monaco TA, MacKown CT, Johnson DA, Jones TA, Norton JM, Norton JB, Redinbaugh MG. Nitrogen effects on seed germination and seedling growth. Journal of Range Management. 2003;56(6):646-53. doi: 10.2307/4003941.

98. Fedoseev G, Ioppolo S, Zhao D, Lamberts T, Linnartz H. Low-temperature surface formation of NH_3 and HNCO: hydrogenation of nitrogen atoms in CO-rich interstellar ice analogues. Monthly Notices of the Royal Astronomical Society. 2015;446(1):439-48. doi: 10.1093/mnras/stu2028.

99. Judee F, Simon S, Bailly C, Dufour T. Plasma-activation of tap water using DBD for agronomy applications: Identification and quantification of long lifetime chemical species and production/consumption mechanisms. Water Research. 2018;133:47-59. doi: 10.1016/j.watres.2017.12.035.

100. Han GL, Wei XC, Dong XX, Wang CF, Sui N, Guo JR, Yuan F, Gong Z, Li X, Zhang Y, Meng Z, Chen Z, Zhao D, Wang B. Arabidopsis Zinc Finger Protein1 acts downstream of GL2 to repress root hair initiation and elongation by directly suppressing bHLH genes. Plant Cell. 2020;32(1):206-25. doi: 10.1105/tpc.19.00226.

101. Shi L, Katavic V, Yu Y, Kunst L, Haughn G. Arabidopsis glabra2 mutant seeds deficient in mucilage biosynthesis produce more oil. Plant J. 2012;69(1):37-46. Epub 2011/09/03. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04768.x.

102. Beisson F, Li Y, Bonaventure G, Pollard M, Ohlrogge JB. The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of Arabidopsis. Plant Cell. 19 2007. p. 351-68, doi: 10.1105/tpc.106.048033.

103. Jayawardhane KN, Singer SD, Weselake RJ, Chen GQ. Plant sn-Glycerol-3-Phosphate acyltransferases: biocatalysts involved in the biosynthesis of intracellular and extracellular lipids. Lipids. 2018;53(5):469-80. doi: 10.1002/lipd.12049.

104. Wu R, Citovsky V. Adaptor proteins GIR1 and GIR2. I. Interaction with the repressor GLABRA2 and regulation of root hair development. Biochem Biophys Res Commun. 2017;488(3):547-53. Epub 2017/05/21. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.084.

105. Molina I, Ohlrogge JB, Pollard M. Deposition and localization of lipid polyester in developing seeds of *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 2008;53(3):437-49. Epub 2008/01/04. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03348.x.

106. Zheng Z, Xia Q, Dauk M, Shen W, Selvaraj G, Zou J. Arabidopsis AtGPAT1, a member of the membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase gene family, is essential for tapetum differentiation and male fertility. Plant Cell. 2003;15(8):1872-87. Epub 2003/08/05. doi: 10.1105/tpc.012427.

107. Yin MQ, Huang MJ, Ma BZ, Ma TC. Stimulating effects of seed treatment by magnetized plasma on tomato growth and yield. Plasma Science & Technology. 2005;7(6):3143-7.

108. Plewa JM, Yousfi M, Frongiz C, Eichwald O, Ducommun B, Merbahi N, Lobjois V. Low-temperature plasma-induced antiproliferative effects on multi-cellular tumor spheroids. New Journal of Physics. 2014;16. doi: 10.1088/1367-2630/16/4/043027.

109. Zerrouki A, Yousfi M, Rhallabi A, Motomura H, Jinno M. Monte Carlo poration model of cell membranes for application to plasma gene transfection. Plasma Processes and Polymers. 2016;13(6):633-48. doi: 10.1002/ppap.201500144.

110. Paffendorf BAM, Qassrawi R, Meys AM, Trimborn L, Schrader A. TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 participates in flowering time regulation in *Arabidopsis thaliana*. Peerj. 2020;8:35. doi: 10.7717/peerj.8303.

111. Li SF, Allen PJ, Napoli RS, Browne RG, Pham H, Parish RW. MYB-bHLH-TTG1 regulates Arabidopsis seed coat biosynthesis pathways directly and indirectly via multiple tiers of transcription factors. Plant Cell Physiol. 2020. Epub 2020/03/11. doi: 10.1093/pcp/pcaa027.

112. Finch-Savage W.E and Leubner-Metzger G. Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist. 2006. 171: 501-523. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x

113. Sano n, Rajjou L, North H.M, Debeaujon I, Poll A.M, Seo M, Staying alive: molecular aspects of seed longevity, Plant and Cell Physiology, 2016. 57:4:660–674. doi: 10.1093/pcp/pcv186

114. Jeppesen E, Brucet S, Naselli-Flores L, Papastergiadou E, Stefanidis K, Noges T, Attayde JL, Zohary T, Coppens J, Bucak T, Fernandes Menezes R, Sousa Freitas FR, Kernan M, Søndergaard M, Beklioğlu M. Ecological impacts of global warming and water abstraction on lakes and reservoirs due to changes in water level and related changes in salinity. Hydrobiologia. 2015;750(1):201-27. doi: 10.1007/s10750-014-2169-x.

115. Tomaz A, Palma P, Alvarenga P, Gonçalves MC, Prasad MNV, Pietrzykowski M. Soil salinity risk in a climate change scenario and its effect on crop yield. Climate Change and Soil Interactions: Elsevier; 2020. p. 351-96, doi: 10.1016/B978-0-12-818032-7.00013-8.

116. Szekely-Varga Z, González-Orenga S, Cantor M, Jucan D, Boscaiu M, Vicente O. Effects of drought and salinity on two commercial varieties of *Lavandula angustifolia* mill. Plants. 2020;9(5):637. doi: 10.3390/plants9050637.

117. Nasri N, Maatallah S, Kaddour R, Lachaal M. Effect of salinity on *Arabidopsis thaliana* seed germination and acid phosphatase activity. Archives of Biological Sciences. 2016;68(1):17-23. doi: 10.2298/abs150620003n.

118. Abdul Qados AMS. Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 2011;10(1):7-15. doi: 10.1016/j.jssas.2010.06.002.

119. Cheng Y, Zhang XX, Sun TY, Tian QY, Zhang WH. Glutamate receptor homolog3.4 is involved in regulation o seed germination under salt stress in Arabidopsis. Plant and Cell Physiology. 2018;59(5):978-88. doi: 10.1093/pcp/pcy034.

120. Alam MZ, Stuchbury T, Naylor REL. Effect of NaCl and PEG induced osmotic potentials on germination and early seedling growth of rice cultivars differing in salt tolerance. Pakistant Journal of Biological sciences. 2002;5(11):1207-10. doi: 10.3923/pjbs.2002.1207.1210.

121. Almansouri M, Kinet J-M, Lutts S, Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum Desf.*). Plant and Soil. 2001;231(2):243-54. doi: 10.1023/A:1010378409663.

122. Bailly, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Science Research,. 2004. 14(2), 93-107. doi: 10.1079/SSR2004159

123. Arc E, Galland M, Godin B, Cueff Gl, Rajjou L. Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination, Frontiers in Plant Science, 2013.4:346. doi: 10.3389/fpls.2013.00346

124. Souza AJ, Santos PO, Pinto MST, Wermelinger TT, Ribeiro ES, Souza SC, Filho JX, Fernandes KVS, Oliveira AEA. Natural seed coats provide protection against penetration by *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. Crop Protection. 2011;30(6):651-7. doi: 10.1016/j.cropro.2010.12.014.

125. Watkins JT, Cantliffe DJ. Mechanical resistance of the seed coat and endosperm during germination of *Capsicum annuum* at low-temperature. Plant Physiology. 1983;72(1):146-50. doi: 10.1104/pp.72.1.146.

126. Dhayal M, Lee SY, Park SU. Using low-pressure plasma for *Carthamus tinctorium L.* seed surface modification. Vacuum. 2006;80(5):499-506. doi: 10.1016/j.vacuum.2005.06.008.

127. Long Y, Tan DY, Baskin CC, Baskin JM. Seed dormancy and germination characteristics of *Astragalus arpilobus* (Fabaceae, subfamily Papilionoideae), a central Asian desert annual ephemeral. South African Journal of Botany. 2012;83:68-77. doi: 10.1016/j.sajb.2012.06.010.

128. Francoz E, Ranocha P, Burlat V, Dunand C. Arabidopsis seed mucilage secretory cells: regulation and dynamics. Trends in Plant Science. 2015;20(8):515-24. doi: 10.1016/j.tplants.2015.04.008.

129. Wanasundara P, Wanasundara UN, Shahidi F. Changes in flax (*Linum usitatissimum L.*) seed lipids during germination. Journal of the American Oil Chemists Society. 1999;76(1):41-8. doi: 10.1007/s11746-999-0045-z.

130. Feussner I, Wasternack C, Kindl H, Kuhn H. Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1995;92(25):11849-53. doi: 10.1073/pnas.92.25.11849.

131. James RR, Buckner JS, Freeman TP. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. Journal of Invertebrate Pathology. 2003;84(2):67-74. doi: 10.1016/j.jip.2003.08.006.

132. Saez-Aguayo S, Rondeau-Mouro C, Macquet A, Kronholm I, Ralet MC, Berger A, Sallé C, Poulain D, Granier F,Lucy Loudet O, Meaux J, Marion-Poll A, North HM. Local evolution of seed flotation in Arabidopsis. Plos Genetics. 2014;10(3). doi: 10.1371/journal.pgen.1004221.

133. Arsovski AA, Popma TM, Haughn GW, Carpita NC, McCann MC, Western TL. AtBXL1 encodes a bifunctional beta-d-xylosidase/alpha-l-arabinofuranosidase required for pectic arabinan modification in Arabidopsis mucilage secretory cells. Plant Physiology. 2009;150(3):1219-34. doi: 10.1104/pp.109.138388.

134. Kim SJ, Chung TH. Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells. Scientific Reports. 2016;6. doi: 10.1038/srep20332.

135. Busco G, Fasani F, Dozias S, Ridou L, Douat C, Pouvesle JM, Robert E, Grillon C. Changes in oxygen level upon cold plasma treatments: consequences for RONS production. Ieee Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences. 2018;2(2):147-52. doi: 10.1109/trpms.2017.2775705.

136. Mangano S, Juarez SPD, Estevez JM. ROS Regulation of polar growth in plant cells. Plant Physiology. 2016;171(3):1593-605. doi: 10.1104/pp.16.00191.

137. Swanson S, Gilroy S. ROS in plant development. Physiologia Plantarum. 2010;138(4):384-92. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01313.x.

Annexes

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Effects of low temperature plasmas and plasma activated waters on *Arabidopsis thaliana* germination and growth

Maxime Bafoil[1,2☯], Achraf Jemmat[1,2☯¤], Yves Martinez[3], Nofel Merbahi[1], Olivier Eichwald[1], Christophe Dunand[2]*, Mohammed Yousfi[1]*

1 LAPLACE, UMR CNRS 5213, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, **2** Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Auzeville, Castanet Tolosan, France, **3** Fédération de Recherche 3450, Plateforme Imagerie, Pôle de Biotechnologie Végétale, Castanet-Tolosan, France

☯ These authors contributed equally to this work.
¤ Current address: Institute for Botany and Molecular Genetics, Bioeconomy Science Center, RWTH Aachen University, Aachen, Germany
* yousfi@laplace.univ-tlse.fr (MY); dunand@lrsv.ups-tlse.fr (CD)

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Bafoil M, Jemmat A, Martinez Y, Merbahi N, Eichwald O, Dunand C, et al. (2018) Effects of low temperature plasmas and plasma activated waters on *Arabidopsis thaliana* germination and growth. PLoS ONE 13(4): e0195512. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195512

Editor: Tobias Isaac Baskin, University of Massachusetts Amherst, UNITED STATES

Received: September 29, 2017

Accepted: March 23, 2018

Published: April 9, 2018

Copyright: © 2018 Bafoil et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: University Paul Sabatier Toulouse CNRS

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Two plasma devices at atmospheric pressure (air dielectric barrier discharge and helium plasma jet) have been used to study the early germination of *Arabidopsis thaliana* seeds during the first days. Then, plasma activated waters are used during the later stage of plant development and growth until 42 days. The effects on both testa and endospserm ruptures during the germination stage are significant in the case of air plasma due to its higher energy and efficiency of producing reactive oxygen species than the case of helium plasma. The latter has shown distinct effects only for testa rupture. Analysis of germination stimulations are based on specific stainings for reactive oxygen species production, peroxidase activity and also membrane permeability tests. Furthermore, scanning electron microscopy (SEM) has shown a smoother seed surface for air plasma treated seeds that can explain the plasma induced-germination. During the growth stage, plants were watered using 4 kinds of water (tap and deionized waters activated or not by the low temperature plasma jet). With regards to other water kinds, the characterization of the tap water has shown a larger conductivity, acidity and concentration of reactive nitrogen and oxygen species. Only the tap water activated by the plasma jet has shown a significant effect on the plant growth. This effect could be correlated to reactive nitrogen species such as nitrite/nitrate species present in plasma activated tap water.

Introduction

Low temperature plasmas are initially composed by a background gas medium subjected to an electric or electromagnetic stress that allows to initial seed electrons (naturally present in the gas medium) to store energy high enough to undergo many inelastic processes with atoms or

molecules of the background gas. Those inelastic ionization or dissociation or excitation collisions due to the energetic electrons lead to the creation of new plasma species as radicals, ions, long-lived excited species, neutral byproducts, photons and even electric field self-induced by the space charges present in the plasma. The physico-chemical properties of these active plasma species are exploited in many fields as for instance biomedical and plant biology.

Indeed, most research on the effects of plasmas on organisms began about a decade ago and has been conducted by physicists as well as by biologists. Systems studied include, for instance, wound healing or malignant cell inactivation (e.g. [1–3] and the references given therein). Prior to these investigations in this "plasma medicine" field, there is a long list of research devoted to sterilization and decontamination of surfaces based on the bactericide properties of low temperature plasmas. Most of this literature is devoted to the inactivation of planktonic microorganisms [4, 5] and some to biofilm removal [6, 7]. There is also research in the field of engineering of biomaterial and tissues exploiting, for instance, the ability of low temperature plasmas to change the surface properties and to functionalize surfaces [8, 9]. There are also studies in the field of plasma gene transfection which is promising for applications in regenerative medicine and/or gene therapy [10, 11].

However, the use of low temperature plasmas in the field of plant biology has been less investigated than in the biomedical field. The first studies date back to the 1990s where a patented glow discharge device using different gases at low pressure (O_2 and N_2-O_2 mixtures) stimulated the germination and the growth of soybean seeds [12]. This was followed by a few studies devoted to plasma treatments of for instance the stimulation of germination of certain grain crops by using a low pressure direct-current and pulsed glow air discharges [13,14]. Another study demonstrated that low pressure helium radio-frequency discharge induces growth of tomato seeds and resistance to tomato wilt (a bacterial disease) after harvest [15]. There are also recent investigations on the effect of two nano-pulsed electric discharge devices on the stimulation of germination of brown mustard seeds [16]. In fact, seeds from various species (maize, oat, wheat, radish, tomato, bean, lentil, sunflower, honey clover and soy, etc.) were already studied up to now using different plasma setups (radio-frequency discharges, microwave discharges, gliding discharges, surface discharges, etc.) at low or atmospheric pressures using various gas compositions (Air, Ar, He, O_2, or mixtures of part of them, etc.). However, only a very few of them are devoted to analysis on the plasma effects and the action mechanisms at the cellular level (see e.g. [17]).

Thus, even though low temperature plasmas commonly enhance germination and plant growth, the mechanism for this effect remains largely unexplored.

Here, we use *Arabidopsis thaliana*, a plant model for many years, to continue a previous studies on how low temperature plasmas affect germination that allowed us more particularly to select the plasma devices and the seed exposure times [18]. Here, we compare two plasma devices: (i) a helium plasma jet setup [19] and (ii) a floating electrode dielectric barrier discharge in ambient air [20] both powered by a pulsed high voltage generator.

It is noteworthy that seeds have generally important resistant structures necessary to ensure the transition between two successive generations. The formation of mature seed of *A*. *thaliana* takes about twenty days following fertilization. Seeds comprise three principal tissues that are, starting from outside to inside: (i) the testa or the seed coat; (ii) the endosperm, which is divided in 3 parts: the peripheral, the chalazal, and the micropylar endosperm, the last being adjacent to the radicle and; (iii) the embryo, enclosed by the two first envelopes, which comprises hypocoyl, cotyledon, and radicle [21].

Furthermore, plants produce endogenous reactive oxygen species such as hydrogen peroxide, superoxide, hydroxyl radicals, constitutively throughout their lives. Reactive oxygen species have a dual role and a dose-dependent effect [22]. At high concentrations, these species

have an important oxidizing power and harm the development of the plant [15]. However, with a lower concentration, reactive oxygen species act as secondary messengers within the plant [23]. They are also involved in the regulation of *A*. *thaliana* seed dormancy [24] and in the breakdown of embryonic cell layers, such as testa rupture and endosperm rupture [25, 26]. It is noteworthy that the plants possess a battery of enzymes to achieve homeostasis for reactive oxygen species [22]. Class III peroxidases are part of these proteins; they can oxidize various phenolic compounds in presence of hydrogen peroxide and also regulated hydrogen peroxide concentration [27]. Class III peroxidases and hydrogen peroxide are co-localized in the testa and endosperm prior to rupture of these two envelopes [28]. More specifically, class III peroxidases are located at the periphery of the cells. The enzymatic activity of these proteins could play a role in the breakdown of the two cell envelopes to facilitate the radicle protrusion [29].

The present work consists of performing germination assays to confirm a positive plasma effect, and more precisely, the effects of plasma on the testa rupture and endosperm rupture since they are the two protective layers of the plant embryo. In addition, in order to study the long-term effect of plasma on plant development and growth, plasma-activated water is used as the source of water.

To access plasma-induced germination and effects of plasma-activated water on plant growth, we analyzed of reactive oxygen species and peroxidase activity based on colorimetric tests and we also analyzed seed membrane permeability. We used scanning electron microscopy (SEM) to underline the change on the seed surface after plasma treatment. Furthermore, to emphasize the role of long-lived aqueous reactive species on plant growth, we determined concentrations of protons, hydrogen peroxide, reactive nitrogen species and also conductivity of plasma-activated waters by using either distilled water or tap water.

Materials and methods

Plant material and biological assays

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh of the Columbia ecotype (Col) was used throughout. For each germination test, between 150 seeds to 300 seeds were exposed to the low temperature plasmas. Germination assays were performed after the plasma exposure at various times t_i ranging from immediately at time t_0 to times t_2 = 2 days, t_7 = 7 days and t_9 = 9 days. Culture took place in 35 mm diameter Petri dishes containing Whatman paper circles (3 MM Chr Chromatography Paper: Medium thickness: 0.34 mm). The paper was soaked with 0.5 mL of distilled water, with the exception of boxes containing plasma-activated water or non-activated water. The boxes were sealed with ANAPORE surgical tape. Germination took place in a culture chamber under controlled conditions (40% humidity, temperature 22˚C/20˚C, photoperiod 16 h/8 h). The germination was analyzed 24 h and 40 h after imbibition. The Petri dishes were observed at the Toulouse imaging platform by using a Zeiss Axiozoom V16 stereomicroscope and the pictures were taken using a Zeiss HRC colour camera. Germination stages were distinguished, as follows: (i) the absence of rupture, (ii) testa rupture and (iii) endosperm rupture. Six to nine hundred seeds from two technical replicates and from three independent biological experiments were analyzed for each condition.

To measure the effect of the plasma-activated water on development, 40 *A*. *thaliana* plants were sown and cultivated in a growth room (75% humidity, temperature 24˚C/20 ˚C, photoperiod 16 h/8 h). These plants were arbitrarily divided into four groups so that each one was watered with a particular kind of water: plasma activated distilled water, non-activated distilled water, plasma activated tap water and non-activated tap water. Watering was performed every 2 days using controlled volumes. The volume for watering was increased as plants develop (from 10 to 30 mL per week). Pictures of each plant were taken at regular intervals in order to

perform phenotypic analysis (the number of leaves, the leaf area and the rosette diameter). Ten plants per assay were analyzed and this experiment was performed twice independently.

Reactive oxygen species and nitrate quantifications; class III peroxidase activity and mucilage detection

Potassium permanganate ($KMnO_4$, Sigma Aldrich and Saint-Quentin Fallavier, France) was used to quantify the concentration of hydrogen peroxide generated in the plasma-activated water. The assay of 1 mL of water or plasma-activated water was titrated with 20 mM of potassium permanganate and the staining was quantified thanks to the change of colour to the equivalence solution. Colour change occurred when concentration equivalence was reached between hydrogen peroxide and potassium permanganate.

Nitro Blue tetrazolium chloride (NBT, Sigma-Aldrich) was used to detect in the seeds the presence of superoxide ion. The seeds were covered with a 2 mM aqueous solution and incubated for 30 min at room temperature in the dark. A blue colour appears at the surface of the seeds when superoxide ion is present [30].

To detect the amount of nitrate in water, 1-phenol-2,4-disulfonic acid (25% $C_6H_6O_7S_2$ in sulfuric acid, Sordalab, Etampes, France) was used. The assay was carried out in a 96-well plate using 100 μL of 10X-concentrated sample in a final volume of 200 μL containing phenol-disulfonic acid and NaOH at 10 M (to obtain a basic medium). Absorbance was quantified at 405 nm.

To observe the activity of peroxidases, seeds were incubated at room temperature during 30 min in the dark in 1 mL of 200 mM phosphate buffer, pH 6.1, containing 0.125% guaiacol (Fluka-Sigma-Aldrich, Steinheim, Switzerland) and 150 μL of 11 mM hydrogen peroxide. The oxidation of the guaiacol by the peroxidase releases a brown precipitate.

Mucilage released by the seed was observed after incubation of the treated and control seeds with a solution of 0.2% ruthenium red (Sigma-Aldrich).

The pictures for the 3,3′-diaminobenzidine (DAB) staining, class III peroxidase activity and released mucilage were taken without seed checking to avoid the dispersion of the non-adherent mucilage layer by using a Zeiss Axiozoom V16 stereomicroscope and a Zeiss HRC colour camera.

Membrane permeability test

The seed permeability assay was performed using 2,3–5 triphenyltetrazolium chloride (Tetrazolium red, Sigma Aldrich) that has the property to be reduced when it crosses the plasma membrane and form formazan, a red precipitate. Control seeds and seeds treated with the low temperature plasmas were incubated with a solution of 1% tetrazolium red for 40 h at 28˚C. The seeds were rinsed with distilled water and ground in 1.5 mL of 95% ethanol. After centrifugation at 3500 rpm for 3 min, the formazan contained in the supernatant was assessed by measuring absorbance at 492 nm.

Scanning electron microscopy (SEM)

The surface morphology and integrity of seeds were observed with SEM. Three independent batches involving treated and non-treated seeds were prepared. Each sample of 30 seeds was affixed to the surface of an aluminum stub with double-sided carbon tape and sputter coated with ~10 nm of platinum. SEM was carried out on a Quanta 250 FEG (FEI Company) at 5 kV acceleration voltage, a spot size of 3.0 and, a pressure of 3.50×10^{-4} Pa.

Statistical analysis

Image processing was performed using ImageJ version 1.46r [31]. The results were analyzed statistically using software R studio version 1.0.136 (cran.r-project.org). Student's tests and Wilcoxon tests were carried out to verify the normality of the results and the possible differences of the plasma effects between the different plasma treatments.

Low temperature plasma devices for seed treatment and water activation

For this study, two devices were used to generate low temperature plasmas generated at atmospheric pressure. The first device generates a plasma jet through a glass tube crossed by helium gas flow at atmospheric pressure [19]. This helium plasma jet launched in ambient air was used in both direct seed treatment and the water activation (Fig 1A). The second device is a dielectric barrier discharge generated in ambient air without rare gases and uses the seeds as a floating electrode [20] (Fig 1B). We refer to it here as: floating electrode dielectric-barrier discharge (FE-DBD).

The parameters of the pulsed power supply used to generate these two low temperature plasmas are 10 kV for the voltage, 9.7 kHz for the frequency and 1 μs for the pulse duration.

In the case of the plasma jet, the helium (with 4.5 for purity) was injected at 3 L min^{-1} through a glass tube (4 mm inner diameter). The distance between the tube outlet and the treated target (either seeds or water) was fixed at 2 cm.

Two types of treatment were performed with the helium plasma jet.

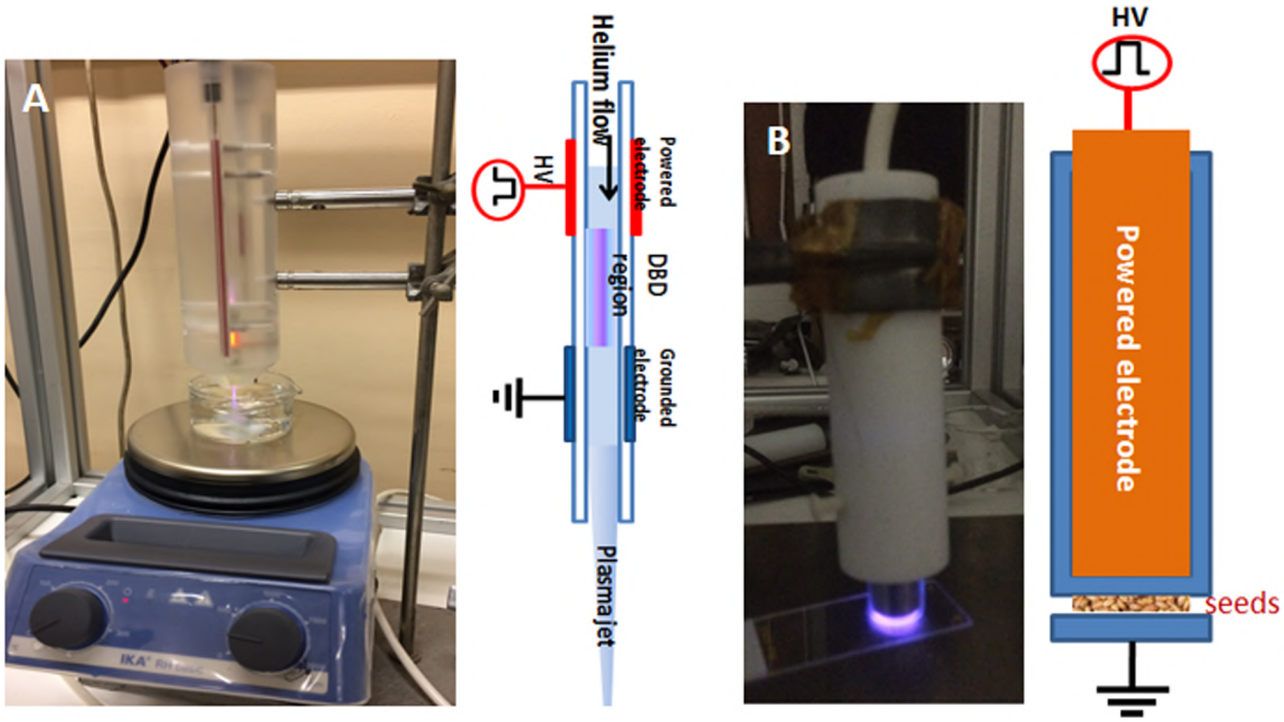


Fig 1. Different plasma devices. A. Schematic view of the helium plasma jet device on the right side and picture during the generation of plasma activated water inside a glass beaker using the helium plasma jet and a magnetic stirrer. B. Schematic view of the floating electrode-dielectric barrier discharges (FE-DBD) in air showing the powered electrode covered by glass (in blue colour) with seeds in ambient air plasma above the lamella (right side) and picture displaying the air plasma over the glass lamella.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195512.g001

1. For the direct treatment, 200 to 300 *A*. *thaliana* seeds are placed in a specific Eppendorf tube with a round bottom. The seeds were stirred half way through the exposure time to ensure a better homogeneity of the plasma treatment. A control test was carried out with a plasma-free helium flow. The optimal exposure time of 15 min was based on previous work [18].

2. For the water activation by the plasma jet, 30 mL of water, inside a beaker with magnetic stirring, were exposed to the plasma jet for 15 min. This activates distilled water (PAW_{H2Od}) and tap water (PAW_{tap}). To reduce experimental bias, the water volume needed for the 5 weeks involving germination and plant growth was set aside and stored at 4˚C in a large bottle at the initial time t_0. Then the required water volume per week (from 150 to 300 mL) was activated by the helium plasma jet at the beginning of each week. Controls with non-activated water were also executed. The plasma-activated water was stored at 4 ˚C in the dark to avoid the loss of reactive nitrogen and oxygen species.

In the case of the floating electrode dielectric-barrier discharge setup, the plasma formation is substantially different from the helium plasma jet since the plasma is generated directly in ambient air without using rare gases. The cylindrical high-voltage electrode, 8 mm in diameter, is covered by a glass dielectric with practically 8 mm for the inner diameter (Fig 1B). The grounded electrode is a thin glass plate (1 mm thickness) on which the seeds are placed. Six hundred to 800 *A*. *thaliana* seeds arranged on this glass plate in a circular manner (diameter of about 8 mm), are directly exposed to the air plasma action. The generated plasma species (radicals, excited, charged particles and photons) with the associated space charge electric field necessarily leads to a better plasma energy and efficiency than the case of helium plasma jet setup [20].

Results

Low temperature plasmas stimulate *A*. *thaliana* germination

Here we tested the effects of *Arabidopsis thaliana* germination rate of direct plasma treatment (helium plasma jet and air FE-DBD) and the indirect plasma actions (plasma activated tap and deionized waters). The seed germination rates were first determined for imbibition immediately after the plasma treatment (at time labelled t_0). Seeds treated with the air plasma had a significant increase of testa rupture and endosperm rupture 24 h and after imbibition when compared to the non-treated seeds (Fig 2). For the helium plasma jet, the only significant effect was observed 24 h after imbibition with an increase of the testa rupture (p-value = 0.01068). No significant effect was observed when the seeds were imbibibed with any of the plasma activated waters (Fig 2).

To determine whether the plasma treatment effect was retained, we assayed germination when imbibition followed the plasma treatment by 2, 7, or 9 days. As the air plasma effect appeared to be the strongest with immediate imbibition, the air plasma device was used for this test.

We assayed testa rupture at 24 h (Fig 3A) and 40 h (Fig 3B) and endosperm rupture after 40 h. For testa rupture at 24 h, the plasma treated increased the incidence of rupture from 1% or 2% in the controls to about 5%. The effect was highly significant with imbibition immediately after plasma treatment and became less so as time increased between plasma treatment and imbibition, although this lessened significance appeared to result from greater variability in the samples, both control and plasma-treated. At 40 h after imbibition, the plasma treatment increased the incidence of testa rupture from around 95% to nearly 100%, with the effect

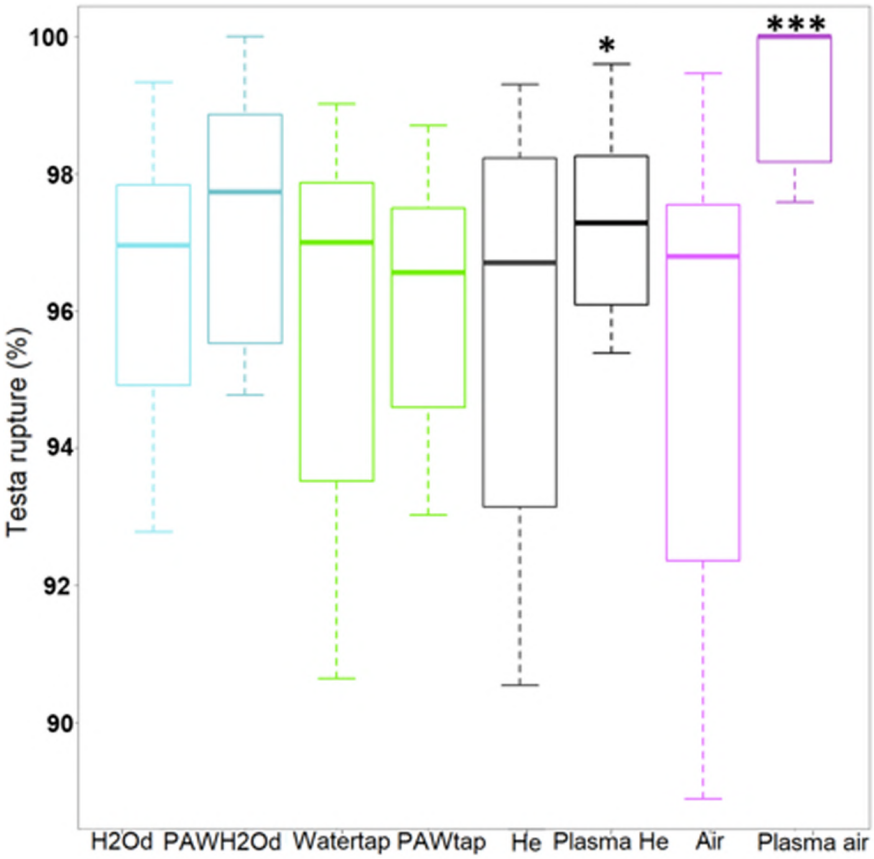


Fig 2. Direct and indirect plasma effects on germination rate of *Arabidopsis thaliana* seeds. The boxplots show the effects of different applied plasmas on the testa rupture. Observations are made on four independent assays at t0+24h. Six hundred seeds are counted for each batch. Wilcoxon test has been used for the significance between the means, the p-value is: $^{*} < 0.05$; $^{***} < 0.002$ (For data see S1 Fig).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195512.g002

becomes less clear with a 9 days interval again owing to the variability among the seeds (Fig 3B). These trends were confirmed by scoring endosperm rupture (Fig 3C).

Finally, Figs 2 and 3 show an increase of testa and endosperm rupture incidence for seeds treated by the air plasma as compared to control seeds. The early stages of germination (e.g. testa and endosperm ruptures) are generally controlled in part by reactive oxygen species. As the plasmas are a known source of reactive oxygen species, we analyzed plasma treated seeds for evidence of these species. As expected, class III peroxidases activity, as well as superoxide, was detected in the cells neighboring the rupture region (Fig 4 and [28]) but in terms of quantity no difference was observed between the treated and non-treated seeds. Due to the increased germination rate, stained seeds were observed after plasma treatment regarding class III peroxidases activity as well as superoxide detection. This indicates that the plasma treatment did not modify the quantity of produced reactive oxygen species but could accelerate their productions.

Seed imbibition is one of major factors controlling the transition from dry seed to germinating seed. Such as most of the plant aerial organs, *A*. *Thaliana* seeds possesses hydrophobic layer (cuticle) containing fatty acid. Recent studies have demonstrated that decrease of fatty acid containing alcohols and diols functional groups in the seed, both increase the seed coat permeability and the seed germination sensitivity to abscisic acid [31] and to gibberellin [32].

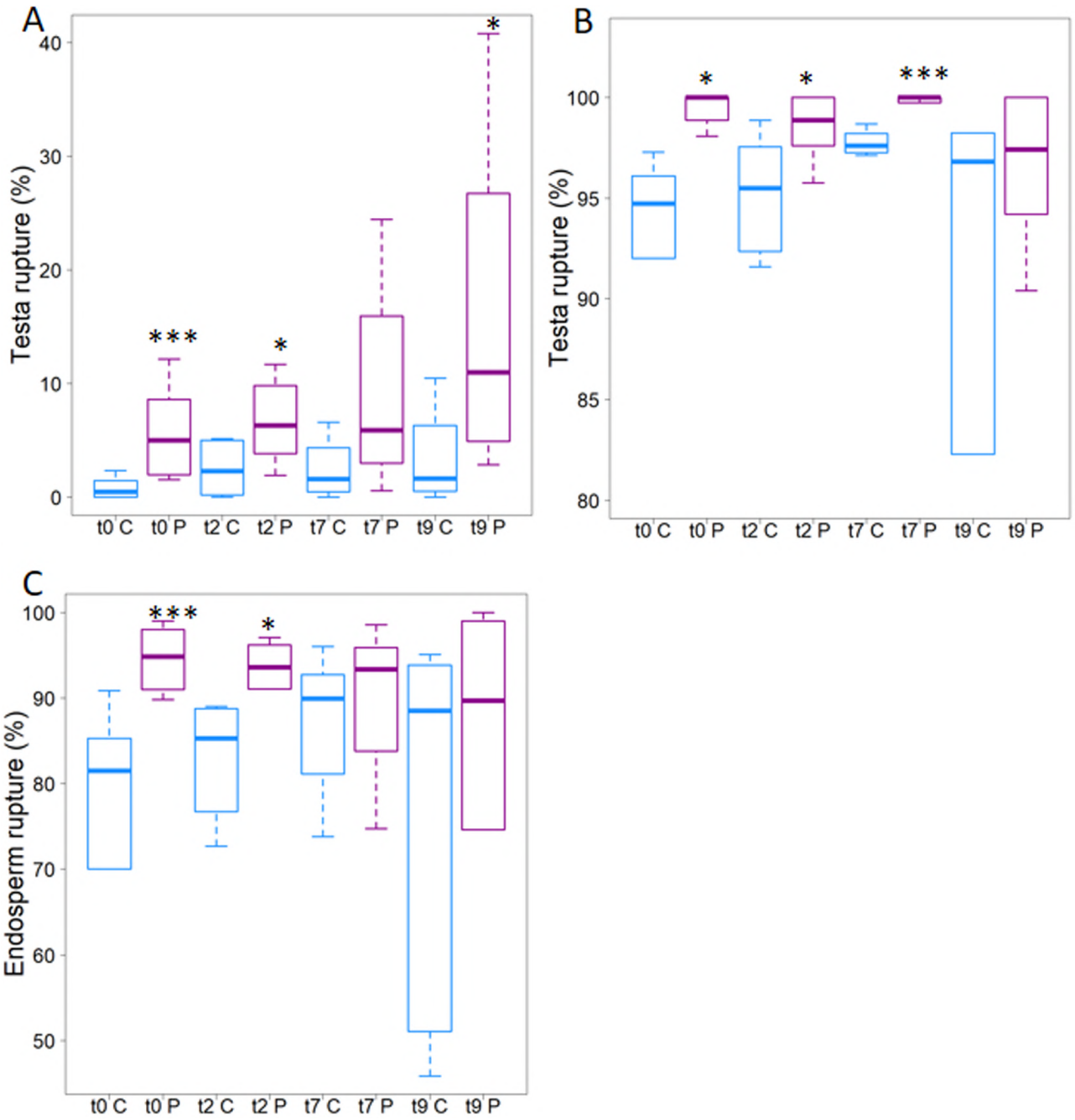


Fig 3. Air plasma stimulated germination rate of *A. thaliana*. Boxplots show control (cyan) and treated (magenta). A. Testa rupture as a function of time between treatment and imbibition (times t_0, t_2, t_7 and t_9 are given in days), observed 24 h after imbibition. B. As panel A but observations made at 40 h after imbibition. C. Endosperm rupture (observations at 40 h). Six hundred seeds are counted for each of the four considered batches. Wilcoxon test has been used to test the significance between the means, the p-value is: $^{*} < 0.05$; $^{***} < 0.002$ (For data see S1 Fig).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195512.g003

The permeability of *A. thaliana* seed coat is strongly enhanced in seeds with defect in fatty alcohols and diols [31, 33]. The treatment with the air plasma seems to largely modify the seed coat permeability as treated seed produced little if any red formazan is detected (Fig 5). This modification might be responsible for the variation in germination rate. Recent studies

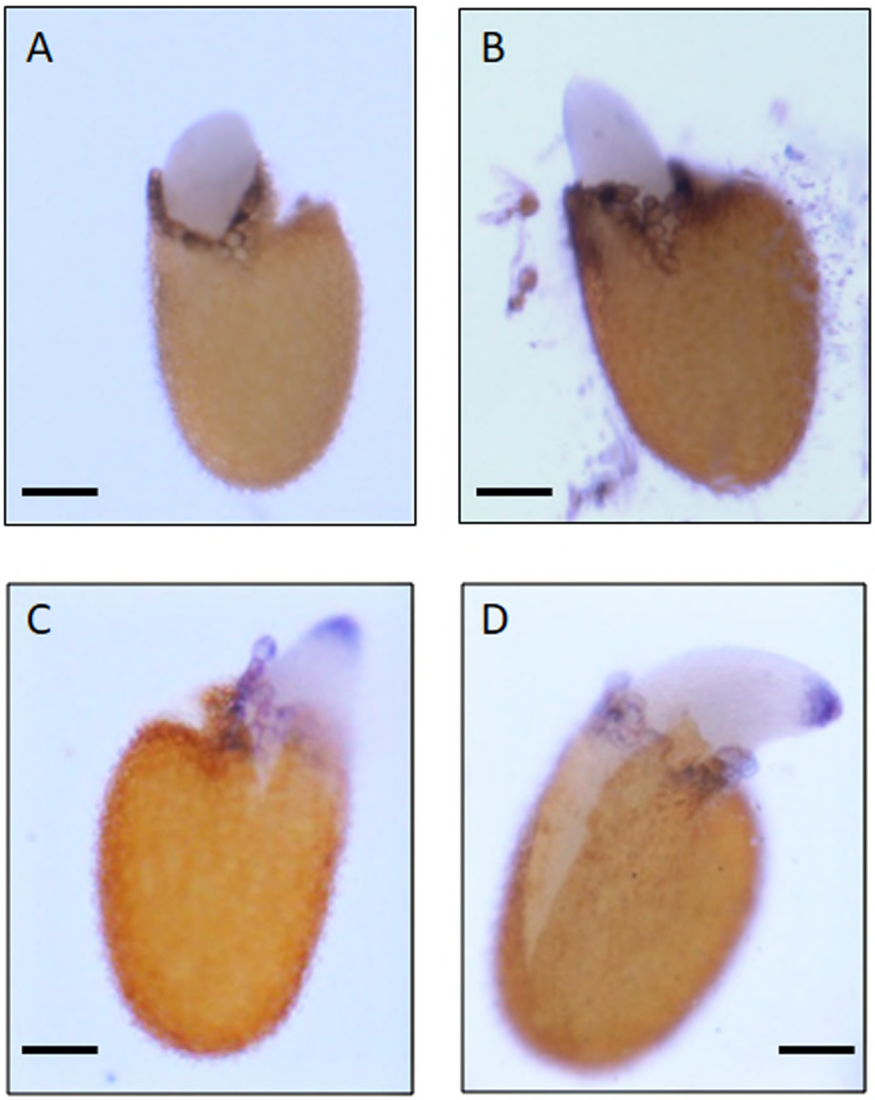


Fig 4. Class III peroxidases activity and reactive oxygen species detection. Class III peroxidases activity was detected seeds by using guaiacol as substrate (A and B). Superoxide ion $O_2^{\cdot -}$ was observed y with NBT (C and D). Control seeds (A and C) and seeds treated with air plasma (B and D). The intensity of the coloration appeared to be identical at the same level of germination for both cases (control or plasma treated seeds). Each scale bar corresponds to 100 μm.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195512.g004

performed on pea seeds have demonstrated an acceleration in water uptake following treatment with low temperature plasmas [34].

The seed coat has a major function during early germination steps, acting both as a physical protection against environment and as a constraint for radicle protrusion. Therefore any structural modification of this envelope could affect seed germination. To examine the seed coat, we used SEM. The SEM images show that plasma treatment reduced the prominence of the volcano-like protuberances (Fig 6A–6D) and changed the appearance of the surface of the seed, making it more granulated (Fig 6C–6F). The alteration of the seed surface due to plasma exposure can be associated with a modification of seed coat water uptake and therefore might directly affect the germination rate of the plasma treated seeds. Indeed, an increase of the

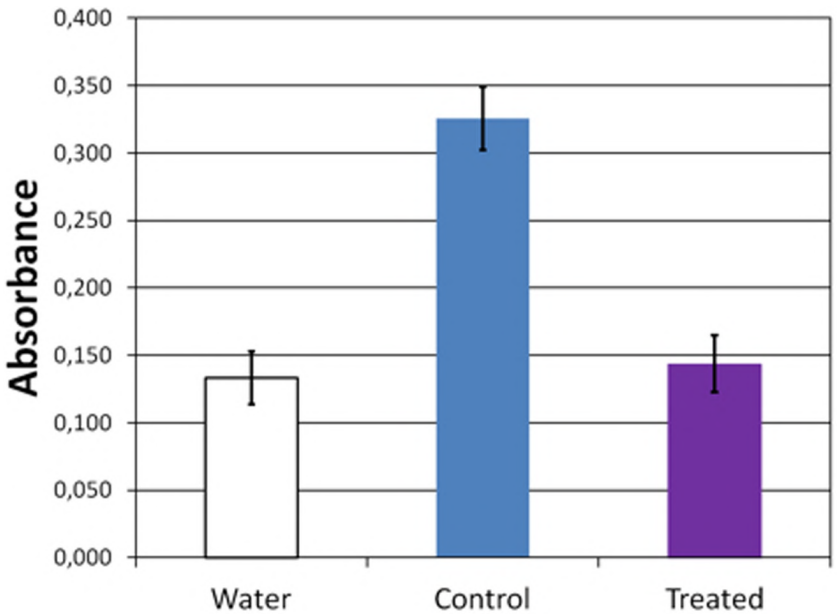


Fig 5. *A. thaliana* seed permeability assay. Seeds were incubated for 24 h in tetrazolium red at 28˚C and formazan production assayed by measuring absorbance of the incubation solution at 492 nm. For plasma treated (purple bar), the air plasma was used and seeds were incubated with tetrazolium immediately following treatment. Control (blue bar) were treated similarly but without activating the plasma. Water (white bar) treatment omitted the tetrazolium. Bars show mean of 4 assays and the error bars are 0.05 (For data see S1 Fig).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195512.g005

germination rate and a change in the surface structure has previously been reported for safflower (*Carthamus tinctorium*) and pea seeds [34, 35].

In addition, the modification of the seed coat surface is not transitory insofar as we observed similar changes of the seed surface 7 days after the plasma treatment.

Plasma-activated water stimulates *A. thaliana* development

In parallel to the germination assays, we tested the effect of plasma activated water on plant growth. Deionized and tap waters were exposed to the helium plasma jet for 15 min. Then the *A. thaliana* plants were regularly watered using four kinds of waters (deionized water, plasma-activated deionized water, tap water and plasma-activated tap water) during their growth until their final stage, reached after 42 days. It is noteworthy that only plasma-activated tap water had a significant effect on the plant growth while the use of plasma-activated deionized water give similar results as the control cases watered either using deionized water or tap water (data not shown). Then, various plant parameters such leaf number, rosette diameter, leaf area, and total number of flowering plants were quantified (Fig 7C–7F). All the measured parameters are significantly increased when using plasma-activated tap water.

Regarding the diameter of the rosette, a significant increase was observed when using the plasma activated-water (Fig 7C). At 21 days, there was an increase of 0.83 cm; at 28 days the increase was about of 1.28 cm; finally at 35 days, the average diameter of the plants watered with plasma-activated tap was still about a 1 cm larger than the controls.

Regarding the number of leaves, a significant effect was observed at 21 days after sowing, with an average increase of the treated plants compared with the control of about one leaf per plant (Fig 7D). There is also a positive effect of plasma-activated water at 28 days.

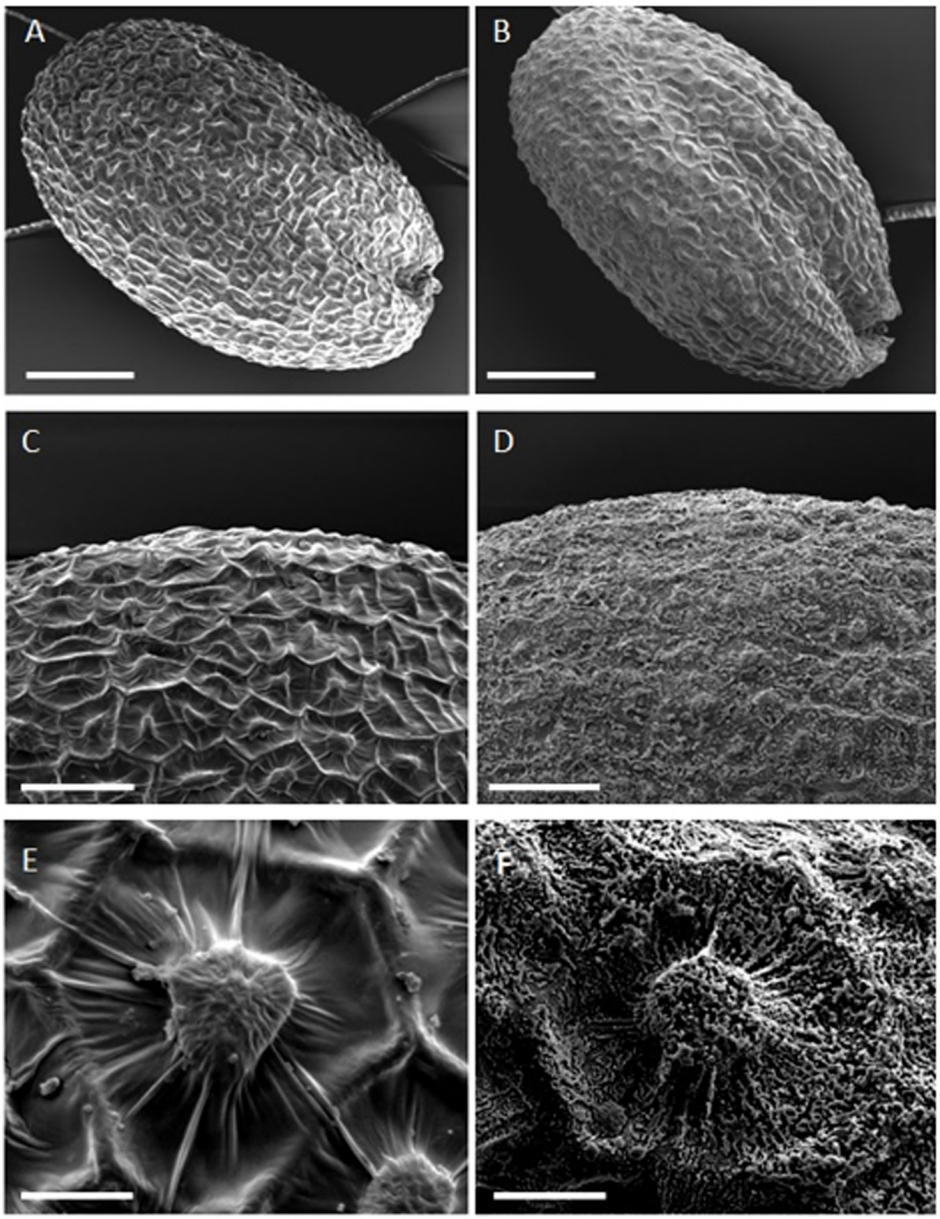


Fig 6. Scanning electron microscopy (SEM) images of *A. thaliana* seeds. (A, C, E) are the control while (B, D, F) are the air plasma treated. Scale bars: 100 μm A, B; 50 μm C, D; 10 μm E, F.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195512.g006

Furthermore regarding the leaf area, there was a significant increase visible at the first three observation times (Fig 7E). At the first time (21 days), there was an increase of about 200 mm^2. At the second time (28 days) the increase was equal to about 400 mm^2 while at the third observation time (35 days) the increase reached about 750 mm^2.

The development of the inflorescence stem showed that there were more plants with flowers at all development stages when the plasma-activated tap water was used for the watering (Fig 7F). We also noted that all the plants had flowered by 35 days when using plasma-activated tap water while it was not the case of the plants watered with the tap water.

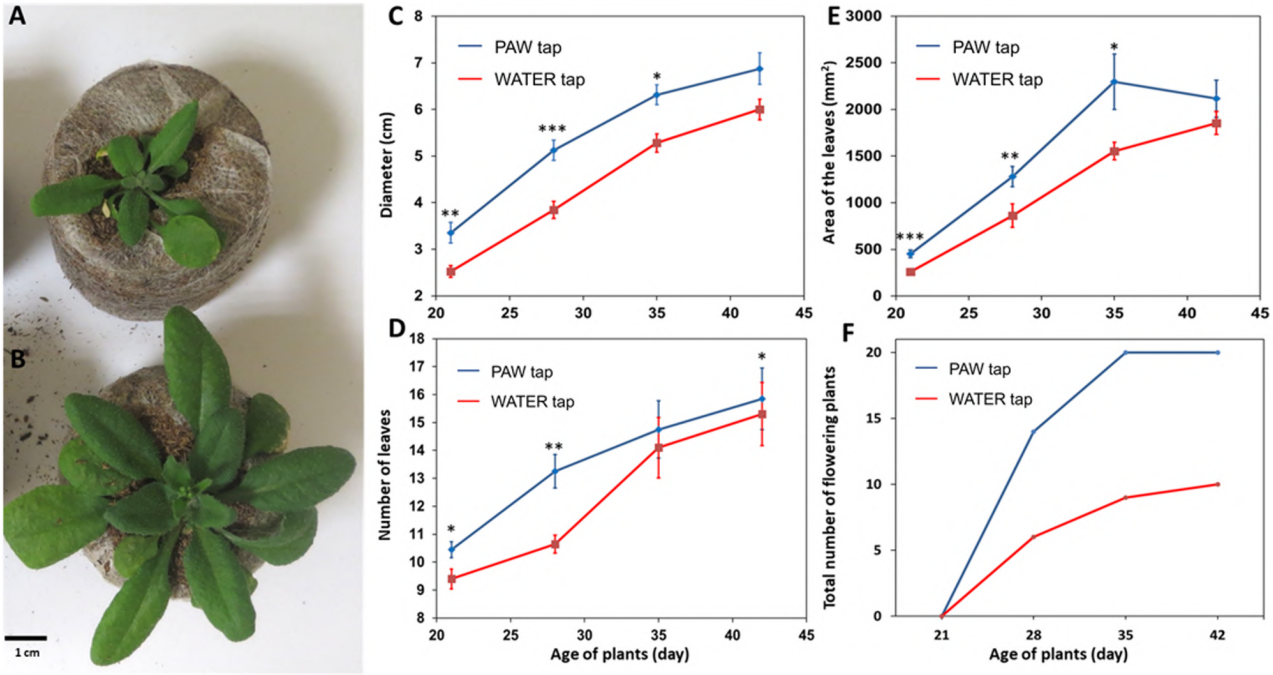


Fig 7. Effects of plasma-activated tap water (PAW_{tap}) on *A. thaliana* growth. Photos after 28 days of development watered by tap water (A) and PAW_{tap} (B). Diameter of the rosette (C); *A. thaliana* seedling leaf number (D); area of the leaves (E), and total number of flowering plants (F). Wilcoxon test was used to test the significance between the means with p-value indicated as: · < 0.1; *<0.05; **<0.005; ***<0.002 (For data see S1 Fig).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195512.g007

For a better understanding of the plant growth stimulation by plasma activated water, some chemical characteristics of the tested waters were analyzed (Table 1). As expected, hydrogen peroxide was undetectable in the non-activated waters ($Water_{tap}$ or H_2O_d) while significant concentrations of hydrogen peroxide were detected in plasma-activated waters (Table 1).

The nitrate ion concentration was estimated by using an assay based on the reaction between the nitrate ion and the aromatic ring of 1-phenol-2,4-disulfonic acid. As expected, the concentration of nitrate ions was significantly increased (3 times bigger) in the tap water when it was activated by the plasma while it is negligible in deionized waters (activated or not).

The increase of the electrical conductivity when the water (deionized or tap) is activated by the low temperature plasma was consistent with results in the literature [36]. The plasma activation of the water also changed acidity. The presence of a larger concentration of these reactive nitrogen ions in the plasma-activated tap water could partly explain the faster development of the plant when it is watered with this plasma-activated water.

Table 1. Physico-chemical parameters of waters. Electric and chemical parameters of deionized water (H_2Od), tap water ($Water_{tap}$) and plasma-activated deionized water (PAW_{H_2Od}) and tap water (PAW_{tap}). The conductivity is expressed in relative value differences: Δσ/σ. The measurements of concentrations, pH and conductivity are made 3 times independently.

Water	H_2O_2 concentration ($mg.L^{-1}$)	NO_3^- concentration ($mg.L^{-1}$)	Variation of electrical conductivity Δσ/σ	pH
H_2Od	0	0	Δσ H_2O_2d	7.41 ± 0.13
PAW_{H_2Od}	17.0 ± 0.1	0	20 x σ H_2O_2d	7.07 ± 0.04
$Water_{tap}$	0	5 ± 2	σ $Water_{tap}$	8.02 ± 0.25
PAW_{tap}	25.5 ± 0.1	15 ± 2	2 x σ $Water_{tap}$	7.62 ± 0.13

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195512.t001

Discussion

The significant increase of germination rate of *A*. *thaliana* seeds observed after plasma air treatment is due neither to a modification of the mucilage release nor to a global change of production of reactive oxygen species. However, the early reactive oxygen species production was certainly favoured in the case of plasma treated seeds. Indeed, exogenous addition of reactive oxygen species largely speed up the first steps of germination [28] as observed with plasma treated seeds. On the other hand, major modification of the seed surface and a reduction of testa permeability were observed. This appeared contradictory to a previous study which showed an increase of water uptake for pea seed treated with plasma [34]. This discrepancy might be related to the difficulty of performing water uptake with *A*. *thaliana* seeds, which have the capacity to extrude a mucilage layer in presence of water and which are much smaller than pea seeds.

SEM has shown new and lumpy structures on the seed surface after plasma treatment. This needs to be further analysed to better understand the mechanisms of germination stimulation induced by low temperature plasmas. Independently of these structural changes, we cannot exclude the formation of new functional groups which could stimulate the seed germination [37].

Regarding the effect of the plasma activated water on the plant growth, both conductivity and hydrogen peroxide levels were increased in the two kind of plasma activated waters (tap and deionised waters). Furthermore, we observed a clear increase of nitrate concentration in the plasma activated tap water. Nevertheless, among the four considered waters only plasma activated tap water had a significant effect on the plant development. This certainly means that some long-lived aqueous reactive nitrogen species as nitrate ions are responsible of the observed efficient growth of the plants.

Supporting information

S1 Fig. Page 1 (Data for Fig 2): Percentages of testa rupture versus the different kinds of treatment: deonized water (H2Od), plasma activated deonized water (PAW H2Od), tap water, plasma-activated tap water (PAWtap), helium flow (He), Plasma Helium, ambiant air and Plasma air. Page 2 (Data for Fig 3): A. Percentages of testa rupture for control (C) and plasma (P) versus different days after treatment: 0 day (t0), 2days (t2), 7 days (t7) and 9 days (t9) and 24h after imbibition. B. Percentages of testa rupture for control (C) and plasma (P) versus different days after treatment: 0 day (t0), 2days (t2), 7 days (t7) and 9 days (t9) and 40h after imbibition. C. Percentages of endosperm rupture for control (C) and plasma (P) versus different days after treatment: 0 day (t0), 2days (t2), 7 days (t7) and 9 days (t9) and 40h after imbibition. Page 3 (Data for Fig 5): Absorbance for water, control and plasma treatment: 5 successive tests and their average. Page 4 (Data for Fig 7): C. Diameter of the rosette versus age using tap water and plasma-activated tap water. D. Number of leaves versus age using tap water and plasma-activated tap water. E. Area of the leaves versus age using tap water and plasma-activated tap water. F. Total number of flowering plants versus age using tap water and plasma-activated tap water.
(XLSX)

Author Contributions

Conceptualization: Christophe Dunand, Mohammed Yousfi.

Data curation: Maxime Bafoil.

Formal analysis: Maxime Bafoil, Achraf Jemmat, Nofel Merbahi, Christophe Dunand, Mohammed Yousfi.

Funding acquisition: Christophe Dunand, Mohammed Yousfi.

Investigation: Maxime Bafoil, Achraf Jemmat, Nofel Merbahi, Olivier Eichwald, Christophe Dunand, Mohammed Yousfi.

Methodology: Maxime Bafoil, Nofel Merbahi, Olivier Eichwald, Christophe Dunand, Mohammed Yousfi.

Project administration: Christophe Dunand, Mohammed Yousfi.

Resources: Christophe Dunand, Mohammed Yousfi.

Supervision: Christophe Dunand, Mohammed Yousfi.

Validation: Maxime Bafoil, Christophe Dunand, Mohammed Yousfi.

Visualization: Achraf Jemmat, Yves Martinez.

Writing – original draft: Maxime Bafoil, Nofel Merbahi, Olivier Eichwald, Christophe Dunand, Mohammed Yousfi.

Writing – review & editing: Christophe Dunand, Mohammed Yousfi.

References

1. Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A. Applied plasma medicine. Plasma Processes and Polymers. 2008; 5(6):503–33. https://doi.org/10.1002/ppap.200700154
2. Heinlin J, Morfill G, Landthaler M, Stolz W, Isbary G, Z J.L., et al. Plasma medicine: possible applications in dermatology. Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. 2010; 8(12):968–76. https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2010.07495.x PMID: 20718902
3. Plewa JM, Yousfi M, Frongia C, Eichwald O, Ducommun B, Merbahi N, et al. Low-temperature plasma-induced antiproliferative effects on multi-cellular tumor spheroids. New Journal of Physics. 2014; 16. https://doi.org/10.1088/1367-2630/16/4/043027
4. Laroussi M. Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: Review, analysis, and prospects. Ieee Transactions on Plasma Science. 2002; 30(4):1409–15. https://doi.org/10.1109/tps.2002.804220
5. Villeger S, Sarrette J, Ricard A. Synergy between N and O atom action and substrate surface temperature in a sterilization process using a flowing N2-O2 microwave post discharge. Plasma Processes and Polymers. 2005; 2(9):709–14. https://doi.org/10.1002/ppap.200500040
6. Abramzon N, Joaquin JC, Bray J, Brelles-Marino G. Biofilm destruction by RF high-pressure cold plasma jet. Transactions on Plasma Science. 2006; 34(4):1304–9. https://doi.org/10.1109/tps.2006.877515
7. Marchal F, Robert H, Merbahi N, Fontagne-Faucher C, Yousfi M, Romain CE, et al. Inactivation of Gram-positive biofilms by low-temperature plasma jet at atmospheric pressure. Journal of Physics D-Applied Physics. 2012; 45(34). https://doi.org/10.1088/0022-3727/45/34/345202
8. Sardella E, Detomaso L, Gristina R, Senesi GS, Agheli H, Sutherland DS, et al. Nano-structured cell-adhesive and cell-repulsive plasma-deposited coatings: Chemical and topographical effects on keratinocyte adhesion. Plasma Processes and Polymers. 2008; 5(6):540–51. https://doi.org/10.1002/ppap.200800005
9. Samouillan V, Merbahi N, Yousfi M, Gardou J, Delaunay F, Dandurand J, et al. Effect of low-temperature plasma jet on thermal stability and physical structure of type I collagen. Transactions on Plasma Science. 2012; 40(6):1688–95. https://doi.org/10.1109/tps.2012.2190303
10. Ogawa Y, Morikawa N, Ohkubo-Suzuki A, Miyoshi S, Arakawa H, Kita Y, et al. An epoch-making application of discharge plasma phenomenon to gene-transfer. Biotechnology and Bioengineering. 2005; 92(7):865–70. https://doi.org/10.1002/bit.20659 PMID: 16170826
11. Zerrouki A, Yousfi M, Rhallabi A, Motomura H, Jinno M. Monte Carlo poration model of cell membranes for application to plasma gene transfection. Plasma Processes and Polymers. 2016; 13(6):633–48. https://doi.org/10.1002/ppap.201500144

12. Krapivina SA, Filippov AK, Levitskaya TN, Bakhvalov A, Gas plasma treatment of plant seeds. US patent US5281315 A, 1994.
13. Dubinov AE, Lazarenko EM, Selemir VD. Effect of glow discharge air plasma on grain crops seed. Ieee Transactions on Plasma Science. 2000; 28(1):180–3. https://doi.org/10.1109/27.842898
14. Volin JC, Denes FD, Young RA, Park SMT. Modification of seed germination performance through cold plasma chemistry technology. Crop Science. 2000; 40:1706–1718. https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4061706x
15. Jiang JF, Lu YF, Li JG, Li L, He X, Shao HL, et al. Effect of seed treatment by cold plasma on the resistance of tomato to *Ralstonia solanacearum* (bacterial wilt). Plos One. 2014; 9(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097753 PMID: 24840508
16. Dubinov AE, Kozhayeva JP, and Zuimatch EA, Changing Germination Rate of Brown Mustard Seeds After Treatment With Plasmas of Nanosecond Electric Discharges, IEEE Trans. On Plasma Science, 2017; 45(294)
17. Puac N, Zivkovic S, Selakovic N, Milutinovic M, Boljevic J, Malovic G, et al. Long and short term effects of plasma treatment on meristematic plant cells. Applied Physics Letters. 2014; 104(21). https://doi.org/10.1063/1.4880360
18. Jemmat A, Dunand C, Yousfi M, Sarrette J, Wattieaux G, Merbahi N, et al. Effects of three low temperature plasmas on early events of Arabidopsis thaliana germination. ICPIG XXXII; Iasi RomaniaJuly 2015.
19. Yousfi M, Eichwald O, Merbahi N, Jomaa N. Analysis of ionization wave dynamics in low-temperature plasma jets from fluid modeling supported by experimental investigations. Plasma Sources Science & Technology. 2012; 21(4). https://doi.org/10.1088/0963-0252/21/4/045003
20. Yousfi M, Merbahi N, Pathak A, Eichwald O. Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: toward new pharmaceutical treatments in medicine. Fundamental & Clinical Pharmacology. 2014; 28 (2):123–35. https://doi.org/10.1111/fcp.12018 PMID: 23432667
21. Dekkers BJW, Pearce S, van Bolderen-Veldkamp RP, Marshall A, Widera P, Gilbert J, et al. Transcriptional dynamics of two seed compartments with opposing roles in *Arabidopsis* seed germination. Plant Physiology. 2013; 163(1):205–15. https://doi.org/10.1104/pp.113.223511 PMID: 23858430
22. Mittler R. ROS are good. Trends in Plant Science. 2017; 22(1):11–9. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002 PMID: 27666517
23. Choudhury S, Panda P, Sahoo L, Panda SK. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. http://dx.doi.org/10.4161/psb.23681. 2013; 8(4). PMID: 23425848
24. Leymarie J, Vitkauskaite G, Hoang HH, Gendreau E, Chazoule V, Meimoun P, et al. Role of reactive oxygen species in the regulation of *Arabidopsis* seed dormancy. Plant and Cell Physiology. 2012; 53 (1):96–106. https://doi.org/10.1093/pcp/pcr129 PMID: 21937678
25. Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H, Corbineau F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. Comptes Rendus Biologies. 2008; 331 (10):806–14. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.07.022 PMID: 18926495
26. Muller K, Tintelnot S, Leubner-Metzger G. Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: Abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology. 2006; 47(7):864–77. https://doi.org/10.1093/pcp/pcj059 PMID: 16705010
27. Passardi F, Penel C, Dunand C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. Trends Plant Sci. 2004; 9(11):534–40. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.09.002 PMID: 15501178.
28. Lariguet P, Ranocha P, De Meyer M, Barbier O, Penel C, Dunand C. Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in *Arabidopsis*. Planta. 2013; 238 (2):381–95. https://doi.org/10.1007/s00425-013-1901-5 PMID: 23716184
29. Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW, The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. Mol Reprod Dev. 2015; 82(7–8):518–29. https://doi.org/10.1002/mrd.22489 PMID: 26153368
30. Kumar D., Yusuf M. A., Singh P., Sardar M. and Sarin N. B. (2014). Histochemical Detection of Superoxide and H2O2 Accumulation in *Brassica juncea* Seedlings. Bio-protocol 4(8): e1108. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1108
31. Vishwanath SJ, Kosma DK, Pulsifer IP, Scandola S, Pascal S, Joubes J, et al. Suberin-associated fatty alcohols in *Arabidopsis*: distributions in roots and contributions to seed coat barrier properties. Plant Physiology. 2013; 163(3):1118–32. https://doi.org/10.1104/pp.113.224410 PMID: 24019425
32. De Giorgi J. PLOS Genetics: An endosperm-associated cuticle is required for Arabidopsis seed viability, dormancy and early control of germination. Plos Genetics. 2015. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005708 PMID: 26681322

33. Molina I, Ohlrogge JB, Pollard M. Deposition and localization of lipid polyester in developing seeds of *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 2008; 53(3):437–49. Epub 2008/01/04. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03348.x PMID: 18179651.

34. Stolarik T, Henselova M, Martinka M, Novak O, Zahoranova A, Cernak M. Effect of low-temperature plasma on the structure of seeds, growth and metabolism of endogenous phytohormones in pea (*Pisum sativum* L.). Plasma Chemistry and Plasma Processing. 2015; 35(4):659–76. https://doi.org/10.1007/s11090-015-9627-8

35. Dhayal M, Lee SY, Park SU. Using low-pressure plasma for *Carthamus tinctorium* L. seed surface modification. Vacuum. 2006; 80(5):499–506. https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2005.06.008

36. Sivachandiran L and Khacef A. Enhanced seed germination and plant growth by atmospheric pressure cold air plasma: combined effect of seed and water treatment. RSC Adv. 2017; 7:1822–32. https://doi.org/10.1039/C6RA24762H

37. Mildaziene V, Pauzaite G, Malakauskiene A, Zukiene R, Nauciene Z, Filatova I, et al. Response of perennial woody plants to seed treatment by electromagnetic field and low-temperature plasma. Bioelectromagnetics. 2016. Epub 2016/08/30. https://doi.org/10.1002/bem.22003 PMID: 27574980.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Received: 7 February 2019
Accepted: 28 May 2019
Published online: 17 June 2019

New insights of low-temperature plasma effects on germination of three genotypes of *Arabidopsis thaliana* seeds under osmotic and saline stresses

Maxime Bafoil[1,2], Aurélie Le Ru[3], Nofel Merbahi[1], Olivier Eichwald[1], Christophe Dunand[2] & Mohammed Yousfi[1]

In order to investigate the effects of low temperature plasmas on germination of *Arabidopsis thaliana* seeds, a dielectric barrier discharge device generating the plasma in ambient air was used. To highlight the different plasma effects on the seed surface, saline and osmotic stresses were considered in the case of reference Col-0 seeds and two further seed coat mutants *gl2* and *gpat5* to better analyse the seed surface changes and their consequences on germination. The *GL2* gene encode a transcription factor controlling the balance between the biosynthesis of fatty acids in the embryo and the production of mucilage and flavonoid pigments in the seed coat. The *GPAT5* gene encode for an acyltransferase necessary for the accumulation of suberin in the seed coat which is essential for the embryo protection. The testa and endosperm ruptures are identified to note the germination stage. An increasing of germination rate, possibly due to the modification of mantle layers structure, is observed in most of cases, even in presence of saline or osmotic stress, after plasma treatment. Furthermore, we demonstrated that the germination rate of the *gl2* mutant seeds is increased by at most 47% after plasma treatment, contrariwise, the germination of *gpat5* mutant being initially lower is inhibited by the same plasma treatment. The scanning electron microscopy pictures and confocal microscopy fluorescence both showed changes of the exterior aspects of the seeds after plasma treatment. Considering these results, we assumed that lipid compounds can be found on the surface. To validate this hypothesis, permeability tests were performed, and it was clearly shown that a permeability decrease is induced by the low temperature plasma treatment.

Germination is a vital process in plant development. It gathers events that result from the water absorption by the quiescent dry seed and end with the lengthening of the embryonic axis[1]. In order to carry out this essential and crucial step, the environmental conditions of the seeds must be favourable at a given moment and for a sufficient period[2].

Overall, conditions are reaching their optimum only over a short period of time; the acceleration of the germination rate is a major asset for the survival of a species. The seeds are often treated by many phytosanitary products before sowing[3]. The use of such chemical products has major impacts on both the environment and the human health. For the purpose of reduction of pesticide use, researchers are trying to develop multiple ways to find substitute to these chemicals.

In order to find other substitute methods based more particularly on the use of the low temperature plasmas, the collaboration between plant biology and plasma physics aims to find alternative solutions to increase the germination rate while preserving both the environment and the seed quality.

[1]LAPLACE, UMR CNRS 5213, Université Paul Sabatier, Toulouse, France. [2]LRSV, UMR CNRS 5546, Université Paul Sabatier, Castanet-Tolosan, France. [3]Fédération de Recherche 3450, Plateforme Imagerie, Pôle de Biotechnologie Végétale, Castanet-Tolosan, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.D. (email: dunand@lrsv.ups-tlse.fr) or M.Y. (email: yousfi@laplace.univ-tlse.fr)

Low temperature plasmas can be produced by several kinds of electric discharges using different background gas compositions and pressure and electric or electromagnetic power supplies[4]. The resulting weakly ionized gas, composed by low densities of energetic electrons with dissociated, excited and ionized species, is called non-thermal plasmas since there is a strong thermal non-equilibrium between the different species. It is also called low temperature plasmas because the mean plasma temperature generally does not exceed the body temperature (about 37 °C) thus allowing the treatment of living cells without any significant thermal effects.

In fact, the low temperature plasmas are a good candidate in the plant biology field because they firstly showed their efficiency in many biological applications[5]. For many years, the antibacterial properties of low temperature plasma have been used for the sterilization of medical equipment and the decontamination of surfaces[6,7]. Low temperature plasmas are also known for their healing properties[8,9] or for the induced changes of biological surface properties[10,11]. Low temperature plasmas also contribute to tumour cell reduction[12] and even can partially permeabilize cell membranes for gene transfection applications[13].

In the field of plasma agriculture, previous studies have shown that the germination rate of various seeds of agronomic interest such as tomato, mustard, soybean…[14–17] can be stimulated by the low temperature plasmas. However, only few studies have investigated the mechanisms responsible for the improvement of the seed germination rate and the plant growth after the plasma treatment[18]. Further research studies are therefore needed in order to better explain the processes involved in seed germination and development.

In the present work, the model plant *Arabidopsis thaliana* was chosen because its growth conditions and its short life cycle are favourable to laboratory experiments[19]. Moreover, this plant does not have economic interest, which allows the diffusion and the exchange of results in the scientific community without confidentiality problem. In addition, the results obtained could be easily transferred to close related plants with agronomical interest.

The seed is composed of several external layers, aiming to protect the embryo. The outermost layer is also called the testa and it protects the endosperm. The rupture of all these peripheral layers which occurs sequentially, allows the seed to initiate its first stage of growth: the germination[20].

In a previous work[21], it was more particularly shown the good efficiency of the low temperature plasmas on the increase of the germination rate of the *A. thaliana* ecotype Col-0. In order to better understand the effects of the low temperature plasma on early germination steps and also on the seed surface modification, we considered in the present work, two further mutants of *A. thaliana* (*gpat5* and *gl2*). The *GL2* (*AT1G79840*) gene encodes for a transcription factor, which control the morphological development of trichomes but also the normal development of the seed coat and mucilage[22]. The seeds of the *gl2* mutant have an altered layer mantle, a reduced mucilage release and a lower germination rate[23]. The GPAT5 (AT3G11430) protein is an acyltransferase necessary for the proper production of fatty acids[24,25]. The *gpat5* mutants are affected in the synthesis of suberin and cutin, which means that seeds of the mutant cannot produce any cuticle that is part of the seed coat which protect the embryo[26]. Interestingly, these two genes have been found to be expressed in the seed outer cell layer during seed formation (Supplementary Fig. S1; Supplementary Tables 1–2)[27].

In fact, many compounds as reactive oxygen species (ROS) are involved during the germination process[28–30]. ROS are constitutively produced in the plant during photosynthesis, photorespiration and respiration[31] and have a dose-dependent effect[32]. They are known to be produced in stress condition such as saline stress[33]. At a high concentration, the oxidizing power is important and deleterious for the regular plant development. But at lower concentrations, they could act as secondary messengers[16,34]. In order to maintain a non-deleterious level of ROS, plants possess a battery of proteins able to regulate the ROS homeostasis[35]. Among these proteins, class III peroxidases (CIII Prxs) can reduce or oxidize hydrogen peroxide to regulate its concentration[36]. In the literature, the hydrogen peroxide and the CIII Prxs activity were shown to be colocalized in the seed coat prior the rupture of these two protective layers[32,37]. Some CIII Prxs genes are expressed during the first germination steps (Supplementary Fig. S2), it is thinkable that the protein encoding genes may play a role in the rupture of those layers of the embryo and thereby improving the germination[37].

Saline stress has negative effects on germination due to ionic imbalances[38] and interference in the uptake of nutrients essential for the plant development[39]. This could be highlighted, in the presence of a strong concentration of NaCl, by large reduction of germination rate and germination speed of the seeds[40] (i.e. the treated seeds need less time to have a given germination rate than the control one). As NaCl has both saline and osmotic effects, osmotic stress alone can be tested with the use of Polyethylene Glycol (PEG). It was found to have a comparable effect to heavy metals and interferes with the water transport within plants[41]. The consequence is the necrosis of adult plant. If the seed is treated with PEG during germination a variable reduction and delay in the process will be observed[42].

Therefore, in the following we will analyze the effects of the low temperature plasma generated in ambient air using a floating electrode dielectric barrier discharge (FE-DBD) setup on the seed germination and surface under saline and osmotic stresses in the case of three *A. thaliana* genotypes seeds (Col-0, *gl2* and *gpat5* mutants). Col-0 is the wild type seed, it carries the functional genes *GL2* and *GPAT5*.

Results

Effects of plasma treatments under saline and osmotic stresses. In the context of global climate change, the effect of low temperature plasma on seeds germination under salt or osmotic stresses is very interesting to analyze. For the seeds treatment we used the low temperature plasma DBD device displayed in Fig. 1 and described in material and method section. First of all, in standard growth conditions without any specific stress, the low temperature plasma treatment increases the speed of testa and endosperm ruptures of the ecotype Col-0 of *A. thaliana* (Fig. 2A). However, the rate of germination was not affected. Indeed, after 64 hours of imbibition, the control curve catches up the plasma treated curve in the case of the testa rupture (TR) when the maximum of ruptures is reached (between 95 and 100%).

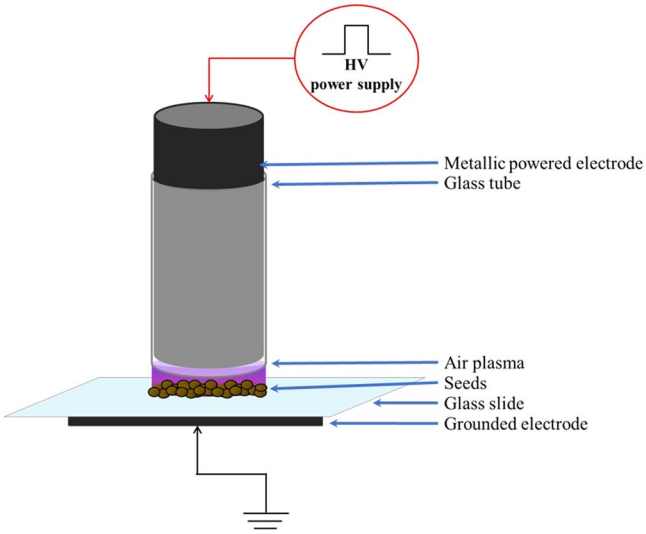


Figure 1. Scheme of the plasma device of dielectric barrier discharges (DBD) in ambient air. Interior glass tube diameter: 8 mm; glass slide thickness: 1 mm; metallic powered electrode diameter: ~8 mm.

In addition, our previous studies have shown an effect of the low temperature plasma on the seed surface of the genotype Col-0[21]. It is therefore of interest to determine if these differences are still observable on the two other considered genotypes. As already underlined, the mutants *gl2* and *gpat5* have been chosen because they have abnormal seed coat layers. The germination of the two different mutants of *A. thaliana* was analyzed and compared with Col-0 (Fig. 2). The germination rate and speed of *gl2* and *gpat5* seeds are considerably reduced compared to that of Col-0. After 64 h, it is reduced from 95% for Col-0 down to 50% for *gl2* and *gpat5 seeds*. Despite this, the plasma treatment increases the germination for the *gl2* seeds (Fig. 2D) but prevents the germination of the *gpat5* seeds by inhibiting the testa rupture (Fig. 2G).

In saline stress growth condition, the plasma stimulation of the seed germination was always observable since the plasma treated seeds have a better germination rate than the control seeds for Col-0 and *gl2* (Fig. 2B,C,E,F). However, the germination rate of the plasma treated seeds is lower than the non-stressed case and decreases with the increasing concentration of NaCl (from 0 to 50 mM). It is noteworthy that germination is totally inhibited from 100 mM NaCl (data not shown). Therefore, the low temperature plasma treatment partially restores the germination rate that decreased under saline stress condition. 64 h after sowing with 25 mM NaCl, the plasma treated seeds reach a rate of 78% of TR whereas the non-treated seeds are only at 29% of TR for *gl2* seeds (Fig. 2E).

The bar charts display the plasma effects on the percentage of the testa rupture compared to the control seeds (Fig. 2J–L). As we can see, the negative effect (i.e. inhibition of TR) of the plasma on the testa rupture of *gpat5* mutant seeds is constant. Moreover, the positive effect on Col-0 seeds (i.e. increase of TR proportion) becomes lower with the augmentation of the salt concentration. Then, we must note that the positive effect of the plasma is more important for the *gl2* mutant seeds but that this effect decreases over time since the non-treated seeds catch up the delay.

In order to separate the effects of osmotic and saline stresses, *A. thaliana* seeds were germinated in presence of various PEG 6000 percentages. Increasing the percentage of PEG has a detrimental impact on the germination rate (Fig. 3). With 15% PEG, both control and plasma treated seeds did not germinate (data not shown). As observed in the case of NaCl stress, the treatment of seeds with plasma partially restores the germination rate for the seed grown on 5% PEG for Col-0 and *gl2* seeds (Fig. 3C,F). Using the literature, an equivalent osmotic pressure expressed in bar could be calculated[43,44] (Supplementary Fig. S2), thus showing that 25 mM of NaCl is equivalent to 10% of PEG. But, the germination at 25 mM of NaCl is higher than the germination observed with 10% of PEG. Then, at equal osmotic pressure the PEG has more inhibitory effect than the NaCl. In parallel, the positive effect of plasma treatment seems to be lower in the case of seeds germinated in presence of PEG (Figs 2, 3).

Modification of seeds surface. Scanning electron microscopy (SEM) pictures show the appearance of particular structure on the treated seed surface (Fig. 4A). There is no significant difference between the ecotype Col-0, and the two mutants *gl2* and *gpat5* for control seeds (Fig. $4A_2$,B_4,B_5,B_6). In parallel, Auramine-O staining, allows to visualize by fluorescence the hydrophobic compounds such as lignin which is one of the structural compounds of the seed[45,46]. The contours of the cells and the columella are visible on all shots. In the case of the pictures obtained for plasma treated seeds, surface modifications are observed (Fig. $4A_1$,B_1,B_2,B_3). On the reference ecotype Col-0, the fluorescent signal is decreased, the contours of the cells and columella are very sparsely visible in the case of the treated seeds. For the seeds of *gl2 m*utants, there is a very strong loss of the fluorescent signal; nevertheless, the walls and columella remain recognizable. For the *gpat5* mutant, we observe a lower signal loss and even an increase of the red fluorescence on the columella when compared with the treated Col-0 seeds. This loss of signal could be explained by the modification of the seed surface as for instance a rearrangement of the lipidic compounds over the surface due to the plasma treatment.

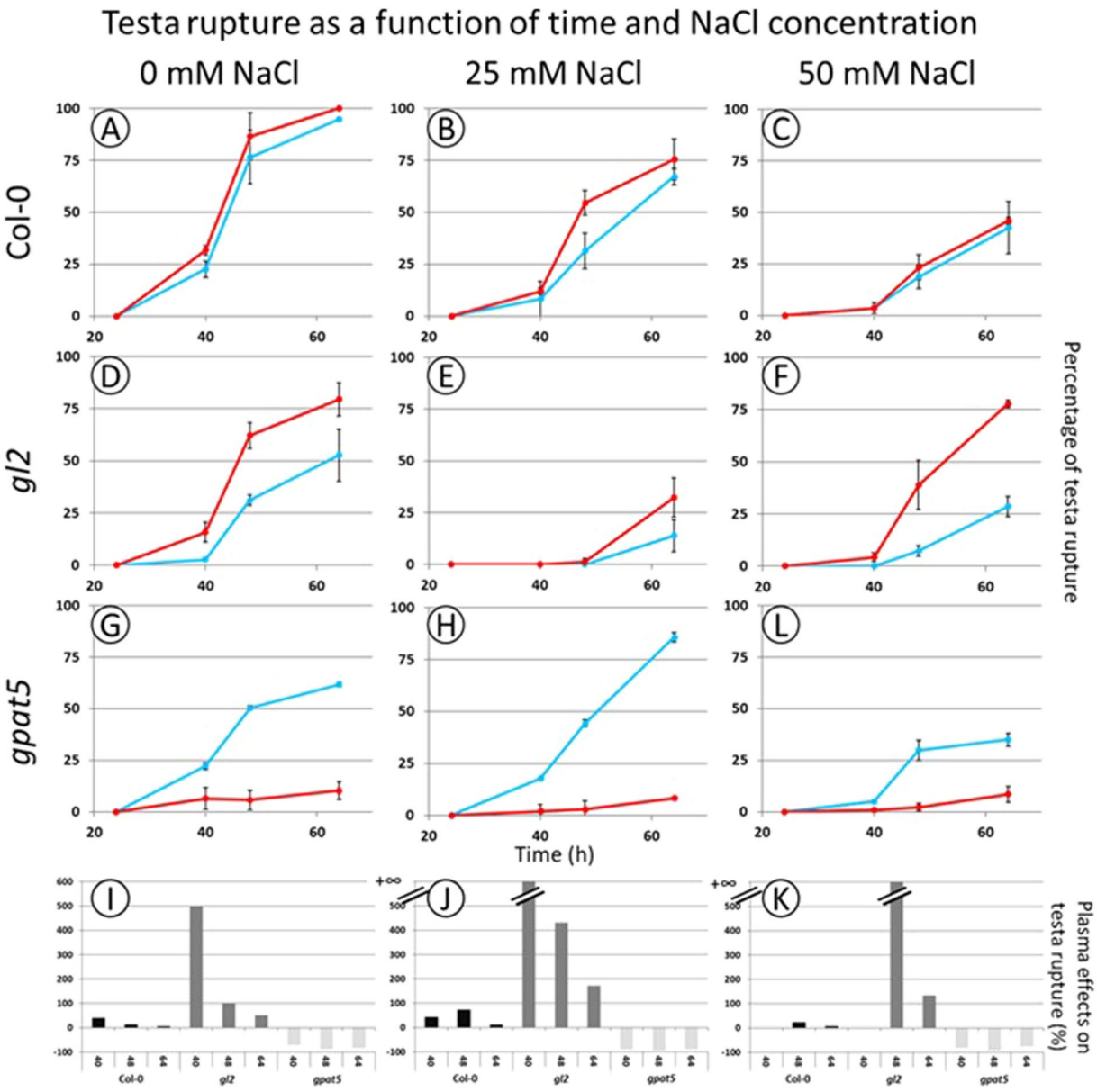


Figure 2. Plasma treatment has opposite effect on germination of *A. thaliana* Col-0, *gl2* and *gpat5* seeds under saline condition. This means that Col-0 and gl2 seeds showed a plasma stimulation of the germination rate while gpat5 showed the inverse effect (i.e. an inhibition of the germination). The testa rupture was evaluated as a function of time and different genotypes. The blue curves represent the control seeds and the red the plasma treated seeds. (**A**–**C**): Col-0; (**D**–**F**): *gl2*; (**G**–**I**): *gpat5*. 3 different germination conditions were tested: control without NaCl (**A**,**D**,**G**,**J**); 25 mM of NaCl (**B**,**E**,**H**,**K**); 50 mM of NaCl (**C**,**F**,**I**,**L**). Due to the lack of germination with NaCl concentration higher than 50 mM, the obtained percentage of testa rupture are not shown. The bar charts represent the plasma effect on the testa rupture compared to the control one (**J**–**L**).

In addition to the seed surface observation, the permeability of the seeds treated or not treated with the low temperature plasma was tested with tetrazolium red. When it passes through the plant cell wall, tetrazolium red is oxidized *via* dehydrogenases in the respiratory chain and turns red. Quantification of the red staining is proportional to the seed permeability. Such tests were carried out on *A. thaliana* seeds of the 3 different lines, Col-0 which is the reference ecotype, and the two considered mutants *gl2 and gpat5*. Regardless of the genotypes, the seed permeability decreases with the low temperature plasma treatment (Fig. 5). For Col-0, the absorbance is decreased by a factor 1/3 with a p-value of 0.02857. The decrease in permeability for *gl2* seeds is not significant enough even if a small reduction was observed. The absorbance of the seeds of *gpat5* was much higher in the control condition due to the absence of cuticle and was reduced by a half after plasma treatment (from 0.8 to 0.4), with a p-value of 0.01481 at Wilcoxon test.

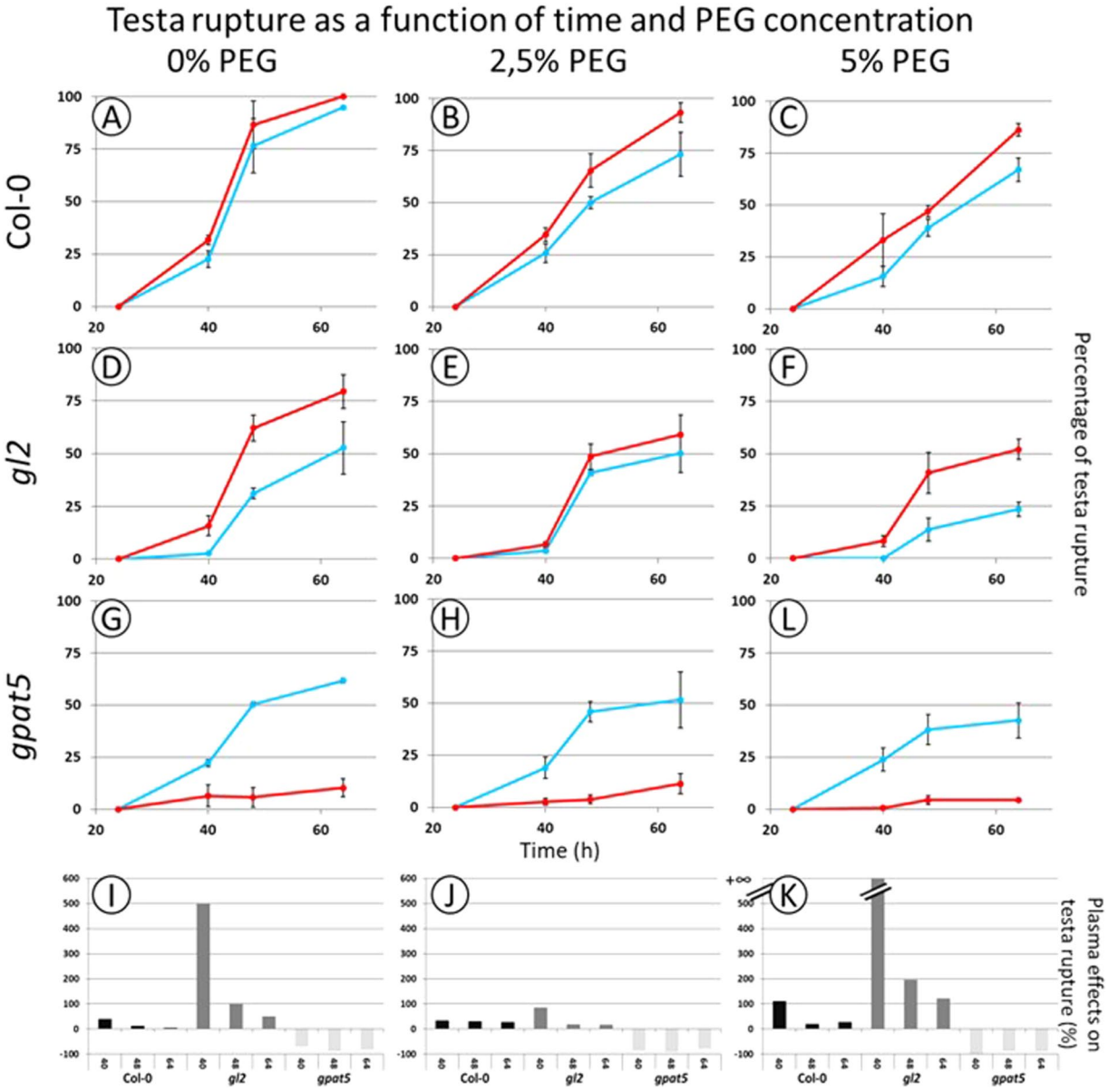


Figure 3. Plasma treatment has opposite effect on germination of *A. thaliana* Col-0, *gl2* and *gpat5* seeds under osmotic condition. This means that Col-0 and gl2 seeds showed a plasma stimulation of the germination rate while gpat5 showed the inverse effect (i.e. an inhibition of the germination). The testa rupture was evaluated as a function of time and different genotypes. The blue curves represent the control seeds and the red the plasma treated seeds. (**A**–**C**): Col-0; (**D**–**F**): *gl2*; (**G**–**I**): *gpat5*. 3 different germination conditions were tested: control without PEG (**A**,**D**,**G**,**J**); 2,5% of PEG (**B**,**E**,**H**,**K**); 5% of PEG (**C**,**F**,**I**,**L**). Due to the lack of germination with PEG content higher than 5%, the obtained percentage of testa rupture are not shown. The bar charts represent the plasma effect on the testa rupture compared to the control one (**J**–**L**).

Change of peroxidase activities. At least 23 CIII Prxs genes have been shown to be expressed during early germination steps (see Supplementary Fig. S2 and Supplementary Table S3 rebuilt in the present work from litterature data[47]). They were detected in both testa and endosperm tissues where the corresponding proteins could have major function to favor the rupture of the two seed envelops prior the radicle protrusion as previously demonstrated[30,48]. In this study, the whole peroxidases activity has been quantified and reported in Supplementary Fig. S2. We can see that the total peroxidases activity was increased in the case of plasma treated seeds.This is in agreement with recent studies demonstraiting the function of peroxidase in seed germination[30,48] that could explain a part of the plasma germination activation.

Discussion

This study highlights the partial neutralization by the plasma treatment of the adverse effects of the salt and osmotic stresses on seed germination.

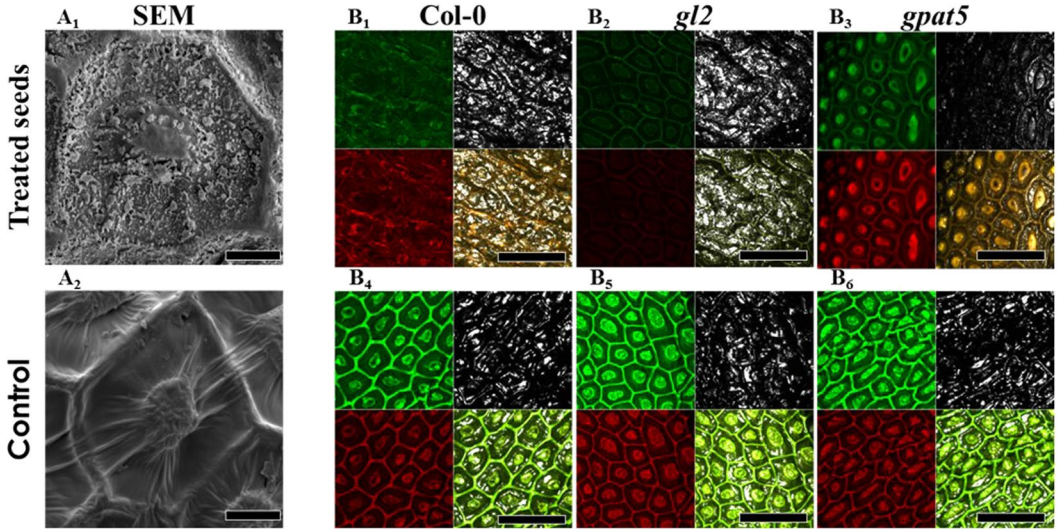


Figure 4. Low temperature plasma affects *A. thaliana* seeds surface. (**A**) Col-0 seed columella with or without plasma treatment observed with a scanning electron microscopy. Scale bar: 10 µm. (**B**) Confocal observation of seed from the three different *A. thaliana* genotypes with or without plasma treatment using lens 10X zoom x9. The seeds are previously stained with auramine-O. After excitation at 488 nm, seed surface was visualized by reflection at 484–494 nm (gray); by fluorescence at 505–560 nm (green), by fluorescence at 572–642 nm (red). The right bottom panel corresponds to the merged of the 3 detection. Scale bar: 100 µm.

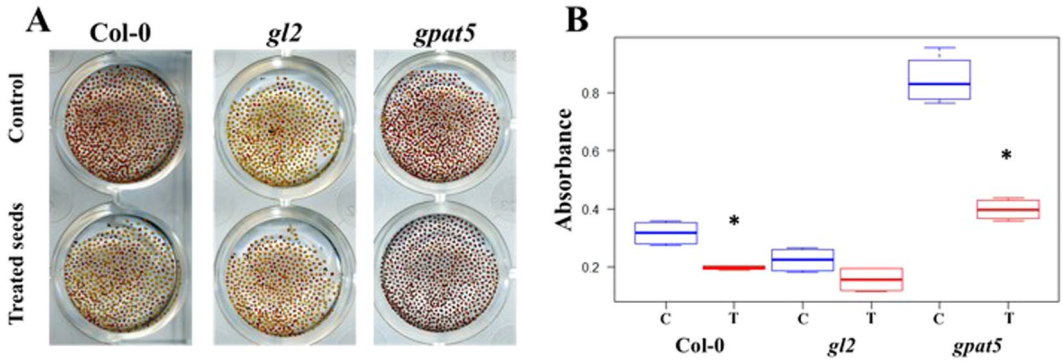


Figure 5. Low temperature plasma treatment modifies *A. thaliana* seed permeability. (**A**) Picture of the three Arabidopsis seed genotypes (Col-0, *gl2* and *gpat5*) treated or not with plasma. The seeds were incubated for 48 hours in tetrazolium red. (**B**) Boxplots of the absorbance of the grind seeds with tetrazolium versus the genotype and the treatment (T for plasma treatment and C for control). The blue boxplots display the control seeds and the red ones the plasma treated seeds. 3 batches of 100 µg seeds for each genotype and treatment were tested for permeability assays.

Depending on the considered seed genotype and mutants, a reduction and, in some cases, an inhibition of germination in saline conditions were observed. Saline stress has negative effects largely due to the ionic imbalances[38] and the interference in the absorption of water and essential nutrients for plant development[39,41]. In the presence of a high concentration of NaCl, the germination rate and speed strongly decrease. The seeds treated with low temperature plasma remain affected by the effects of salt stress; however, it appears that germination rate of treated seeds is still higher than the control one except for *gpat5* mutant. This means that the effect of plasma counteracts partially the negative effect of the saline stress.

If the seeds are germinated in presence of PEG, variable reduction and delay of the rate of germination are found[42]. Moreover, it has been shown that the PEG has a more negative effect than the NaCl on the germination. This could be explained by the ionic balance in the seed, the influx of NaCl will reduce the osmotic pressure but as the PEG cannot pass through the cell wall, the ionic balance remains too strong for proper water intake and then a correct seed germination[49,50]. This is in agreement with the results presented in this study. It is noted that the low temperature plasma reduces the effect of osmotic stress by allowing a better germination rate except as expected for *gpat5* mutant.

One of the hypotheses to explain the plasma-stimulated germination is an effect of limitation of exchanges with the direct environment of the seed after a plasma treatment. Indeed, it appears that the protective layers of

the embryo were altered by the plasma treatment reducing the seed permeability. The decrease of the permeability due to the low temperature plasma, observed in the three genotypes, could explain the reduction of the inhibitory effect of NaCl and PEG.

To confirm this hypothesis the mutants *gl2* and *gpat5* have been used. The *GL2* gene is a transcription factor that allows the normal development of the seed coat and mucilage[22]. The *gpat5* mutant presents a lack of cuticle in the seed coat[26]. Our results confirm that the germination rates of *gl2* and *gpat5* mutants were reduced compared to the ecotype Col-0[24]. For the *gl2* mutants the observations are similar to those done for Col-0 ecotype since the low temperature plasma increases the rate and the germination speed. This can be explained in part by the weakening of the outer layers. On the other hand, the *gpat5* mutant did not germinate after the plasma treatment. As this specific *gpat5* mutant is altered in its protective layers, the underlying assumption is that seeds are more sensitive to the plasma processing and the survival of the embryo is permanently impaired. For recall, the low temperature plasmas have generally a dose-dependent effect[12,13] since at low dose, which in this case corresponds to a shorter treatment time, this increases cell division and at high dose this inhibits it.

On the other hand, we investigated the possible effects of the low temperature plasma treatment on seed surface. The seed coat plays an important role during the germination step since it acts both as a physical protection but can also act as a constraint for the release of the radicle. As a result, any change of the outer layers can affect the seed germination. Scanning electron microscopy has clearly revealed a change on the seed surface after the plasma treatment. Thus, it appear that this surface modification can correspond to lipid compounds exuded from the seed following the plasma treatment. An increase of the germination rate and a change in the surface structure could be correlated[51].

In addition, the modification of the surface is also confirmed by the fluorescence observations. Regardless of the Col-0 ecotype, the seed surface is similar between the different seeds without plasma treatment. After the plasma treatment, a significant modification is observed on the seed surface of Col-0 and *gl2* since a disappearance of the fluorescent signal is noted. The observation of the seeds of the *gpat5* mutants shows that the plasma has a smaller effect compared to the two other genotypes. This can be explained by the cuticle deficiency of the *gpat5* mutant and can point out the formation of a neo-lipidic structure at the seed surface after the plasma treatment.

The modification of the seed surface observed in microscopy which can be due to the change of the lipidic structure, could explain the reduction of the permeability of the plasma treated seeds compared to the controls. Plasma treatment makes the seeds less permeable which could have a beneficial effect on the physical dormancy of the seed[52]. This effect is observed for the ecotype Col-0 and the mutant *gpat5*, however we have not observed significant permeability reduction for the *gl2* seeds. But the initial low germination rate of this mutant could explain the negative effect of the plasma treatment. Complexity of fatty acid composition of the seeds but also in the signalling pathways of mantle formation could explain this observation[53]. Moreover, since the permeability of the seeds of the mutants *gl2* is initially low, it seems to make it difficult to reduce the permeability of these seeds. It is interesting to observe the significant decrease in permeability for *gpat5* seeds. Indeed, it is half reduced after the low temperature plasma treatment which clearly indicates and underlines the plasma effect without any ambiguity. This is also related to the properties of *gpat5* mutant and allows to conclude that the effect of the plasma is not only due to the alteration of the cuticle since *gpat5* does not present a synthesis of this polymer.

Conclusion

In this study, the effects of low temperature plasmas on germination of *A. thaliana* seeds were thoroughly investigated. The low temperature plasma was generated in ambient air by a dielectric barrier discharge setup while the ecotype Col-0 and the two mutants *gl2* and *gpat5* were analyzed under osmotic and saline stresses to better understand the plasma effects on testa and endosperm ruptures during the early germination step.

It is highlighted that plasma treatment increased the germination speed and rate under the different stress conditions, which may be of great interest for agronomy. In fact, the increased germination rate of plasma-treated seeds grown in salt stress allows the investment of greater areas with saline soil. It is clearly underlined that the low temperature plasma treatment does not completely counteract the effects of stress, but it may, in some cases, compensate the germination delay. The plasma-induced changes of seed surfaces that were observed in scanning electron and confocal microscopies and the plasma–induced decrease of the seed permeability of the embryonic external layers suggests that the observed effects on seed germination are due to the changes of the seed layers. Nevertheless, the use of the ecotype Col-0 and of the two mutants *gl2* and *gpat5* illustrate the importance of the integrity of these layers. Indeed, the treatment of the mutant *gpat5* almost completely inhibits germination. This suggests that a prolonged plasma treatment or a treatment with more reactive and energetic plasma active species would have negative effects on germination.

Moreover, the present results propose that plasma treatment could affect both the changes in the structure and in the composition of lipid compounds of the seed surface prior germination and the seed metabolisms during early germination step.

Methods

Low temperature plasma device. Dielectric Barrier Discharge (DBD) is a device that generates low temperature plasma at atmospheric pressure between a cylindrical electrode covered with a dielectric and connected to the high voltage power supply and a grounded electrode also covered with a dielectric (Fig. 1) while ambient air is used as a background gas. Due to the possibility to use any surface as a grounded electrode, such plasma device is called floating electrode DBD (FE-DBD). The electrical parameters of the mono-polar pulsed power supply are set to 10 kV for the voltage, 10 kHz for the frequency and 1 μs for the pulse width while the rise and fall times of the voltage pulse are of about 80 ns. Further details on the plasma characteristics generated by this FE-DBD air plasma can be found elsewhere[4].

As displayed in Fig. 1, *A. thaliana* seeds are placed in the inter-electrode gap between the glass of powered and grounded electrodes directly in contact with the air low temperature plasma. The treatment time of the different seed genotypes is fixed at 15 min which is an optimal time already parameterized and chosen in previous works[21,48].

Plant material. Several genotypes were used, Col-0 (which is the wild type strain carrying functional *GPAT5* and *GL2* genes) and two mutant lines (*gpat5* and *gl2*)[54,55].

The seeds of *A. thaliana* are germinated on Whatman ™ paper circles (3MM Char Chromatography Paper, Medium thickness: 0.34 mm), which are placed in Petri dishes of 35 mm in diameter. The boxes are saddled with ANAPORE surgical plaster. *In vitro* culture conditions are considered: humidity 100%, box temperature 22 °C/20 °C, photoperiod 16 h/8 h. The paper is soaked with 0.5 mL of the following solutions: distilled water; NaCl (25 mM, 50 mM, 75 mM and 100 mM); PEG 6000 (5%, 10%, 15% and 20%) (Polyethylene glycol, BioUltra, Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Conduct of experiments. The *A. thaliana* seeds are treated during 15 min and placed in a Petri dish. The different seed observations are made 24 h, 40 h, 48 h and 64 h after imbibition. About 150 seeds per dish and 3 independent batches.

Seed germination. In order to quantify the seed germination, the rate of testa and endosperm ruptures as well as the number of cotyledons were noted using a binocular microscope. The resulting image processing is done on ImageJ version 1.46r[56]. The obtained results are entered on an Excel® table and statistically analyzed using the R studio software version 1.0.136 (cran.r-project.org). Student tests[57] as well as Wilcoxon tests[58] were carried out to detect the significance of the differences between the various seed analyses.

Seed surface. Pictures of the seed surface are made using a confocal monophoton microscope (Leica SP8). Observations are made using at least 20 seeds of the different genotypes treated or not. The optical characteristics are set as follows: excitation laser at 488 nm; reflection from 484 nm to 494 nm; auto fluorescence at 505–560 nm and 570–640 nm. The used lens is a 10×0.3 dry. The distance between the focal planes is fixed to 3 μm. The different seeds are prior stained with a fluorescent compound, Auramine-O at 0.003% in 70% ethanol (Sigma Aldrich). This compound allows to localize hydrophobic compounds such as the waxes and precursors of cutin as well as lipid compounds[59].

Seed permeability. Seed permeability tests are performed using triphenyltetrazolium chloride (tetrazolium red, Fisher) which has the property of being reduced to formazans becoming red, as they cross the plasma membrane. The control and plasma-treated seeds are incubated with 1% tetrazolium red solution for 40 h at 28 °C. They are rinsed with distilled water and grind by hand in 95% ethanol using pestles. The grind material is centrifuged at 3500 rpm during 3 min and the absorbance of the supernatant is measured at 492 nm. Each permeability assay was performed 3 times using 10 mg of seeds from 3 independent batches of seed treated or not with the low temperature plasma.

Analysis of gene expression data. Gene expression data, available from seed embryogenesis and germination kinetic, were extracted from two previous studies[27,47]. The extracted data were transformed to log2 values. The gene expression limit was set up at 5, under that threshold, the expression is considered as negligible. Subsequently, *GL2* or *GPAT5* for the embryogenesis set and Peroxidase 69 (*AT5G64100*) for the germination set were used as a bait to calculate the Pearson correlation coefficient (PCC). Then, the genes are sorted and ranked according to their decreasing PCC. This allows to extract the genes that have a similar spatio-temporal expression profile. From this ranking, all the first 50 genes are selected from the embryogenesis set and only the peroxidases encoding genes were selected from the germination set. The expression profiles of the different genes are highlighted by a heatmap: gray (expression data below the threshold of 5); from yellow[60] (minimum expression data above the threshold of 5) to red (maximum expression data).

References

1. Bewley, D. & Black, M. *Seeds*. Springer Science+Business Media New York, https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1002-8_1 (1994).
2. Wang, W., Vinocur, B. & Altman, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**, 1–14, https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5 (2003).
3. Ashraf, M. & Foolad, M. R. Pre-sowing seed treatment—A shotgun approach to improve germination growth and crop yield under saline and non-saline conditions. *Advanced Agronomy* **88**, 223–271, https://doi.org/10.1016/S0065-2113(05)88006-X (2005).
4. Yousfi, M., Merbahi, N., Pathak, A. & Eichwald, O. Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: toward new pharmaceutical treatments in medicine. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **28**, 123–135, https://doi.org/10.1111/fcp.12018 (2014).
5. Kyzek, S. *et al*. Cold atmospheric pressure plasma can induce adaptive response in pea seeds. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* **39**, 475–486, https://doi.org/10.1007/s11090-018-9951-x (2019).
6. Laroussi, M. Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: Review, analysis, and prospects. *Ieee Transactions on Plasma Science* **30**, 1409–1415, https://doi.org/10.1109/tps.2002.804220 (2002).
7. Villeger, S., Sarrette, J. & Ricard, A. Synergy between N and O atom action and substrate surface temperature in a sterilization process using a flowing N_2-O_2 microwave post discharge. *Plasma Processes and Polymers* **2**, 709–714, https://doi.org/10.1002/ppap.200500040 (2005).
8. Fridman, G. *et al*. Applied plasma medicine. *Plasma Processes and Polymers* **5**, 503–533, https://doi.org/10.1002/ppap.200700154 (2008).
9. Heinlin, J. *et al*. Plasma medicine: possible applications in dermatology. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* **8**, 968–976, https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2010.07495.x (2010).
10. Sardella, E. *et al*. Nano-structured cell-adhesive and cell-repulsive plasma-deposited coatings: Chemical and topographical effects on keratinocyte adhesion. *Plasma Processes and Polymers* **5**, 540–551, https://doi.org/10.1002/ppap.200800005 (2008).

11. Samouillan, V. *et al*. Effect of low-temperature plasma jet on thermal stability and physical structure of type I collagen. *Transactions on Plasma Science* **40**, 1688–1695, https://doi.org/10.1109/tps.2012.2190303 (2012).
12. Plewa, J. M. *et al*. Low-temperature plasma-induced antiproliferative effects on multi-cellular tumor spheroids. *New Journal of Physics* **16**, https://doi.org/10.1088/1367-2630/16/4/043027 (2014).
13. Zerrouki, A., Yousfi, M., Rhallabi, A., Motomura, H. & Jinno, M. Monte Carlo poration model of cell membranes for application to plasma gene transfection. *Plasma Processes and Polymers* **13**, 633–648, https://doi.org/10.1002/ppap.201500144 (2016).
14. Dubinov, A., Lazarenko, E. & Selemir, V. Effect of glow discharge air plasma on grain crops seed. *Transactions on Plasma Science* **28**, 180–183, https://doi.org/10.1109/27.842898 (2000).
15. Volin, J. C., Denes, F. S., Young, R. A. & Park, S. M. T. Modification of seed germination performance through cold plasma chemistry technology. *Crop Science* **40**, 1706–1718, https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4061706x (2000).
16. Jiafeng, J., Xin, H. & Ling, L. Effect of cold plasma treatment on seed germination and growth of wheat – IOPscience, https://doi.org/10.1088/1009-0630/16/1/12 (2014).
17. Dubinov, A., Kozhayeva, J. & Zuimatch, E. Changing Germination Rate of Brown Mustard Seeds After Treatment With Plasmas of Nanosecond Electric Discharges. *Ieee Transactions on Plasma Science* **45**, 294–300, https://doi.org/10.1109/TPS.2017.2649604 (2017).
18. Puac, N. *et al*. Long and short term effects of plasma treatment on meristematic plant cells. *Applied Physics Letters* **104**, https://doi.org/10.1063/1.4880360 (2014).
19. Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D. & Koornneef, M. Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis. *Science* **282**(662), 679–682, https://doi.org/10.1126/science.282.5389.662 (1998).
20. Baud, S. *et al*. WRINKLED1 specifies the regulatory action of LEAFY COTYLEDON2 towards fatty acid metabolism during seed maturation in Arabidopsis. *Plant J* **50**, 825–838, https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03092.x (2007).
21. Bafoil, M. *et al*. Effects of low temperature plasmas and plasma activated waters on Arabidopsis thaliana germination and growth. *PLoS One* **13**, e0195512, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195512 (2018).
22. Ohashi, Y., Oka, A., Ruberti, I., Morelli, G. & Aoyama, T. Entopically additive expression of GLABRA2 alters the frequency and spacing of trichome initiation. *Plant J* **29**, 359–369, https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01214.x (2002).
23. Wu, R. & Citovsky, V. Adaptor proteins GIR1 and GIR2. I. Interaction with the repressor GLABRA2 and regulation of root hair development. *Biochem Biophys Res Commun* **488**, 547–553, https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.084 (2017).
24. Beisson, F., Li, Y., Bonaventure, G., Pollard, M. & Ohlrogge, J. B. The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 351–368, https://doi.org/10.1105/tpc.106.048033 (2007).
25. Molina, I., Ohlrogge, J. B. & Pollard, M. Deposition and localization of lipid polyester in developing seeds of Brassica napus and Arabidopsis thaliana. *Plant J* **53**, 437–449, https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03348.x (2008).
26. Zheng, Z. *et al*. Arabidopsis AtGPAT1, a member of the membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase gene family, is essential for tapetum differentiation and male fertility. *Plant Cell* **15**, 1872–1887, https://doi.org/10.1105/tpc.012427 (2003).
27. Belmonte, M. F. *et al*. Comprehensive developmental profiles of gene activity in regions and subregions of the Arabidopsis seed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 435–444, https://doi.org/10.1073/pnas.1222061110 (2013).
28. Kranner, I., Roach, T., Beckett, R. P., Whitaker, C. & Minibayeva, F. V. Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in Pisum sativum. *Journal of Plant Physiology* **167**, 805–811, https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.01.019 (2010).
29. Arc, E., Galland, M., Godin, B., Cueff, G. & Rajjou, L. Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination. *Front Plant Sci* **4**, https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00346 (2013).
30. Lariguet, P. *et al*. Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in Arabidopsis. *Planta* **238**, 381–395, https://doi.org/10.1007/s00425-013-1901-5 (2013).
31. Ma, L. *et al*. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na(+)/K(+)homeostasis in Arabidopsis under salt stress. *J Exp Bot* **63**, 305–317, https://doi.org/10.1093/jxb/err280 (2012).
32. Leymarie, J. *et al*. Role of reactive oxygen species in the regulation of *Arabidopsis* seed dormancy. *Plant and Cell Physiology* **53**, 96–106, https://doi.org/10.1093/pcp/pcr129 (2012).
33. Baxter, A., Mittler, R. & Suzuki, N. ROS as key players in plant stress signalling. *J Exp Bot* **65**, 1229–1240, https://doi.org/10.1093/jxb/ert375 (2014).
34. Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L. & Panda, S. K. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. **8**, https://doi.org/10.4161/psb.23681 (2013).
35. Mittler, R. ROS Are Good. *Trends in Plant Science* **22**, 11–19, https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002 (2017).
36. Cosio, C. & Dunand, C. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany* **60**, 391–408, https://doi.org/10.1093/jxb/ern318 (2009).
37. Muller, K., Tintelnot, S. & Leubner-Metzger, G. Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: Abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **47**, 864–877, https://doi.org/10.1093/pcp/pcj059 (2006).
38. Saleki, R., Young, P. G. & Lefebvre, D. D. Mutants of Arabidopsis thaliana capable of germination under saline conditions. *Plant Physiol* **101**, 839–845, https://doi.org/10.1104/pp.101.3.839 (1993).
39. Pasternak, D. Salt tolerance and crop production-a comprehensive approach. **25**, 271–291, https://doi.org/10.1146/annurev.py.25.090187.001415 (1987).
40. Cheng, Y. S., Zheng, Y. & VanderGheynst, J. S. Rapid quantitative analysis of lipids using a colorimetric method in a microplate format. *Lipids* **46**, 95–103, https://doi.org/10.1007/s11745-010-3494-0 (2011).
41. Steuter, A. A., Mozafar, A. & Goodin, J. R. Water potential of aqueous polyethylene glycol. *Plant Physiol* **67**, 64–67, https://doi.org/10.1104/pp.67.1.64 (1981).
42. Penfield, S., Meissner, R. C., Shoue, D. A., Carpita, N. C. & Bevan, M. W. MYB61 is required for mucilage deposition and extrusion in the Arabidopsis seed coat. *Plant Cell* **13**, 2777–2791, https://doi.org/10.1105/tpc.010265 (2001).
43. Michel, B. E. & Kaufmann, M. R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant physiology* **51**, 914–916, https://doi.org/10.1104/pp.51.5.914 (1973).
44. Huang, J. & Redmann, R. E. Salt tolerance of Hordeum and Brassica species during germination and early seedling growth. *Canadian Journal of Plant Science* **75**, 815–819, https://doi.org/10.4141/cjps95-137 (1995).
45. Hafren, J. Excitation wavelength-specific changes in lignocellulosic autofluorescence. *Journal of Wood Science* **53**, 358–360, https://doi.org/10.1007/s10086-006-0862-8 (2007).
46. Ferreira, L. F. V., Garcia, A. R., Freixo, M. R. & Costa, S. M. B. Photochemistry on surfaces: solvent-matrix effect on the swelling of cellulose - an emission and absorption study of absorbed auramine-O. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions* **89**, 1937–1944, https://doi.org/10.1039/ft9938901937 (1993).
47. Dekkers, B. J. W. *et al*. Transcriptional dynamics of two seed compartments with opposing roles in Arabidopsis seed germination. *Plant Physiology* **163**, 205–215, https://doi.org/10.1104/pp.113.223511 (2013).
48. Jemmat, A. *et al*. In *ICPIG XXXII* (Lasi Romania 2015).

49. Alam, M. Z., Stuchbury, T. & Naylor, R. E. L. Effect of NaCl and PEG induced osmotic potentials on germination and early seedling growth of rice cultivars differing in salt tolerance. *Pakistant Journal of Biological sciences* **5**, 1207–1210, https://doi.org/10.3923/pjbs.2002.1207.1210 (2002).
50. Hampson, C. R. & Simpson, G. M. Effects of temperature, salt, and osùmotic potential on early growth of wheat (*Triticum aestivum*). *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **68**, 524–528, https://doi.org/10.1139/b90-072 (1990).
51. Stolarik, T. *et al*. Effect of low-temperature plasma on the structure of seeds, growth and metabolism of endogenous phytohormones in pea (*Pisum sativum L.*). *Plasma Chemistry and Plasma Processing* **35**, 659–676, https://doi.org/10.1007/s11090-015-9627-8 (2015).
52. Long, Y., Tan, D. Y., Baskin, C. C. & Baskin, J. M. Seed dormancy and germination characteristics of Astragalus arpilobus (Fabaceae, subfamily Papilionoideae), a central Asian desert annual ephemeral. *South African Journal of Botany* **83**, 68–77, https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.06.010 (2012).
53. Li, C., Zhang, B., Chen, B., Ji, L. & Yu, H. Site-specific phosphorylation of TRANSPARENT TESTA GLABRA1 mediates carbon partitioning in Arabidopsis seeds. *Nat Commun* **9**, 571, https://doi.org/10.1038/s41467-018-03013-5 (2018).
54. Di Cristina, M. *et al*. The Arabidopsis Athb-10 (GLABRA2) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development. *Plant J* **10**, 393–402, https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1996.10030393.x (1996).
55. Jayawardhane, K. N., Singer, S. D., Weselake, R. J. & Chen, G. Plant sn-Glycerol-3-Phosphate acyltransferases: biocatalysts involved in the biosynthesis of intracellular and extracellular lipids. *Lipids* **53**, 469–480, https://doi.org/10.1002/lipd.12049 (2018).
56. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**, 671–675, https://doi.org/10.1038/nmeth.2089 (2012).
57. Riou, B. & Landais, P. Principes des tests d'hypothèse en statistique: α, β et P. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* **17**, 1168–1180, https://doi.org/10.1016/S0750-7658(00)80015-5 (1998).
58. Gehan, E. A. A generalized Wilcoxon test for comparing arbritalily singly-cesored samples. *Biometrika* **52**, 203–223, https://doi.org/10.1093/biomet/52.1-2.203 (1965).
59. Fiume, E. *et al*. TWS1, a novel small protein, regulates various aspects of seed and plant development. *Plant Physiology* **172**, 1732–1745, https://doi.org/10.1104/pp.16.00915 (2016).
60. Winter, D. *et al*. An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *Plos One* **2**, 12, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000718 (2007).

Acknowledgements
The authors are thankful to the Paul Sabatier-Toulouse 3 University and to the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) for granting their work. MB is supported by PRHE-Laplace group and the French Laboratory of Excellence project "TULIP" (ANR-10-LABX-41).

Author Contributions
M.Y. and C.D. designed the study. M.B. performed all the experiments. C.D. and M.B. helped in designing the biological experiments and analysis. A.L.R and M.B. helped in SEM and confocal microscopy measurements. N.M., O.E. and M.Y. helped in with the plasma devices. M.B., M.Y. and C.D. wrote the manuscript. All the authors contributed to manuscript editing.

Additional Information
Supplementary information accompanies this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-019-44927-4.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

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 license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license 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 license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2019

Title

Stimulation of seed germination and plant growth by cold plasmas at atmospheric pressure

Abstract

This work is part of the convergence of the fields of plasma physics and plant biology. The objective of this thesis is to contribute answers to the mechanisms involved in the effects of cold plasmas at atmospheric pressure on the germination and development of plants.

The plant model in plant biology *Arabidopsis thaliana* is used; by considering the reference genotype Col-0 and several of its mutants (*gl2* and *gpat5*) in order to better highlight the effect of plasma, in particular on osmotic and saline stresses. For the direct treatment of seeds to promote germination, air plasmas are used. Indirect treatment for growth stimulation uses plasma-activated water (PAW) thanks to helium plasma jets.

The results show a positive effect of the plasma treatment of air generated by a dielectric barrier discharge device on a floating electrode (FE-DBD) and also a corona device in ambient air. These direct treatments allow an increase in the germination rate but above all an increase in the speed of germination. Analysis of the seed permeability revealed a change in the seed surface due to a physical effect of the plasma on the surface. Analysis of the surface residues shows a change in lipid composition. This being strongly correlated with germination; these results allow the identification of an understanding track of the effects of plasmas on the germination of seeds.

In a second part, the indirect treatment of plants with PAW has the effect of increasing the growth rate. The plasma creating a certain number of reactive species of oxygen and nitrogen (in particular nitrates and nitrites) acts as a fertilizer stimulating the growth of plants.

Keywords

Cold plasma, Germination, *Arabidopsis thaliana*, Reactive species, Plasma-agriculture, Development