

**UNIVERSITÉ DE BLIDA 1**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

Département de Biotechnologie et Agro-Écologie

# **THÈSE DE DOCTORAT**

Filière : Sciences Agronomiques

INFLUENCE DE LA NATURE DES BIOFERTILISANTS SUR  
LA TOLÉRANCE ET L'ACCUMULATION DES METAUX  
LOURDS CHEZ *ATRIPLEX HALIMUS* : UNE APPROCHE  
COMPARATIVE ENTRE LE VERMICOMPOST ET L'EXTRAIT  
AQUEUX DE *MORINGA OLEIFERA*

Par

**STASAIID Fatma Zohra**

Devant le jury composé de :

|               |            |               |                    |
|---------------|------------|---------------|--------------------|
| L. BRAHIMI    | MCA        | U. Blida. 1   | Présidente         |
| Z.E. DJAZOULI | Professeur | U. Blida. 1   | Directeur de thèse |
| D. ABDELHAMID | MCA        | U. Tissemsilt | Examineur          |
| H. MOSTEFAOUI | MCA        | U. Médéa      | Examinatrice       |

**Blida, Mai 2024**

# RÉSUMÉ

## Influence de la nature des biofertilisants sur la tolérance et accumulation des métaux lourds chez *Atriplex halimus*: Une approche comparative entre le vermicompost et l'extrait aqueux de *Moringa oleifera*

### Résumé

Un biostimulant est une substance ou microorganisme appliqué sur la plante afin d'améliorer la tolérance au stress abiotique et la qualité de culture en plus de sa teneur en éléments nutritifs. La présente étude vise l'optimisation des extraits de feuilles de *Moringa oleifera* par le recours à deux formulations et aussi la possibilité de ces derniers à atténuer le stress oxydatif.

Les biostimulants développés ont été appliqués en tant qu'agent de priming afin de déterminer leurs capacités à booster la croissance des graines d'*Atriplex halimus*. L'expérience a été réalisée dans une chambre de culture (16h/8h de photopériode, 25°C et 80% d'humidité). La technique de priming a été adoptée dans le but d'estimer l'effet booster des biostimulants développés. Les graines d'*Atriplex halimus* ont été amorcées par l'Extrait Aqueux (EAM), l'Extrait Aqueux formulé 1 (EAMF1) et l'Extrait Aqueux Formulé 2 (EAMF2), à différentes doses à savoir : 3ml/L, 2ml/L, 1,5ml/L et 1ml/L. Le suivi des essais est préconisé pendant 10 jours. Le taux de germination, le taux d'inhibition, la vitesse de germination et l'indice de vigueur ont été estimés. Les résultats ont montré que pour l'ensemble des paramètres étudiés, la forte dose 3ml/L de l'Extrait Aqueux (EAM) signale les valeurs les plus élevées rapport aux doses appliquées. Cependant, les mêmes paramètres de germination ont été obtenus sous l'effet des faibles doses (1ml/L) pour les extraits Aqueux Formulés (EAMF1 & EAMF2). Les concentrations retenues ont été utilisées ensuite sur les plantules de la même espèce dans le but d'atténuer le stress métallique provoqué par une solution d'arsenic  $As_2O_3$ , les essais ont été effectués dans une serre mono-chapelle dans des conditions semi contrôlées en randomisation totale, les traitements ont été appliqués par aspersion foliaire après application du stress. La modulation des métabolites secondaires enzymatiques et non enzymatiques (proline, polyphénols, flavonoïdes, CANATE, sucres totaux, teneur en eau), ainsi que certains paramètres d'expression végétative (longueur de la partie aérienne, longueur de la partie souterraine et nombre de feuilles) ont été estimés.

Par ailleurs, les résultats ont montré que le taux de germination, l'indice de germination, le taux d'inhibition et la vitesse de germination répondent positivement à l'extrait méthanolique (EMM), alors que la longueur des racines et des tiges et l'indice de vigueur sont en faveur de l'Extrait Aqueux Brut (EAM). Les formulations F1 et F2 ont montré une meilleure sécurisation des principes actifs de l'extrait méthanolique par rapport à l'extrait aqueux.

Cependant les extraits bruts et le vermicompost (VLC) ont exprimés une meilleure atténuation du stress suivi par les produits formulés notamment la formulation F<sub>1</sub> par rapport à la formulation F<sub>2</sub>.

L'optimisation des bioengrais à travers la formulation des principes actifs d'origine végétale permet de rationaliser l'utilisation des ressources phytogénétiques dans le cadre d'une agriculture durable.

**Mots clés** : *Atriplex halimus*, Extrait aqueux, formulation, *Moringa oleifera*, principe actif, indice de vigueur, métabolites secondaires, stress métallique.

## ABSTRACT

### Influence of the nature of biofertilizers on the tolerance and accumulation of heavy metals in *Atriplex halimus*: A comparative approach between vermicompost and aqueous extract of *Moringa oleifera*.

#### Abstract

A biostimulant is a substance or microorganism applied to the plant to improve tolerance to abiotic stress and crop quality in addition to its nutrient content. This study aims to optimize the extracts of *Moringa oleifera* leaves through the use of two formulations and also their potential to mitigate oxidative stress.

The developed biostimulants were applied as priming agents to determine their abilities to boost the growth of *Atriplex halimus* seeds. The experiment was conducted in a growth chamber (16h/8h photoperiod, 25°C, and 80% humidity). The priming technique was adopted to estimate the boosting effect of the developed biostimulants. *Atriplex halimus* seeds were primed with Aqueous Extract (EAM), Formulated Aqueous Extract 1 (EAMF1), and Formulated Aqueous Extract 2 (EAMF2) at different doses: 3ml/L, 2ml/L, 1.5ml/L, and 1ml/L. The trials were monitored for 10 days. Germination rate, inhibition rate, germination speed, and vigor index were assessed. The results showed that for all parameters studied, the high dose of 3ml/L of Aqueous Extract (EAM) signaled the highest values compared to the applied doses. However, similar germination parameters were obtained with the low doses (1ml/L) for the Formulated Aqueous Extracts (EAMF1 & EAMF2).

The selected concentrations were then used on seedlings of the same species to mitigate metal stress caused by an arsenic  $As_2O_3$  solution. The trials were conducted in a single-chamber greenhouse under semi-controlled conditions with total randomization. Treatments were applied via foliar spray after stress application. The modulation of secondary enzymatic and non-enzymatic metabolites (proline, polyphenols, flavonoids, CANATE, total sugars, water content), as well as some parameters of vegetative expression (aerial part length, underground part length, and number of leaves) were evaluated.

Furthermore, the results showed that germination rate, germination index, inhibition rate, and germination speed responded positively to methanolic extract (EMM), while root and stem length and vigor index favored Raw Aqueous Extract (EAM). Formulations F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> demonstrated better preservation of the active principles of the methanolic extract compared to the aqueous extract.

However, the raw extracts and vermicompost (VLC) showed better stress mitigation followed by formulated products, especially Formulation F<sub>1</sub> compared to Formulation F<sub>2</sub>. Optimizing biofertilizers through formulating active principles of plant origin helps rationalize the use of phyto-genetic resources in sustainable agriculture.

**Keywords:** *Atriplex halimus*, Aqueous extract, formulation, *Moringa oleifera*, active principle, vigor index, secondary metabolites, metal stress."

## تأثير طبيعة الأسمدة الحيوية على تحمل وتراكم المعادن الثقيلة في نبات الأتريلكس هاليموس: نهج مقارنة بين سماد الدودة والمستخلص المائي من شجرة المورينجا اوليفيرا.

اليومحفر هو مادة أو ميكروب تُطبق على النبات لتحسين تحمله للضغوط اللاحيوية وجودة المحصول بالإضافة إلى محتواه الغذائي. تهدف هذه الدراسة إلى تحسين استخراج أوراق شجرة المورينجا اوليفيرا من خلال استخدام تركيبتين وإلى إمكانية تقليل التوتّر التأكسدي.

تم تطبيق الأسمدة الحيوية المطورة كعوامل تنشيطية لتحديد قدرتها على تعزيز نمو بذور نبات الأتريلكس هاليموس. تم إجراء التجربة في غرفة زراعة (16 ساعة / 8 ساعات من الإضاءة، 25 درجة مئوية، و80% من الرطوبة). تم اعتماد تقنية التنشيط لتقدير تأثير تعزيز الأسمدة الحيوية المطورة. تم تنشيط بذور نبات الأتريلكس هاليموس بالمستخلص المائي (EAM)، والمستخلص المائي المُصنَّوع (EAMF1) و (EAMF2) بجرعات مختلفة: 3 مل / لتر، 2 مل / لتر، 1.5 مل / لتر، و1 مل / لتر. تم رصد التجارب لمدة 10 أيام. تم تقدير معدل الانبات، ومعدل التنشيط، وسرعة الانبات، ومؤشر النشاط. أظهرت النتائج أن للجرعة العالية من 3 مل / لتر من المستخلص المائي (EAM) أعلى القيم مقارنة بالجرعات المطبقة. ومع ذلك، تم الحصول على معلمات الانبات المشابهة باستخدام الجرعات المنخفضة (1 مل / لتر) للمستخلصات المائية المُصنَّعة (EAMF1) و (EAMF2).

ثم استُخدمت التراكيز المختارة على شتلات نفس النوع لتخفيف التوتّر المعدني الناتج عن حل مشروب ثلاثي الزرنيخ.  $As_2O_3$  جُرِيت التجارب في بيت زراعة واحد تحت ظروف شبه مُستَحصَمة بالعشوائية التامة. تم تطبيق المعاملات عبر رش الأوراق بعد تطبيق التوتّر. تم تقييم تغير في إنزيمات ومستقلات غير إنزيمية ثانوية) بروتين، البوليفينولات، الفلافونويدات، CANAT، السكريات الكلية، محتوى الماء، بالإضافة إلى بعض معايير التعبير الخضري (طول الجزء الهوائي، طول الجزء السفلي، وعدد الأوراق).

وأظهرت النتائج أن معدل الانبات، ومؤشر الانبات، ومعدل التنشيط، وسرعة الانبات استجابت بشكل إيجابي للمستخلص المائولي (EMM)، في حين أن طول الجذور والساق ومؤشر النشاط كانت لصالح المستخلص المائي الخام (EAM). أظهرت التركيبات F1 و F2 حفظاً أفضل للمبادئ النشطة للمستخلص المائولي مقارنة بالمستخلص المائي.

ومع ذلك، أظهرت المستخلصات الخام وسماد الدودة (VLC) قدرة أفضل على التخفيف من التوتّر مقارنة بالمنتجات المُصنَّعة، خاصةً التركيب F1 مقارنة بالتركيب F2. يساعد تحسين الأسمدة الحيوية من خلال صياغة المبادئ النشطة من أصل نباتي على تبرير استخدام الموارد الفيتوجينية في الزراعة المستدامة.

الكلمات الرئيسية: Atriplex halimus, Aqueous extract, formulation, Moringa oleifera, active principle, "vigor index, secondary metabolites, metal stress".

## **REMERCIEMENTS**

Une thèse c'est un escalier d'expériences scientifique et humaine qui marque l'esprit.

Je tiens à exprimer mes remerciements et mes respects aux membres du jury de thèse d'avoir accepté d'honorer et d'enrichir mon travail. Pour cela, je leur exprime ma profonde reconnaissance.

Je commencerais par remercier Dr BRAHIMI Latifa, Maitre de conférences A à l'Université de Blida 1 pour avoir aimablement accepté la responsabilité de présider le jury de ma thèse.

Je remercie énormément Dr MOSTEFAOUI Houda, Maitre de conférences A à l'Université de Médéa. de faire partie du jury de ma thèse.

Je voudrais remercier aussi Dr ABDELHAMID Djamel, Maitre de conférences A à l'Université de Tissemsilt, d'avoir accepté d'examiner mon travail et de faire partie de jury..

Je tiens à remercier profondément Professeur Z.E. DJAZOULI, mon directeur de thèse d'abord pour ses qualités humaines et d'être la personne qu'il est. Je le remercie de m'offrir une liberté de réflexion et la chance d'avoir cette thématique, de faire naître en moi une petite scientifique qui a une vision d'avenir avec un savoir-faire, et de m'avoir transmis son amour envers la science et son honnêteté envers le travail.

Je le remercie encore pour son accompagnement, disponibilité, orientation et ses conseils éclairés tout au long de ces quatre années de thèse et surtout de m'avoir apporté son énergie positive comme une lumière dans le noir.

Un grand merci à l'équipe de l'ESSAIA ; Alger pour leurs disponibilités et pour avoir mis à ma disposition le matériel nécessaire pour la caractérisation de mes extraits.

Au final je tiens à remercier notre équipe de laboratoire de recherche et mes collègues pour leurs esprits coopératifs, solidarité et soutien moral.

## **DÉDICACE**

*Je dédie cette thèse à ma mère Ghania BADADOU et mes soeurs pour leur soutien indéfectible et leur amour inconditionnel tout au long de mon parcours académique. Leur confiance en moi a été une source de motivation pour atteindre mes objectifs et réussir cette étape importante de ma vie*

*Zahra STASAI*

# Table des matières

RÉSUMÉ

ABSTRACT

ملخص

REMERCIEMENTS

DÉDICACES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

|   |           |
|---|-----------|
| INTRODUCTION.....   | 1         |
| <b>CHAPITRE I : APERÇUS BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>                       | <b>5</b>  |
| I.1. Les éléments traces métalliques et les végétaux.....               | 5         |
| I.1. 1. ETM étudiés : origine et phytodisponibilité.....                | 5         |
| I.1.1.1. Origine.....   | 5         |
| I.1.1.2. Phytodisponibilité.....  | 6         |
| I.1.2. Capture, transport et accumulation des ETM chez les plantes..... | 9         |
| I.1.2.1. Pénétration des ETM dans la plante.....                        | 9         |
| I.1.2.2. Translocation et accumulation des ETM dans la plante.....      | 13        |
| I.2. Phytotoxicité des éléments traces et tolérance des plantes.....    | 17        |
| I.2.1. Phytotoxicité des ETM.....                                       | 18        |
| I.2.1.1. Conséquences sur la croissance des plantes.....                | 18        |
| I.2.1.2. Le stress oxydatif.....  | 19        |
| I.2.2. Mécanismes de tolérance.....                                     | 22        |
| I.2.2.1. Système anti-oxydatif.....                                     | 22        |
| I.2.2.2. Autres mécanismes de tolérance.....                            | 25        |
| II. Présentation de la plante étudiée.....                              | 28        |
| II.1. Généralités sur le genre <i>Atriplex</i> .....                    | 28        |
| II.2. Description et systématique de l'espèce.....                      | 29        |
| II. 3. Résistance d' <i>A. halimus</i> aux différents stress.....       | 31        |
| II.3.1. Résistance à la sécheresse.....                                 | 31        |
| II.3.2. Résistance à la salinité.....                                   | 31        |
| II.3.3. Résistance aux métaux lourds.....                               | 31        |
| II.4. Utilisation des <i>Atriplex halimus</i> en phytoremédiation.....  | 31        |
| III. Les stimulants biologiques.....                                    | 32        |
| IV. Les biofertilisants.....  | 34        |
| IV.1. Quelques Types de biofertilisant.....                             | 34        |
| IV.1.1. Les engrais d'origine animal.....                               | 34        |
| IV.1.2. Le compost.....   | 34        |
| IV.1.2.1. Définition du compostage.....                                 | 34        |
| IV.1.2.2. Définition du vermicompostage.....                            | 35        |
| V. Les formulations.....  | 36        |
| V.1. Propriétés physico-chimiques des adjuvants.....                    | 36        |
| V.2. Classification des adjuvants : Utilité et application.....         | 38        |
| V.2.1. Surfactants.....   | 39        |
| V.2.2. Huiles.....  | 40        |
| V.2.3. Engrais azotés.....  | 41        |
| V.2.4. Utilités.....  | 42        |
| <b>CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>                          | <b>44</b> |
| II.1. Objectifs.....  | 44        |
| II.2. Présentation du matériel végétal.....                             | 49        |

|  |            |
|--|------------|
| II.3. Préparation des biostimulants .....  | 45.        |
| II.4. Méthodologie de travail.....   | 47         |
| II.4.1. Optimisation des concentrations.....   | 47         |
| II.4.1.1. Estimation de la germination.....  | 47         |
| II.4.1.2. Dispositif expérimental.....   | 47         |
| II.4.1.3. Conduite de l'essai.....   | 48         |
| II.4.1.4. Paramètres étudiés.....  | 49         |
| II.4.1.5. Analyses statistiques des données.....   | 49         |
| II.4.2. Application du stress métallique .....   | 50         |
| II.4.2.1. Préparation des plantules .....  | 50         |
| II.4.2.2. Repiquage .....  | 50         |
| II.4.2.3. Dispositif expérimental.....   | 50         |
| II.4.2.4. Conduite de l'essai .....  | 50         |
| II.4.2.4.1. Application de la solution d'Arsenic.....  | 50         |
| II.4.2.4.2. Application des traitements.....   | 51         |
| II.4.2.5. Paramètres étudiés.....  | 51         |
| II.4.3. Calcul du paramètre de translocation et d'accumulation .....                                     | 53         |
| II.4.3.1. Récupération des échantillons (tiges, racines, sol) .....                                      | 53         |
| II.4.3.2. Quantification de l'arsenic.....   | 54         |
| II.4.3.2.1. Préparation des échantillons.....  | 54         |
| II.4.3.2.2. Digestion des échantillons .....   | 54         |
| II.4.3.2.3. Lecture SAA .....  | 54         |
| II.4.3.3. Paramètres mesurés .....   | 54         |
| II.4.3.3.1. Détermination du facteur de translocation.....   | 54         |
| II.4.3.3.2. Détermination du facteur d'accumulation .....  | 55         |
| II.4.4. Analyses statistiques des données.....   | 55         |
| <b>CHAPITRE III : RÉSULTATS.....</b>   | <b>56</b>  |
| III.1. Effet des biostimulants sur les paramètres de germination .....                                   | 56         |
| III.1.1. Évaluation de l'effet des concentrations sur les paramètres de germination .....                | 56         |
| III.1.2. Étude comparée et tendance de l'effet des biostimulants sur les paramètres de germination ..... | 67         |
| III.1.3. Tendance de l'effet des biostimulants sur les paramètres de germination .....                   | 70         |
| III.2. Effet des biostimulants sur les paramètres morpho-physiologiques.....                             | 75         |
| III.2.1. Variation des paramètres physiologiques .....   | 75         |
| III.2.1.1. Etude comparée de la teneur en proline .....  | 75         |
| III.2.1.2. Etude comparée de la teneur en polyphénols totaux .....                                       | 78         |
| III.2.1.3. Etude comparée de la teneur en flavonoïdes totaux .....                                       | 80         |
| III.2.1.4. Etude comparée de la teneur en sucres totaux.....   | 82         |
| III.2.1.5. Étude comparée de capacité antioxydante non enzymatique totale CANETE.....                    | 84         |
| III.2.1.6. Etude comparée de la teneur en eau.....   | 86         |
| III.2.2. Variation des paramètres morphologiques.....  | 88         |
| III.2.2. 1. Etude comparée de la longueur de la partie aérienne.....                                     | 88         |
| III.2.2.2. Etude comparée de la longueur de la partie racinaire.....                                     | 90         |
| III.2.2.3. Etude comparée du nombre de feuilles.....   | 92         |
| <b>CHAPITRE VI : DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>  | <b>94</b>  |
| <b>CONCLUSION .....</b>  | <b>101</b> |
| <b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>   | <b>104</b> |

## LISTE FIGURES

|               |  |    |
|---------------|--|----|
| Figure I.1    | Origine des ETM dans les sols.....   | 05 |
| Figure I.2    | Coupe transversale d'une racine montrant le transport des éléments traces par voie symbiotique ou apoplasmique.....  | 10 |
| Figure I.3    | Schéma représentant les différents constituants des parois cellulaires végétales.....  | 11 |
| Figure I.4    | Exemple d'agent chélateur : la nicotianamine.....  | 15 |
| Figure I.5    | Sites de production subcellulaires des formes réactives de l'oxygène (ROS) dans une cellule végétale.....  | 20 |
| Figure I.6    | Principaux dommages cellulaires induits par les espèces réactives de l'oxygène et provoqués sur les lipides, les protéines et l'ADN.....   | 21 |
| Figure I.7    | Mode d'action des principales activités enzymatiques intervenant dans le catabolisme des formes réactives de l'oxygène.....  | 23 |
| Figure I.8    | Fonctionnement coordonné de divers anti-oxydants chez les plantes  | 24 |
| Figure I.9    | Structure d'une phytochélatine n=2 à11.....  | 26 |
| Figure I.10   | Aspect général d' <i>Atriplex halimus</i> .....  | 30 |
| Figure I.11   | Vermicomposteur à quatre compartiments avec robinet de récupération.....   | 35 |
| Figure I.12   | Fonctionnalité des adjuvants utilisés dans l'industrie agrochimique ...  | 37 |
| Figure I.13   | Illustration schématique du comportement des gouttelettes de pulvérisation sur la surface des feuilles de plantes.....   | 39 |
| Figure I.14   | Pourcentage d'absorption foliaire selon la famille des adjuvants.....  | 40 |
| Figure II.1   | Schéma hypothétique de l'impact de la formulation sur la stimulation des paramètres de croissance des graines et l'atténuation du stress métallique au niveau des plantules..... | 44 |
| Figure II.2   | Dispositif expérimental des apports des différents biostimulants.....  | 48 |
| Figure II.3   | Dispositif expérimental des essais en conditions contrôlées.....   | 48 |
| Figure III.1  | Evaluation de différentes concentrations du EAM sur les paramètres de germination.....   | 59 |
| Figure III.2  | Evaluation de différentes concentrations du EMM sur les paramètres de germination.....   | 60 |
| Figure III.3  | Evaluation de différentes concentrations du EAM F1 sur les paramètres de germination.....  | 61 |
| Figure III.4  | Evaluation de différentes concentrations du EAM F2 sur les paramètres de germination.....  | 62 |
| Figure III.5  | Evaluation de différentes concentrations du EMM F1 sur les paramètres de germination.....  | 63 |
| Figure III.6  | Evaluation de différentes concentrations du EMM F <sub>2</sub> sur les paramètres de germination.....  | 64 |
| Figure III.7  | Evaluation de différentes concentrations du VLCB sur les paramètres de germination.....  | 65 |
| Figure III.8  | Evaluation de différentes concentrations du VLFCF sur les paramètres de germination.....   | 66 |
| Figure III.9  | Dendrogramme des paramètres de germination de l' <i>Atriplex</i> sous l'effet de différentes formulations des extraits aqueux et méthanolique de <i>Moringa</i> .....            | 69 |
| Figure III.10 | Projection des paramètres de germination sous l'effet des biostimulants du cluster 1.....  | 70 |
| Figure III.11 | Évolution temporelle de l'indice de germination sous l'effet des biostimulants du cluster 1.....   | 71 |
| Figure III.12 | Variation de l'indice de vigueur sous l'effet des biostimulants du cluster 1.....  | 72 |

|               |  |    |
|---------------|--|----|
| Figure III.13 | Projection des paramètres de germination sous l'effet des biostimulants du cluster 2.....                            | 73 |
| Figure III.14 | Évolution temporelle de l'indice de vigueur sous l'effet des biostimulants du cluster 2.....                         | 74 |
| Figure III.15 | Variation de l'indice de vigueur sous l'effet des biostimulants du cluster 2.....                                    | 75 |
| Figure III.16 | Présentation en BoxPlot de la teneur en proline sous l'effet des traitements.....                                    | 76 |
| Figure III.17 | Analyse de la variance appliquée à la teneur en proline sous l'effet des traitements.....                            | 77 |
| Figure III.18 | Étude comparée de la teneur en proline sous l'effet des traitements...   | 77 |
| Figure III.19 | Présentation en BoxPlot de la teneur en polyphénols totaux sous l'effet des traitements.....                         | 78 |
| Figure III.20 | Analyse de la variance appliquée à la teneur en polyphénols totaux sous l'effet des traitements.....                 | 79 |
| Figure III.21 | Etude comparée de la teneur en polyphénols totaux sous l'effet des traitements.....                                  | 79 |
| Figure III.22 | Présentation en BoxPlot de la teneur en flavonoïdes totaux sous l'effet des traitements.....                         | 80 |
| Figure III.23 | Analyse de la variance appliquée à la teneur en flavonoïdes totaux sous l'effet des traitements.....                 | 81 |
| Figure III.24 | Etude comparée de la teneur en flavonoïdes totaux sous l'effet des traitements.....                                  | 81 |
| Figure III.25 | Présentation en BoxPlot de la teneur en sucres totaux sous l'effet des traitements.....                              | 82 |
| Figure III.26 | Analyse de la variance appliquée à la teneur en sucres totaux sous l'effet des traitements.....                      | 83 |
| Figure III.27 | Etude comparée de la teneur en sucres totaux sous l'effet des traitements.....                                       | 83 |
| Figure III.28 | Présentation en BoxPlot de la capacité antioxydante non enzymatique totale sous l'effet des traitements.....         | 84 |
| Figure III.29 | Analyse de la variance appliquée à la capacité antioxydante non enzymatique totale sous l'effet des traitements..... | 85 |
| Figure III.30 | Etude comparée de la capacité antioxydante non enzymatique totale sous l'effet des traitements.....                  | 85 |
| Figure III.31 | Présentation en BoxPlot de la teneur en eau sous l'effet des traitements.....  | 86 |
| Figure III.32 | Analyse de la variance appliquée à la teneur en eau sous l'effet des traitements.....                                | 87 |
| Figure III.33 | Etude comparée de la teneur en eau sous l'effet des traitements.....   | 87 |
| Figure III.34 | Présentation en BoxPlot de la longueur de la partie aérienne sous l'effet des traitements.....                       | 88 |
| Figure III.35 | Analyse de la variance appliquée à la longueur de la partie aérienne sous l'effet des traitements.....               | 89 |
| Figure III.36 | Etude comparée de la longueur de la partie aérienne sous l'effet des traitements.....                                | 89 |
| Figure III.37 | Présentation en BoxPlot de la longueur de la partie racinaire sous l'effet des traitements.....                      | 90 |
| Figure III.38 | Analyse de la variance appliquée à la longueur de la partie racinaire sous l'effet des traitements.....              | 91 |
| Figure III.39 | Etude comparée de la longueur de la partie racinaire sous l'effet des traitements.....                               | 91 |
| Figure III.40 | Présentation en BoxPlot du nombre de feuilles sous l'effet des traitements.....                                      | 92 |

|               |   |    |
|---------------|---|----|
| Figure III.41 | Analyse de la variance appliquée nombre de feuilles sous l'effet des traitements..... | 93 |
| Figure III.42 | Etude comparée du nombre de feuilles sous l'effet des traitements....                 | 93 |

## **LISTE TABLEAUX**

|               |  |    |
|---------------|--|----|
| Tableau I.1   | Exemples de transporteurs membranaires d'ETM identifiés chez les plantes.....  | 13 |
| Tableau I.2   | Quelques exemples de plantes hyperaccumulatrices pour témoigner des niveaux seuils d'accumulation des ETM dans les feuilles..... | 16 |
| Tableau III.1 | Moyennes arithmétique (+ coefficient de variation en %) des paramètres de germination.....                                       | 67 |

## INTRODUCTION

Le changement est une cause majeure de la réduction de la biodiversité. La température est un des principaux facteurs influencés par ces changements. Son augmentation pourrait entraîner l'extinction de nombreuses espèces, végétales ou animales [1, 2]. Certaines études ont montré que le nombre de graines germées augmente de manière linéaire lorsque la température augmente jusqu'à un niveau optimal, puis diminue de manière linéaire lorsque la température dépasse la limite [3, 4]. De plus, la température a un impact substantiel sur le métabolisme biochimique et physiologique. Selon Ahmed et *al.* [5], aucune germination n'a été observée pour les populations à 40°C. Des températures optimales pour la germination ont été estimées entre 7,9 et 25,9°C. Les contraintes abiotiques, telles que la sécheresse, la salinité, les températures extrêmes et l'application des différents intrants causent d'importantes pertes de récolte mondiale réduisant ainsi plus de 50% les rendements moyens pour la plupart des plantes cultivées [6]. Les facteurs de stress abiotiques, peuvent tous avoir des effets néfastes sur la croissance des plantes, entraînant une perte de rendement et une qualité réduite des cultures [7]. Les stress hydriques et thermiques sont les principaux obstacles à la réussite de l'établissement des cultures et à leurs performances ultérieures. Par conséquent, des circonstances défavorables pourraient gravement affecter l'établissement de la culture et le rendement ultérieur [8-10]. La germination des graines est la première étape de la vie d'une plante. C'est un processus qui se fait en trois phases. La première phase est l'imbibition. Les graines dormantes absorbent l'eau et le processus d'hydrolyse a lieu. L'imbibition des graines résulte de l'interaction des protéines, des glucides et des lipides, et les variations de leur contenu peuvent affecter le processus [11]. La deuxième phase est la régulation de la germination, caractérisée par l'activation de la synthèse d'ATP dans la glycolyse, le cycle de Krebs, la chaîne respiratoire et la traduction de l'ARNm stocké. Cependant, la troisième phase représente l'achèvement de la germination, lorsque la radicule dépasse du tégument et forme une racine, et les plumules forment un système de pousse capable d'utiliser la matière inorganique, l'eau et l'énergie lumineuse pour une croissance saine [12, 13]. La germination est un processus compliqué d'un point de vue physiologique, impliquant de multiples signaux, et il est influencé à la fois par des facteurs intrinsèques et extrinsèques [14].

Les facteurs intrinsèques comprennent la dormance des graines et les réserves de nourriture disponibles, et les facteurs extrinsèques comprennent l'eau, la température, l'oxygène, la lumière et l'humidité relative. En général, le biofertilisant est de nature organique contenant des microorganismes particuliers efficaces sous une forme concentrée qui provient soit du nodule racinaire de la plante, soit du sol de la rhizosphère. Les biofertilisants sont apparus comme des intrants potentiels respectueux de l'environnement qui profitent au système de production agricole. Ils ont de vastes perspectives pour répondre aux besoins en éléments nutritifs des plantes, ce qui réduit l'application d'engrais chimiques et minimise la pollution de l'environnement [15]. L'application de régulateurs de croissance des plantes ou de nutriments pendant le prétrempage, l'amorçage et d'autres traitements de pré-semis dans de nombreuses cultures a amélioré la performance des semences, ce qui se traduit par une croissance et une productivité globale des plantes, en particulier dans des conditions défavorables, telles que des températures extrêmes ou la salinité [16, 17]. Les réponses typiques à l'amorçage sont une propagation plus rapide et plus rapprochée des temps d'émergence sur tous les environnements de lit de semence et une plage de températures d'émergence plus large, conduisant à de meilleurs peuplements de cultures, et donc à un rendement et une qualité de récolte améliorés, en particulier dans des conditions de croissance sous-optimales et stressantes dans le champ [18]. De plus, les graines amorcées germent et émergent souvent plus rapidement que les graines non amorcées, surtout à basse température [19]. Le Moringa appartient à la famille des Moringacées. Il existe environ 13 espèces de Moringa dont *M. oleifera* est la plus cultivée. Comme les feuilles de Moringa sont riches en zéatine, elles peuvent être utilisées comme source naturelle de cytokinine [20]. De plus, la feuille de Moringa est également riche en ascorbates, caroténoïdes, les phénols, le potassium et le calcium, qui ont des capacités de promotion de la croissance des plantes et sont souvent appliqués comme activateurs de croissance des plantes exogènes [21]. Les antioxydants tels que l'acide ascorbique et le glutathion, qui se trouvent à des concentrations élevées dans les chloroplastes du Moringa et d'autres compartiments cellulaires, sont cruciaux pour la défense des plantes contre le stress oxydatif [22]. L'Atriplex étant convoité pour son action visant la mise en valeur des sols.

Depuis les années 60 La pollution de l'environnement constitue une préoccupation majeure de nos sociétés modernes. D'après Stengel et Gelin [23], la pollution est une

modification défavorable du milieu naturel, qui sera par la modification des composantes physiques, chimiques ou biologiques. Cela pose de sérieux problèmes pour l'environnement car l'industrie, l'agriculture et les communautés urbaines repoussent de nombreux produits chimiques, notamment les éléments métalliques dans le sol. De fait, le sol a été longtemps considéré comme une ressource renouvelable, voire même inépuisable à l'échelle des générations humaines, capable de recevoir sans conséquence les rejets de nos activités.

On sait maintenant que les sols sont caractérisés par un équilibre fragile et sont vulnérables. Aujourd'hui, ce patrimoine est menacé à la fois par le lourd héritage du passé et par l'extension des surfaces consacrées au développement industriel [24]. Certains métaux tels que : Cu, Zn, Co, Fe et Mn sont essentiels au métabolisme cellulaire, agissant comme cofacteurs du métabolisme cellulaire. Certains autres éléments, comme l'arsenic, le cadmium, le plomb, le mercure et l'argent, sont toxiques pour les organismes et inhibent l'activité enzymatique. Contrairement aux polluants organiques ne sont pas biodégradables et persistent donc longtemps dans l'environnement.

La toxicité des métaux lourds est étroitement liée à leurs propriétés redox et à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), telles que les anions superoxydes ou les radicaux hydroxyles, les phospholipides membranaires et les acides aminés. Ces dernières années, le développement de technologies de purification efficaces des sites contaminés sont devenus indispensables, par exemple Bioventilation, Bioremediation, Biopiles, Compostage, Bioréacteur, Atténuation naturelle contrôlée et la phytoremédiation, qui utilise des plantes Accumulation, transformation, dégradation, concentration, stabilisation ou volatilisation de la chlorophylle Polluants contenus dans le sol ou l'eau contaminés [25].

Cette technique d'assainissement des sols contaminés repose sur la capacité de certaines plantes à extraire les polluants de leurs substrats puis à les accumuler dans leur biomasse telles que la moutarde brune (*Brassica juncea*) pour le Cadmium et le Plomb, le colza (*Brassica napus*) pour le zinc et la Fabacée (*Astragalus bisulcatus*) pour le sélénium, *Atriplex halimus* pour l'arsenic.

*Atriplex halimus* L. appartient à la famille des chénopodiacées. C'est une espèce halophyte très répandue en Algérie surtout dans les régions à climats aride et semi-aride elle résiste bien aux conditions environnementales comme la salinité et la sécheresse. Bien adaptées à des conditions environnementales extrêmes et peuvent

présenter des propriétés accumulatrices de métaux lourds. Des études récentes ont rapporté que cette espèce est présente dans des sols pollués par les métaux lourds, et elle est capable de tolérer des concentrations élevées de l'arsenic [25].

D'après Giri et *al.* [26], l'utilisation de biofertilisants peut être une solution fortement recommandée dans la mesure où cela peut rendre les pratiques agricoles plus durables, puisque ces derniers fabriqués à partir de résidus de plantes et de micro-organismes qui se sont révélés inoffensifs, mais bénéfique, naturel, biologique, biodégradable, écologique et économiquement rentable [26]. La recherche scientifique a prouvé que les biofertilisants peuvent remplacer efficacement les engrais de synthèse Stimule la croissance des plantes et augmente les rendements des cultures tout en minimisant l'utilisation de produits agrochimiques dangereux [27].

Notre étude vise à évaluer l'efficacité des biofertilisants issus du vermicompostage des déchets ménagers dont, le vermicompost brut (VLC) et le vermicompost fermenté (VLCF) ainsi que les extraits aqueux et méthanoliques de *Moringa Oleifera* bruts et formulés sur les paramètres de croissance et de production ainsi que les paramètres biochimiques de l'*Atriplex halimus* en présence du métal lourds (arsenic,  $As_2O_3$ ). Nous avons formulé les hypothèses de recherche suivantes : (i) Est-ce que ces produits peuvent améliorer la capacité d'absorbance des métaux ? (ii) Lequel de ces biofertilisants à l'effet le plus important ?

# CHAPITRE I : APERÇUS BIBLIOGRAPHIQUES

## I.1. Les éléments traces métalliques et les végétaux

Bien qu'il n'y ait pas de définition scientifique précise, les éléments traces métalliques regroupent des composés toxiques présents en faibles quantités dans les environnements naturels. Autrefois désignés sous le terme de "métaux lourds", cette appellation a été progressivement abandonnée en raison de l'assimilation de métalloïdes tels que l'arsenic ou de métaux légers comme le zinc, caractérisés par une faible masse volumique, à cette catégorie de composés [28].

### I.1.1. Les éléments traces métalliques (ETM)

#### I.1.1.1. Origine

Les éléments traces métalliques (ETM) présents dans les sols peuvent avoir une origine naturelle, résultant de l'altération de la roche mère. Les concentrations observées dans les sols en zinc, cadmium et plomb sont en moyenne de 50, 0,5 et 32 mg.kg<sup>-1</sup> respectivement [29 - 32]. Toutefois, la majeure partie des ETM présents dans l'environnement provient de sources anthropiques. Au cours des deux derniers siècles, les activités humaines ont largement contribué à l'enrichissement des sols en ETM. Les principales sources de contamination des sols incluent l'épandage agricole, le trafic routier et, surtout, les activités industrielles (voir Figure I.1).

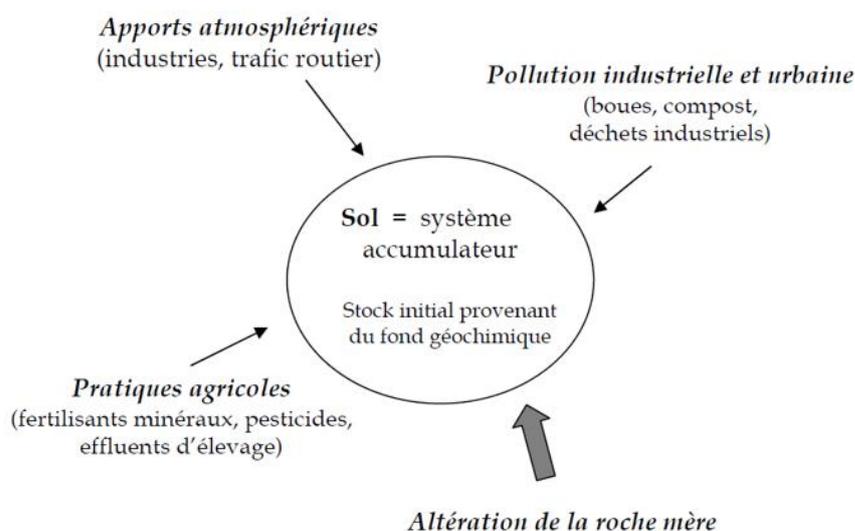


Figure I.1 : Origine des ETM dans les sols

Par exemple, dans la région septentrionale de la France, les activités des industries chimiques et métallurgiques ont joué un rôle déterminant dans la contamination des sols. Les fonderies de plomb et de zinc localisées à Noyelles Godault et Auby ont constitué une source significative de pollution métallique (zinc, plomb et cadmium) depuis la fin du 19<sup>ème</sup> siècle [33 - 35]. Les procédés pyrométallurgiques employés ont engendré d'importants déchets toxiques, notamment des éléments traces métalliques (ETM), dont les méthodes de stockage ont contribué à leur dispersion dans l'environnement. Les émissions de poussières issues de ces installations ont entraîné la contamination des sols sur une vaste étendue géographique, couvrant plus de 120 km<sup>2</sup>, par le plomb, le cadmium et le zinc [35]. Par conséquent, des concentrations dépassant les seuils de 30 mg.kg<sup>-1</sup> de cadmium, 5200 mg.kg<sup>-1</sup> de plomb et 7500 mg.kg<sup>-1</sup> de zinc ont été mesurées dans les sols des jardins environnants aux deux usines [36 - 38], constituant ainsi un risque sérieux pour la santé de la population locale [39-37].

#### I.1.1.2. Phytodisponibilité

La disponibilité phytique d'un élément trace peut être définie comme la quantité qui peut être absorbée par la plante au cours de son développement. Ce phénomène découle d'une série de processus successifs contribuant au transfert de l'élément depuis la phase solide du sol vers la solution du sol, puis vers les tissus de la plante. Les racines des plantes, en effet, prélèvent les éléments traces métalliques (ETM) exclusivement dans la solution du sol [40]. Ainsi, le prélèvement des ETM par les racines est influencé par des facteurs liés au sol, à la faune du sol, à la plante et aux interactions entre les différents éléments.

#### **- Facteurs liés au sol**

Parmi les caractéristiques liées au sol, le pH, la capacité d'échange cationique (CEC) et le taux de matière organique jouent des rôles prépondérants [41]. La solubilité d'un élément trace est largement tributaire du pH du sol. Un pH bas augmente généralement la disponibilité phytique des éléments traces métalliques (ETM) car les protons (ions H<sup>+</sup>) manifestent une affinité accrue pour les charges négatives des colloïdes du sol, entrant ainsi en compétition avec les ETM pour ces sites et induisant ainsi le relargage des ETM dans l'eau des pores du sol [41].

La présence d'une quantité significative de matière organique dans les sols favorise l'immobilisation des éléments traces par le biais de leur complexation avec les acides humiques ou fulviques, par exemple. La CEC du sol représente un paramètre global qui indique la quantité maximale de cations qu'un poids donné de sol peut retenir, exprimant essentiellement le total des charges négatives du sol disponibles pour la fixation de cations métalliques ou d'ions  $H^+$ . Les cations dissous dans la solution du sol sont attirés par des composants chargés négativement, principalement les argiles, les oxydes de métaux et la matière organique, qui constituent les principaux contributeurs à la CEC du sol [42]. Une CEC élevée signifie que les cations métalliques sont davantage adsorbés ou complexés par les constituants du sol, rendant ainsi ces éléments moins assimilables par les plantes.

Dans les sols, la mobilité des éléments traces métalliques (ETM) varie, avec certains, tels que le zinc (Zn) ou le cadmium (Cd), montrant une plus grande mobilité, tandis que d'autres, comme le plomb (Pb), sont nettement moins mobiles et ont tendance à former des complexes avec les composants de la matière organique [41].

#### **- Spéciation du Zn, Cd et Pb dans les sols**

Le zinc possède une masse atomique de  $65,409 \text{ g.mol}^{-1}$  et se trouve exclusivement dans les sols sous l'état d'oxydation (+II), par exemple sous forme de  $Zn^{2+}$ ,  $ZnSO_4$ ,  $ZnHCO_3^+$ ,  $ZnCO_3$  [43]. Dans la solution du sol, il se présente principalement sous la forme  $Zn^{2+}$  ou plus fréquemment sous forme de complexes solubles ou insolubles avec les matières organiques [44]. La proportion de zinc complexé dans la solution du sol augmente avec le pH ; ainsi, la concentration de zinc en solution (Zn échangeable) augmente significativement pour des pH inférieurs à 6. [45, 46]. Des pratiques telles que le chaulage, l'apport d'argile, de fer ou de phosphore réduisent le transfert du zinc vers les plantes. En présence de fortes concentrations de sulfates ( $SO_4^{2-}$ ) dans le sol, le zinc forme du  $ZnSO_4$  soluble. Cependant, en présence de phosphore, le zinc forme du  $Zn_3(PO_4)_2$  solide dans le sol, réduisant ainsi sa phytodisponibilité. De plus, le phosphore perturbe l'assimilabilité physiologique du zinc dans les tissus végétaux [47]. Le cadmium, avec une masse atomique de  $112,411 \text{ g.mol}^{-1}$ , est naturellement présent sous forme oxydée (+II) de manière stable ( $Cd^{2+}$ ,  $CdSO_4$ ,  $CdS$ ,  $CdCl_2$ ,  $CdCO_3$ ,  $CdHCO_3^+$  ou  $Cd(PO_4)_2$ ). [43]. Ce métal peut être retenu par la matière organique et les hydroxydes de fer. Sa mobilité dans les sols, principalement dépendante du pH, est plus élevée que celle du zinc, bien que limitée par son affinité envers la matière

organique [32]. La concentration de cadmium dans la solution du sol augmente significativement pour des pH inférieurs à 6, se présentant alors sous forme de  $\text{Cd}^{2+}$  ou de chélats d'acides fulviques [43]. Des pratiques telles que le chaulage ou l'apport de cuivre ou de zinc peuvent réduire le transfert du cadmium vers les plantes [32].

Le plomb a une masse atomique de 207,2 g.mol<sup>-1</sup>. Dans les sols, le plomb se trouve principalement sous le degré d'oxydation (+II) ( $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{PbHCO}_3^+$ ,  $\text{PbS}$ ,  $\text{PbSO}_4$ ,  $\text{Pb(OH)}_2$ ,  $\text{PbCO}_3$ ,  $\text{PbO}$ ,  $\text{Pb(PO}_4)_2$ ,  $\text{PbCl}^+$ ) [43]. Le plomb présente une forte réactivité vis à vis des oxydes de fer et de manganèse mais également vis à vis des phosphates et de la matière organique [32, 48]. L'immobilisation du plomb sous forme organique et minérale contribue aux faibles solubilités et mobilité de cet élément et explique qu'il soit difficilement phytodisponible [49, 50, 36]. Le facteur pH a un rôle important dans le transfert du Pb du sol vers les végétaux ; une acidification du sol favorise sa solubilisation et par conséquent sa biodisponibilité [46].

#### **- Facteurs liés aux plantes et interactions avec les organismes telluriques**

Avant d'être absorbés par les racines, certaines plantes ont la capacité de modifier la composition physico-chimique et microbienne de la rhizosphère, une zone définie comme étant proche de la racine et en interaction avec celle-ci. Cette modification se produit à travers l'absorption de nutriments ou l'excrétion de certains produits par les plantes. La capacité des plantes à libérer des exsudats racinaires varie selon les espèces et les cultivars [41].

Les racines peuvent ainsi sécréter des acides organiques ou aminés, des mucilages, des cellules mortes, de l'oxygène ( $\text{O}_2$ ) et du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) dans leur environnement. Ces sécrétions ont pour effet de modifier les propriétés du sol, telles qu'une diminution de son pH. Par exemple, cette diminution de pH peut accroître la biodisponibilité des éléments traces métalliques (ETM) dans le sol, facilitant ainsi leur absorption par la plante [42].

En effet, certains acides organiques tels que le citrate et le malate, ainsi que des acides aminés de petite taille, peuvent stimuler l'absorption des éléments traces métalliques (ETM) par les racines. À l'inverse, des substances comme les mucilages, des polysaccharides de très grande taille riches en acides polyuroniques, ont la capacité de former des complexes avec les ETM, entravant ainsi leur absorption par la plante. La présence de carbone dans les exsudats racinaires peut également favoriser la prolifération de micro-organismes dans la rhizosphère. Ces micro-organismes peuvent

altérer le statut des ETM dans la rhizosphère, en effectuant des processus tels que la minéralisation de la matière organique, la complexation des ETM et la modification du pH du sol. Ces modifications peuvent augmenter ou diminuer l'absorption des ETM par les racines [51, 52, 53].

Par exemple, les mycorhizes, formés par des champignons en symbiose avec les racines, augmentent la surface d'échange entre le sol et la racine, favorisant ainsi l'absorption des ETM tels que le cuivre (Cu) et le zinc (Zn) [54,44].

De plus, certains microorganismes ont la capacité de décomposer la matière organique, libérant ainsi les éléments traces métalliques (ETM) chélatés par les acides humiques [55]. À l'inverse, d'autres microorganismes peuvent entrer en compétition avec la plante pour l'absorption de certains éléments essentiels, comme le zinc [47].

Enfin, le macrofaune du sol peut également influencer la phytodisponibilité des ETM. Récemment, Zhang et *al.* [56], ont démontré le rôle du mucus et des acides aminés sécrétés par les lombrics dans l'impact sur la phytodisponibilité et l'accumulation du cadmium chez la tomate.

## I.1.2. Capture, transport et accumulation des ETM chez les plantes

### I.1.2.1. Pénétration des ETM dans la plante

Les éléments traces métalliques (ETM) exposent les plantes de deux manières distinctes : d'une part, par leurs parties aériennes, à partir de particules en suspension dans l'air ou de composés dissous dans l'eau de pluie ou d'arrosage ; d'autre part, par leurs racines.

#### **- Absorption foliaire**

L'exposition par voie aérienne est généralement limitée, sauf dans les zones à fortes retombées atmosphériques, telles que les environs des industries métallurgiques ou des routes fréquentées (résidus de combustion des carburants), par exemple. Dans de telles conditions, les éléments traces métalliques (ETM) peuvent être captés par le système foliaire et pénétrer dans la plante à travers les stomates ou la cuticule des feuilles [41]. Cependant, la majeure partie des cations métalliques absorbés de cette manière reste emprisonnée dans la cuticule ou les parois cellulaires sous une forme insoluble et migre très peu vers les autres parties de la plante [42].

Le passage des cations semble être inversement proportionnel à la taille du cation hydraté [57] ; ainsi, le cadmium (Cd) et le zinc (Zn) auraient une plus grande propension à pénétrer à l'intérieur des feuilles que le plomb (Pb) [58]. Cependant, la compréhension du passage des ETM par la voie foliaire demeure encore lacunaire, et son importance reste sujette à controverse.

### - Absorption racinaire

Les cations métalliques extraits du sol par la plante suivent initialement une trajectoire dans l'apoplasme des cellules racinaires. Par la suite, une portion peut être transférée à l'intérieur des cellules (par la voie symplasmique), tandis qu'une autre peut être transportée plus loin dans l'apoplasme (par la voie apoplasmique) (voir Figure I.2), ou encore se fixer à certains composants des parois cellulaires [44].

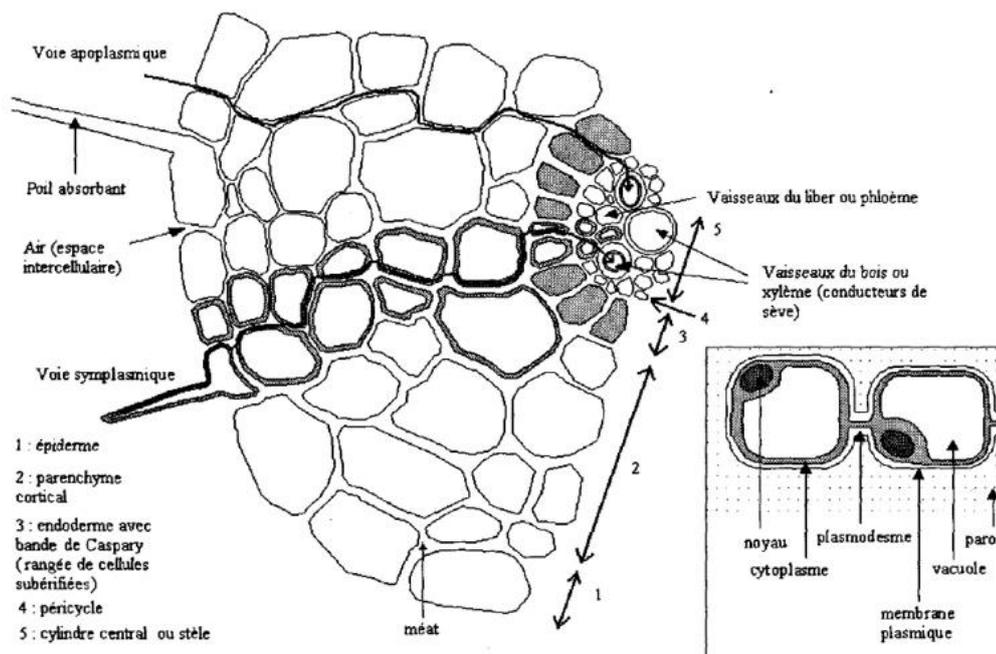


Figure I.2 : Coupe transversale d'une racine montrant le transport des éléments traces par voie symbiotique ou apoplasmique [42]

La principale voie d'absorption des métaux s'effectue par simple diffusion à travers l'apoplasme du cortex racinaire. Les éléments métalliques migrent alors de manière plus ou moins passive, suivant les gradients électrochimiques, à travers les parois cellulaires par les pores du multiréseau pariétal constitué classiquement de microfibrilles de cellulose, d'hémicelluloses, de pectines et de glycoprotéines associées (voir Figure I.3).

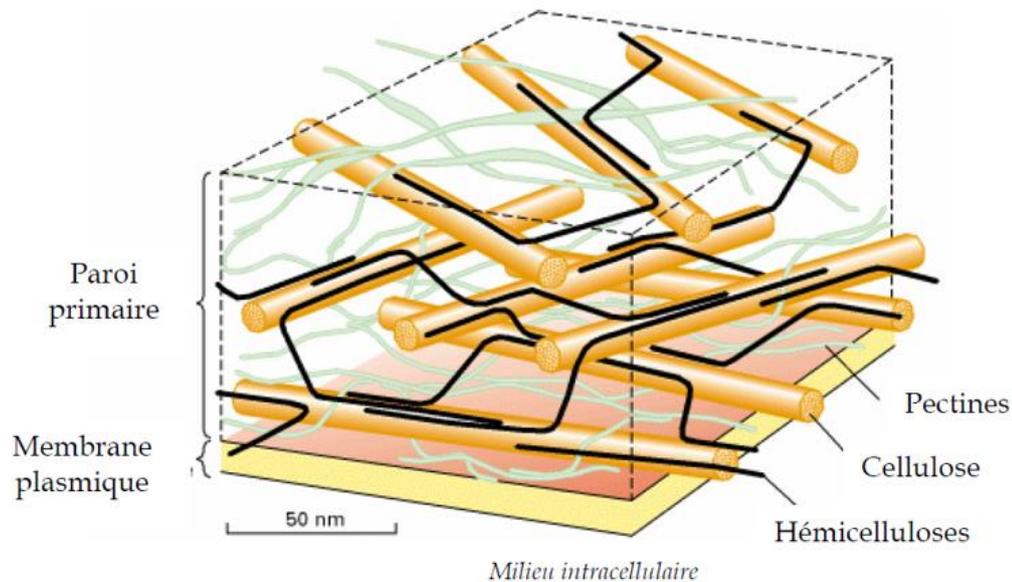


Figure I.3 : Schéma représentant les différents constituants des parois cellulaires végétales [59]

Le transport apoplasmique demeure possible jusqu'à l'endoderme, qui est représenté par une rangée de cellules formant le cadre ou la bande de Caspary. La paroi de ces cellules endodermiques est subérifiée, c'est-à-dire recouverte d'une substance lipidique imperméable (voir Figure I.2). À ce stade, pour que les éléments traces métalliques (ETM) puissent être dirigés vers les vaisseaux conducteurs de la sève brute (xylème) et distribués dans les différentes parties aériennes de la plante, leur transfert vers les autres organes nécessite un transport actif à l'intérieur des cellules racinaires.

Cette voie de transport n'est cependant pas à négliger, car elle peut jouer un rôle prépondérant pour certains cations métalliques qui ont du mal à pénétrer à l'intérieur des cellules ou qui présentent une forte liaison à des composés de la paroi (comme le plomb, par exemple [60]). Une partie des ions peut être adsorbée par les charges négatives des polymères pariétaux, notamment les acides polygalacturoniques des pectines, qui peuvent agir comme des échangeurs d'ions [61, 62].

Selon la voie symplasmique (voir Figure I.2), les éléments traces métalliques (ETM) semblent traverser la paroi, puis la membrane plasmique des cellules de l'endoderme, pour ensuite se déplacer de cellule en cellule par l'intermédiaire des plasmodesmes. Dans ce contexte, il s'agit d'une absorption effective des éléments traces par la cellule végétale, nécessitant l'intervention de canaux ou transporteurs membranaires [44]. Cependant, il est important de noter que la toxicité induite par une concentration élevée

d'ETM à l'extérieur de la cellule pourrait perturber la perméabilité sélective des membranes cellulaires, facilitant ainsi l'entrée des ions à l'intérieur des cellules [63].

#### **- Transport des ETM à travers les membranes biologiques**

En raison de leurs charges, les cations métalliques rencontrent des difficultés à traverser librement les membranes biologiques. Leur transport à l'intérieur des cellules nécessite l'intervention de canaux ou de transporteurs protéiques membranaires.

Deux mécanismes de transport sont représentés [44].

Absorption passive par diffusion à travers des canaux cationiques membranaires suivant le gradient électrochimique des ions. Cependant, ce mode de transport est rare et opère seulement lorsque les éléments traces métalliques (ETM) sont fortement concentrés dans le milieu extracellulaire. De plus, ces canaux présentent généralement une faible spécificité et peuvent transporter des ions indésirables, tels que le  $\text{Cd}^{2+}$ , qui pourrait rivaliser avec des cations essentiels comme le  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Ca}^{2+}$  [64, 65, 66].

Absorption active impliquant, par exemple, le fonctionnement d'une pompe à protons, avec l'excrétion d'ions  $\text{H}^+$  vers l'extérieur de la cellule lors de l'absorption de cations, maintenant ainsi le gradient électrochimique. Alternativement, il peut s'agir d'une absorption active à contre-courant du gradient électrochimique, impliquant des transporteurs permettant simultanément la sélection des ions absorbés.

Ces transporteurs se présentent sous différents types, généralement regroupés en familles qui semblent être largement répandues dans le règne végétal. La plupart de ces transporteurs, identifiés chez les plantes, sont exprimés au niveau des membranes plasmiques et/ou du tonoplaste (membrane vacuolaire), et sont donc impliqués dans la régulation de l'homéostasie des cations métalliques dans le cytoplasme et/ou dans leur séquestration vacuolaire (voir Tableau I.1).

Tableau I.1 : Exemples de transporteurs membranaires d'ETM identifiés chez les plantes

| Type de transporteur                        | Exemples  |
|---|---|
| Antiport cation/H <sup>+</sup> <sup>a</sup> | Chez <i>Arabidopsis thaliana</i> , des transporteurs Ca <sup>2+</sup> /H <sup>+</sup> pourraient également transporter le Cd <sup>2+</sup> et le Mn <sup>2+</sup> (Fox et Guerinot, 1998 ; Hirschi <i>et al.</i> , 2000)                                |
| CPx-ATPases <sup>b</sup>                    | Capture des ETM (Zn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> ), séquestration vacuolaire (Gravot <i>et al.</i> , 2004 ; Verret <i>et al.</i> , 2004 ; Williams et Mills, 2005) et translocation vers le xylème (Colangelo et Guerinot, 2006) |
| Nramp <sup>c</sup>                          | LeNramp1 et LeNramp3 - régulation de l'homéostasie du fer chez la tomate (Williams <i>et al.</i> , 2000 ; Berezcky <i>et al.</i> , 2003 ; Clemens, 2006)  |
| CDF <sup>d</sup>                            | Transport vacuolaire du zinc et du cadmium (Desbrosses-Fonrouge <i>et al.</i> , 2005 ; Colangelo et Guerinot, 2006)   |
| ZIP <sup>e</sup>                            | Capture cytoplasmique des ETM (Guerinot, 2000), principalement exprimées dans les cellules racinaires, comme LeIRT1 et LeIRT2 chez la tomate (Eckhardt <i>et al.</i> , 2001)  |
| ABC <sup>f</sup>                            | Transport vacuolaire du Cd <sup>2+</sup> et Zn <sup>2+</sup> (Theodoulou, 2000 ; Moons, 2003)   |
| LCT1 <sup>g</sup>                           | Capture des ions Ca <sup>2+</sup> et Cd <sup>2+</sup> chez le blé (Clemens <i>et al.</i> , 1998 ; Antosiewicz et Henning, 2004)   |

(a) : Protéines impliquées dans la régulation des concentrations cytosoliques en Ca<sup>2+</sup> et Na<sup>+</sup> et leur transport dans la vacuole (Hirschi, 2001 ; Gaxiola *et al.*, 2002).

(b) : ATPases possédant un motif intermembranaire Cystéine - Proline - x (x = cystéine, histidine ou sérine)

(c) : Natural resistance-associated macrophage proteins (famille de protéines impliquées dans le transport des cations divalents découvertes initialement chez les bactéries, les levures et les animaux.

(d) : Cation Diffusion Facilitator.

(e) : Zinc-regulated transporter (ZRP), Iron-regulated transporter (IRT)-like Proteins, transporteurs identifiés chez les plantes supérieures (Guerinot, 2000 ; Pence *et al.*, 2000).

(f) : ATP Binding Cassette (famille vaste et diversifiée de protéines membranaires retrouvée chez tous les êtres vivants (Mártonioia *et al.*, 2002).

(g) : Low-affinity Cation Transporter.

### I.1.2.2. Translocation et accumulation des ETM dans la plante

#### **- Transport xylème**

Bien que les éléments traces métalliques (ETM) soient généralement prélevés et transportés par voie apoplasmique dans les tissus périphériques racinaires, la translocation des ETM vers le xylème par cette même voie, suggérée par certains chercheurs [67, 68, 69], semble peu fréquente. Il est plus couramment admis que le transport vers le xylème s'effectue par la voie symplasmique.

En effet, pour atteindre les vaisseaux xylémiens des racines, les ETM doivent d'abord traverser les parois subérisées du cadre de Caspari, puis pénétrer dans le cytoplasme

des cellules endodermiques avant de pouvoir rejoindre le xylème [70]. Le transport des ions dans le xylème est généralement un processus très régulé, médié par des protéines de transport membranaires. Bien que la plupart des transporteurs xylémiens des ETM n'aient pas encore été identifiés, des études récentes réalisées chez *Arabidopsis thaliana* ont suggéré que le transporteur de type ATPase HMA4 jouerait un rôle dans la translocation du zinc [71, 72]. Il a également été proposé que la translocation du cadmium des racines vers le xylème utiliserait les mêmes transporteurs que ceux utilisés par le zinc [73].

La sève brute constitue le principal moyen de transport des éléments traces métalliques (ETM) des racines vers les parties aériennes. Leur ascension dans les vaisseaux de xylème résulte à la fois de la poussée radiculaire et de l'appel foliaire induit par la transpiration [74].

Le déplacement des éléments dans le xylème de la plante en direction des parties aériennes peut être facilité ou non par des agents complexants ou chélateurs, généralement des ligands organiques de petite taille tels que des acides organiques, des acides aminés, des peptides, des sucres ou des composés phénoliques [75, 46]. Par exemple, le zinc est généralement transporté sous forme complexée avec des acides organiques, tandis que le cadmium est transporté sous forme libre [41]. Les parois du xylème contiennent également des groupes chargés négativement, capables de lier les cations métalliques libres présents dans la sève brute, freinant voire bloquant leur progression [76].

### **- Transport phloémien**

Le transport des éléments traces métalliques (ETM) par la sève élaborée dans le phloème semble être moins facilité en raison du caractère vivant des cellules qui composent ce tissu. Cependant, des expériences ont révélé un transport restreint du cadmium (Cd) et du plomb (Pb) des feuilles vers les racines chez des plantes de fève. [77]. Le transport phloémien peut également s'opérer des feuilles vers les graines, comme observé pour le zinc au cours de la maturation du blé [78].

Certains chercheurs suggèrent que la nicotianamine (NA), dérivée de la méthionine et dotée de propriétés de complexation vis-à-vis des ETM (voir Figure I.4), pourrait agir en tant que médiateur du transport des métaux essentiels au métabolisme, tels que le zinc. Ce processus aiderait à prévenir leur précipitation dans la sève alcaline du phloème [75, 79, 80].

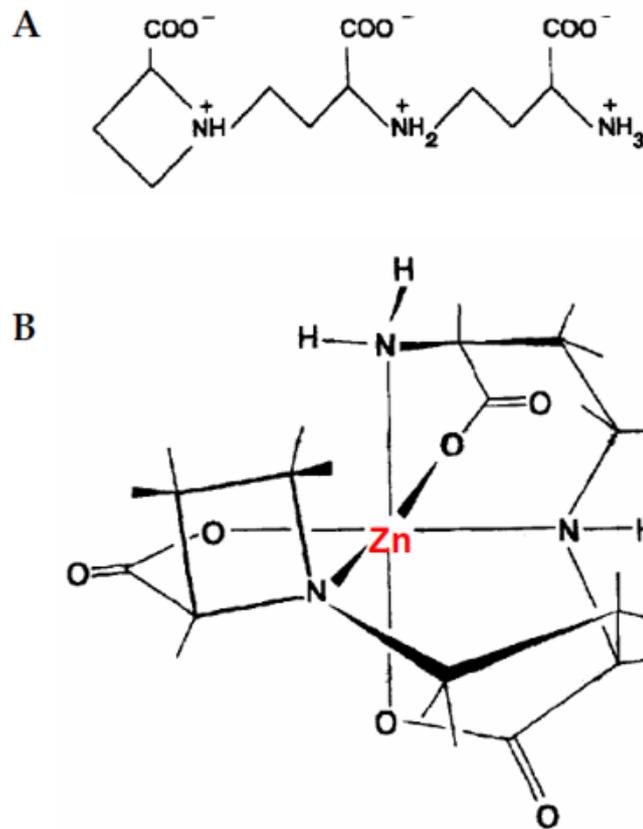


Figure I.4 : Exemple d'agent chélateur : la nicotianamine [77]

**A** : Formule plane de la molécule de NA, **B** : Configuration spatiale d'un complexe formé entre la nicotianamine et un ion  $Zn^{2+}$

#### - Accumulation dans les différents organes des plantes

De manière générale, les racines ont une propension à accumuler les éléments traces métalliques (ETM), les parties reproductrices (fleurs, fruits, graines) ont tendance à les exclure, et les parties végétatives (tiges et feuilles) sont considérées comme intermédiaires. Ainsi, la répartition des teneurs en ETM dans les plantes suit un gradient d'accumulation : racines > tiges > feuilles > graines et fruits.

Lors de leur prélèvement par la plante, les métaux ont tendance à se fixer largement sur les parois cellulaires, expliquant pourquoi une proportion significative des métaux prélevés peut se retrouver dans les racines, comme observé pour le plomb, le cadmium ou le zinc [81, 82].

Cependant, le processus de prélèvement et d'accumulation des ETM varie considérablement en fonction du génotype de la plante et en relation avec la concentration externe en ETM. Chez certaines espèces, la translocation des éléments traces est plus prononcée que chez d'autres, ce qui peut conduire à une véritable

accumulation des éléments métalliques dans les parties aériennes. Ces plantes sont alors qualifiées « d'accumulatrices » et présentent des quantités significatives d'ETM dans leurs tissus, même lorsque les concentrations externes sont faibles. Certaines de ces plantes peuvent être des accumulateurs spécifiques pour un élément donné, tandis que d'autres ont tendance à accumuler plusieurs éléments. Par exemple, *Arabis paniculata* est capable de stocker le zinc, le cadmium et le plomb [83].

Certaines plantes sont également catégorisées en tant qu'hyperaccumulatrices. Pour obtenir cette classification en tant qu'hyperaccumulateurs de cadmium (Cd), plomb (Pb) ou zinc (Zn), ces plantes doivent afficher des concentrations en ETM dans leur biomasse foliaire égales ou supérieures à celles spécifiées dans le Tableau 2. Ces plantes sont relativement rares, avec environ 450 espèces hyperaccumulatrices naturelles identifiées à ce jour. En général, elles présentent une production de biomasse relativement faible, car elles dirigent leur énergie vers des mécanismes de défense pour faire face aux concentrations élevées d'ETM dans leurs tissus [84, 85].

Tableau I.2 : Quelques exemples de plantes hyperaccumulatrices pour témoigner des niveaux seuils d'accumulation des ETM dans les feuilles [86]

| ETM | Concentration dans les feuilles (mg.g <sup>-1</sup> MS) | Plantes hyperaccumulatrices (références)  |
|-----|---|---|
| Cd  | ≥ 0,1   | <i>Thlaspi caerulescens</i> (Assunção et al., 2003)<br><i>Arabidopsis halleri</i> (Weber et al., 2004)<br><i>Solanum nigrum</i> (Wei et al., 2004)      |
| Pb  | ≥ 1   | <i>Sesbania drummondii</i> (Sahi et al., 2002)<br><i>Lemna minor</i> (McCutcheon et Schnoor, 2003)<br><i>Fagopyrum esculentum</i> (Tamura et al., 2005) |
| Zn  | ≥ 10  | <i>Thlaspi caerulescens</i> (Assunção et al., 2003)<br><i>Arabidopsis halleri</i> (Weber et al., 2004)<br><i>Sedum alfredii</i> (Yang et al., 2004)     |

Plusieurs théories ont été avancées pour expliquer le phénomène d'hyperaccumulation chez les plantes, suggérant qu'il pourrait conférer des avantages sélectifs à ces organismes [87] :

-Colonisation de sites spécifiques : Certains suggèrent que les plantes hyperaccumulatrices ont évolué pour coloniser des sites avec un profil géochimique particulier, tels que les sols calaminaires ou serpentiniques [88, 89, 90].

-Résistance à la sécheresse : Bien que cette hypothèse n'ait pas été confirmée pour toutes les plantes hyperaccumulatrices, certaines études ont suggéré que cette capacité pourrait être liée à une meilleure résistance à la sécheresse [91].

-Élimination des ETM par la chute des feuilles : Certains pensent que les plantes hyperaccumulatrices pourraient éliminer les éléments toxiques de leur organisme en laissant tomber des feuilles chargées en éléments [92].

-Hypothèse allélopathique (empoisonnement) : Chez certaines espèces pérennes, l'hypothèse est que la chute des feuilles chargées en ETM pourrait conférer un avantage dans la compétition interspécifique en formant une litière riche en éléments traces, inhibant ainsi le développement d'espèces moins tolérantes aux ETM [92].

-Défense contre les herbivores ou pathogènes : Bien que controversée, cette hypothèse suggère que l'hyperaccumulation pourrait servir de mécanisme de défense contre certains herbivores ou pathogènes [93, 94, 95].

## 1.2. Phytotoxicité des éléments traces et tolérance des plantes

Certains métaux tels que le zinc sont considérés comme des oligo-éléments essentiels pour le fonctionnement optimal des organismes végétaux [96]. Le zinc joue un rôle crucial dans la structure de diverses protéines, telles que les protéines à doigts de zinc et les métallothionéines. De plus, il agit en tant que cofacteur pour de nombreuses enzymes, notamment les anhydrases, déshydrogénases, peroxydases et superoxydes dismutases [97, 98]. Par ailleurs, le zinc est impliqué dans des processus vitaux tels que le métabolisme azoté, la multiplication cellulaire, la photosynthèse, la synthèse d'auxine, ainsi que dans le métabolisme des acides nucléiques [97, 98, 99]. Cependant, à des concentrations élevées, les ions  $Zn^{2+}$  peuvent entraîner une toxicité similaire à celle observée pour d'autres métaux tels que le cadmium et le plomb, qui n'ont pas de rôle connu dans le métabolisme végétal. Un excès de métal est généralement interprété par les plantes comme un facteur de stress, induisant des modifications dans leurs réponses physiologiques [60, 66, 75, 100].

## I.2.1. Phytotoxicité des ETM

### I.2.1.1. Conséquences sur la croissance des plantes

Il est largement démontré que les ETM affectent de nombreux processus morphologiques, physiologiques et biochimiques chez les plantes. La réduction de croissance est une des réponses les plus fréquentes et la première observable lorsque des plantes sont soumises à un stress. [32, 101, 102] Ce sont les organes qui sont directement en contact avec les substances toxiques, par conséquent, les racines des plantes se développant sur des sols contaminés, qui présentent rapidement des modifications détectables de leurs paramètres de croissance [103].

La croissance est un processus commun à tous les organismes vivants. Au niveau cellulaire, les composants de la croissance sont la division, l'élongation cellulaire et la production de diverses substances cellulaires. L'augmentation de la biomasse ne résulte donc pas uniquement de l'augmentation de taille de l'organisme considéré. Parmi les effets des éléments traces sur la croissance des végétaux, on peut distinguer ceux intervenant directement sur la production de biomasse et ceux agissant sur l'allocation de la biomasse, avec des conséquences sur la taille ou la forme des cellules. La croissance proprement dite est en relation avec les aspects quantitatifs du développement alors que la différenciation est en relation avec les changements qualitatifs qui apparaissent au cours de la formation des cellules, des tissus ou des organes [104] et qui se déterminent, les uns par des mesures de longueur et les autres par le dénombrement des organes considérés. La réduction de croissance sensu stricto peut résulter d'une inhibition de la division cellulaire, d'une diminution de l'élongation cellulaire ou de ces deux processus simultanés [105]. Le statut hydrique, et plus particulièrement la pression de turgescence, c'est-à-dire la force exercée sur les parois par l'eau vacuolaire, est considéré comme le principal élément contrôlant le taux d'élongation cellulaire.

Il est démontré que l'exposition aux ETM peut conduire à une restriction de la nutrition minérale et à une modification du statut hydrique [106,107], généralement par une diminution du taux d'hydratation des cellules qui conduit à une diminution de la turgescence.

Dans ce processus d'inhibition de l'élongation cellulaire, l'impact des ETM sur les propriétés physiques des parois cellulaires peut également être mis en cause puisqu'il

a déjà été démontré que la toxicité des métaux peut induire une inhibition de l'extensibilité pariétale [107].

Certains auteurs estiment que la fixation des ETM par les molécules de la paroi pourrait contribuer à la diminution de leur extensibilité [108].

Le contact des plantes avec des éléments traces métalliques (ETM) peut entraîner diverses conséquences biologiques qui inhibent leur croissance. Ces effets peuvent inclure la perturbation de l'activité d'enzymes cruciales impliquées dans des processus physiologiques essentiels au développement, tels que la photosynthèse et la respiration. De plus, l'exposition aux ETM peut induire un stress oxydatif, conduisant éventuellement à la mort cellulaire [100, 109, 110].

#### 1.2.1.2. Le stress oxydatif

##### **- Nature des espèces réactives de l'oxygène (ROS)**

Les plantes, dans le cadre de leur métabolisme aérobie, utilisent l'oxygène pour générer l'énergie nécessaire à leur croissance et à leur développement. Cependant, la réduction de l'oxygène par les cytochromes de la chaîne respiratoire entraîne la production inévitable de radicaux oxygénés. Lorsque cette réduction est incomplète, elle engendre la formation de molécules hautement réactives dérivées de l'oxygène, connues sous le nom de ROS (Reactive Oxygen Species). Ces ROS comprennent des radicaux libres tels que le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical perhydroxyle ( $HO_2^{\cdot}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), le radical peroxyde ( $RO_2^{\cdot}$ ), et le radical alcoxyle ( $RO^{\cdot}$ ), ainsi que des formes non radicalaires telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). En parallèle, les chaînes de transfert d'électrons au niveau de l'appareil photosynthétique sont également capables de produire une grande quantité de ROS [111, 112, 113].

##### **- Conditions de production des ROS**

Bien que les ROS soient générés dans le cadre du métabolisme normal de la plante, leur concentration intracellulaire accrue est souvent associée à un état de stress. En effet, divers stress tels que la sécheresse, la salinité, les chocs thermiques, les attaques de pathogènes, l'exposition aux UV, les polluants atmosphériques, ainsi que les éléments traces métalliques (ETM), sont capables de stimuler une production augmentée de ROS [22, 114, 115].

Si la contribution de la mitochondrie à la production de ROS lors de la réponse au stress est encore mal définie [116], dans la plupart des situations où les conditions environnementales sont modifiées, une forte augmentation des ROS est observée au niveau des chloroplastes et des peroxyssomes (Figure I.5) [114, 117, 118, 119].

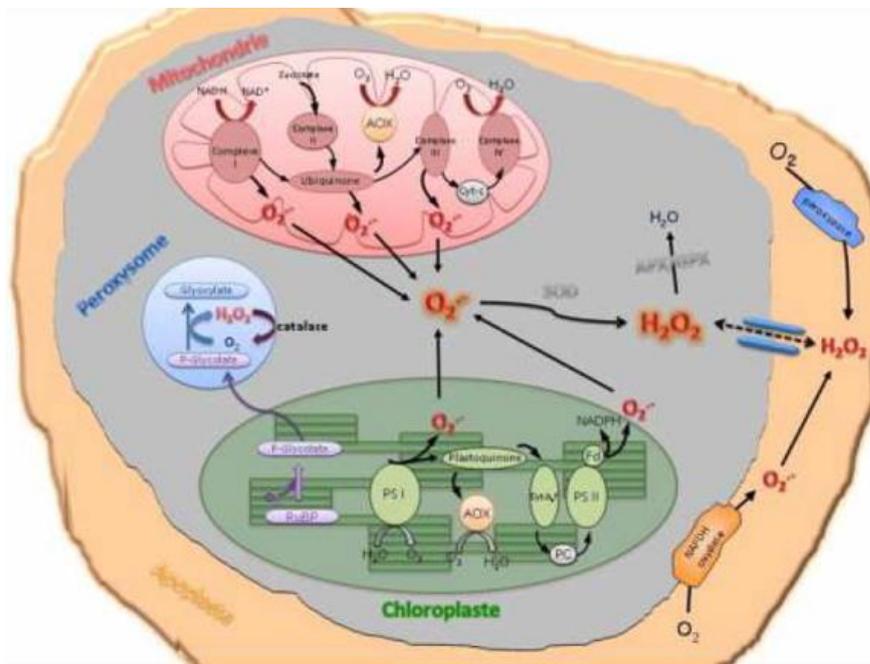


Figure I.5 : Sites de production subcellulaires des formes réactives de l'oxygène (ROS) dans une cellule végétale [113].

AOX : oxydase alternative ; APX : ascorbate peroxydase ; cyt : cytochrome ; PC : plastocyanine ; Fd : ferrédoxine ; GPX : glutathion peroxydase ; NAD(P) (+/H) : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) (oxydé/réduit) ; PS I (II) : photosystème I (II) ; RuBP : ribulose 1,5-bisphosphate ; SOD : superoxyde dismutase.

Lors de la réaction à un stress d'origine biotique, la production de radicaux oxygénés est généralement associée à un complexe NADPH-oxydase lié à la membrane plasmique [120, 116]. Toutefois, en raison de la diversité des types de stress, divers mécanismes de production de ROS sont mobilisés, parmi lesquels les amines oxydases ou les peroxydases jouent probablement un rôle significatif [121].

Les espèces réactives de l'oxygène agissent comme des agents oxydants puissants capables de perturber diverses cibles biologiques essentielles. Cela se traduit par des altérations au niveau des domaines fonctionnels des biomolécules, engendrant des effets tels que l'inhibition de l'activité enzymatique, la perturbation des processus métaboliques végétaux (notamment la photosynthèse et la respiration), l'oxydation des protéines, la détérioration des membranes cellulaires via l'induction de la peroxydation

lipidique, et la formation de cassures dans l'ADN, potentiellement conduisant à la mort cellulaire (Figure I.6) [122, 123].

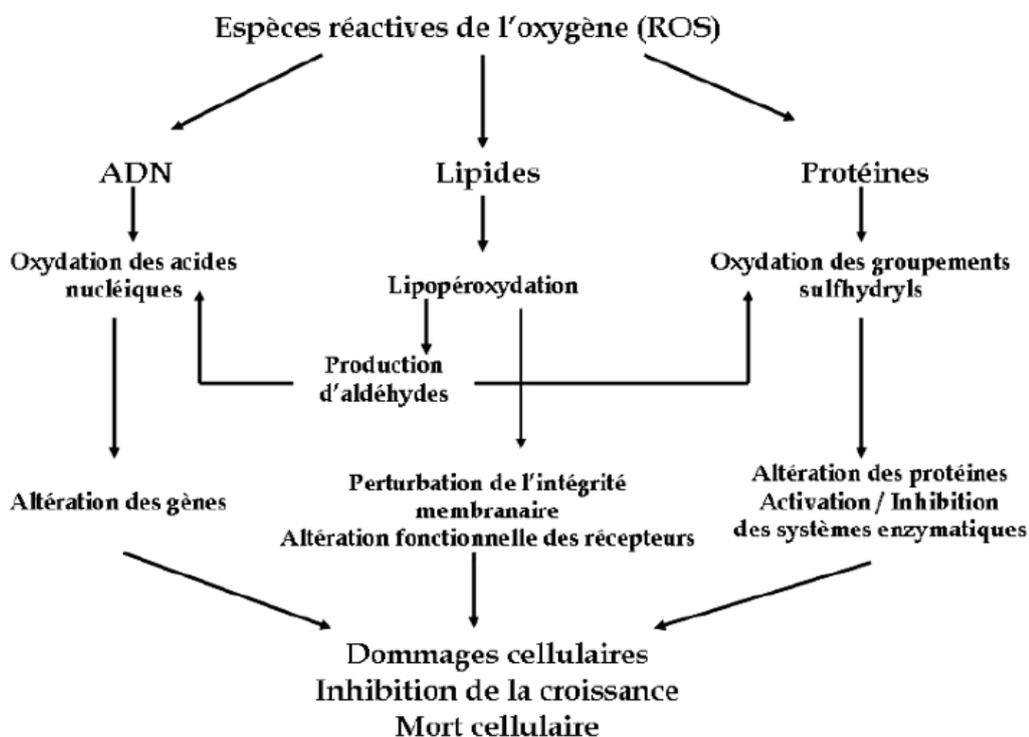


Figure I.6 : Principaux dommages cellulaires induits par les espèces réactives de l'oxygène et provoqués sur les lipides, les protéines et l'ADN [120].

Pour ces raisons, bien que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) soient généralement considérées comme des molécules phytotoxiques, il est maintenant reconnu qu'elles jouent un rôle essentiel dans la régulation des processus cellulaires, aussi bien pour la survie que pour la mort cellulaire. Les ROS peuvent agir en tant que molécules de signalisation cellulaire, déclenchant la mise en place de mécanismes de défense en réponse à divers stress, qu'ils soient d'origine biotique ou abiotique [114]. De nombreuses études ont démontré le rôle des ROS dans les cascades de signalisation responsables de l'induction et de la régulation de gènes de défense tels que les protéines de choc thermique (HSP = Heat Shock Proteins), les enzymes antioxydantes, ainsi que dans le renforcement des parois cellulaires lors de l'attaque par un pathogène, par exemple, via des processus de lignification [124].

Le rôle direct des ETM dans la formation des ROS peut être relié à leur capacité à exister sous différents états d'oxydation. En effet, certains cations (comme le fer, le cuivre, le manganèse ou le plomb) sont capables de céder un ou plusieurs électrons

susceptibles de réduire l'oxygène et ses dérivés. Cependant, les métaux qui n'existent que sous un seul état d'oxydation, comme le cadmium et le zinc peuvent induire une accumulation de ROS en perturbant certaines voies métaboliques ou en inactivant des enzymes du système anti-oxydant, contribuant ainsi à l'épuisement de la réserve cellulaire de molécules anti-oxydantes [109].

## I.2.2. Mécanismes de tolérance

### I.2.2.1. Système anti-oxydatif

Pour se défendre contre les effets néfastes des espèces réactives de l'oxygène (ROS), les organismes végétaux ont mis en place des mécanismes de défense. Trois activités enzymatiques essentielles jouent un rôle central dans les processus de détoxification des ROS : les superoxydes dismutases (SOD), les catalases (CAT) et les peroxydases (POD). Ces enzymes agissent de manière complémentaire sur la cascade radicalaire impliquant l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  et le peroxyde d'hydrogène, aboutissant ultimement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Figure I.7).

L'anion superoxyde, bien que de courte durée de vie (quelques secondes), peut se diffuser au-delà de son lieu de production pour atteindre diverses cibles. Les superoxydes dismutases (MnSOD mitochondriale, FeSOD chloroplastique et Cu/ZnSOD cytoplasmique) interviennent pour éliminer ce radical, catalysant sa dismutation en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Les cofacteurs métalliques (M) associés aux SOD jouent un rôle clé dans ce processus par un mécanisme d'oxydo-réduction cyclique.

En tant qu'enzymes présentes dans la plupart des compartiments cellulaires, les SOD sont cruciales pour la défense contre le stress oxydatif. Le  $H_2O_2$ , bien que non un radical libre, est un intermédiaire réduit toxique qui possède une durée de vie relativement longue (quelques minutes). Il peut se diffuser loin de son site de production en traversant les membranes grâce à des canaux aqueux (aquaporines) en raison de sa similitude chimique avec  $H_2O$ . La toxicité du  $H_2O_2$  est principalement associée à sa capacité à générer le radical hydroxyle OH, très délétère pour les constituants cellulaires, bien que sa durée de vie soit très courte (de l'ordre de la microseconde) (voir Figure I.7).

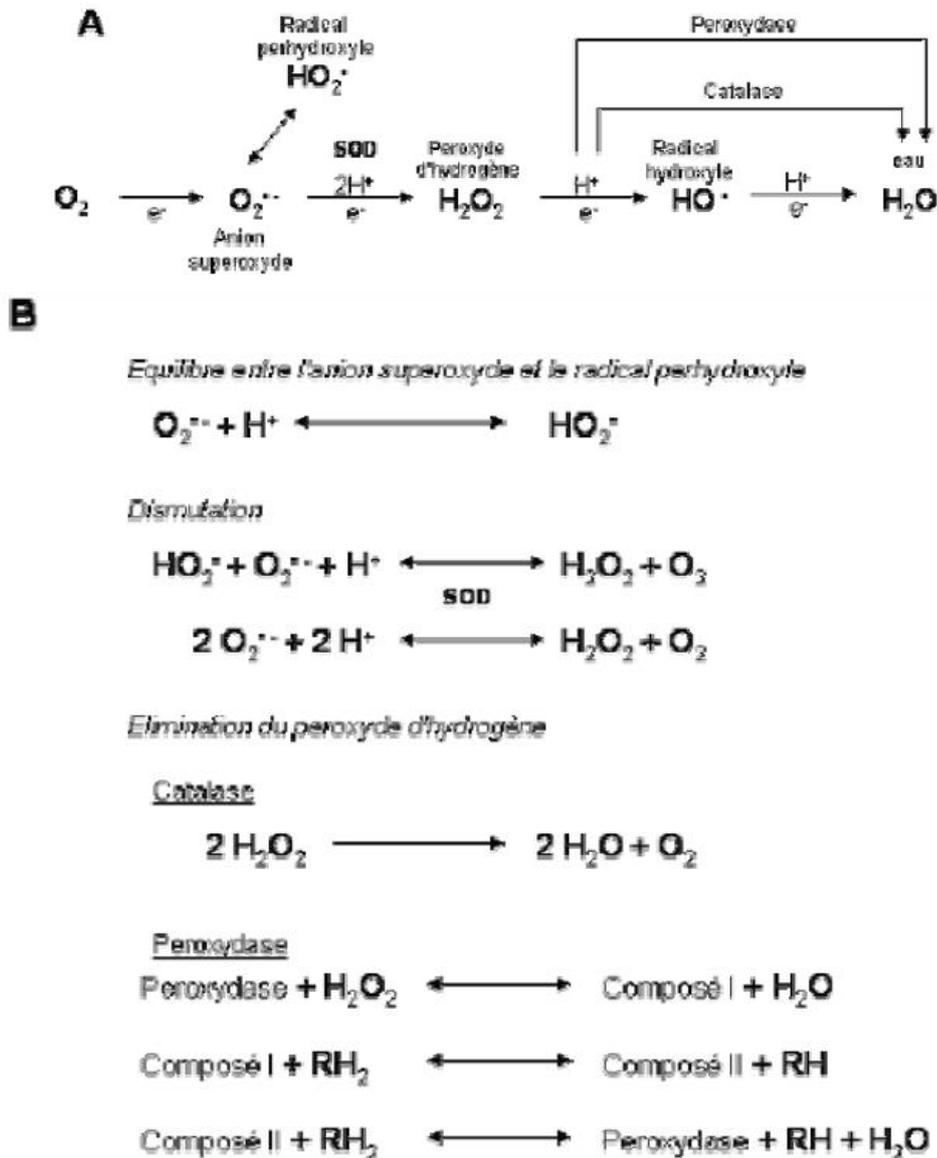


Figure I.7 : Mode d'action des principales activités enzymatiques intervenant dans le catabolisme des formes réactives de l'oxygène [125].

A : Schéma général ; B : Principales équations chimiques

La concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$  est régulée par des enzymes telles que les peroxydases (POD) et les catalases (CAT) pour protéger les cellules des effets nocifs du peroxyde d'hydrogène [126]. Les catalases, présentes dans les peroxysomes et le cytosol, agissent en synergie avec les SOD en catalysant la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène (voir Figure I.7). Contrairement aux CAT, les POD requièrent de l'énergie (NAD(P)H) et la présence d'un substrat spécifique (cofacteur) pour exercer leurs activités, notamment l'ascorbate (Asc) et le glutathion (GSH). Les peroxydases catalysent l'oxydoréduction entre le peroxyde d'hydrogène et la molécule réductrice associée à l'enzyme (voir Figure I.7).

Plus précisément, les substrats utilisés par les peroxydases participent au cycle ascorbate-glutathion [22, 127]. La première étape implique la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau, associée à l'oxydation de l'ascorbate en monodéhydroascorbate (MDA), catalysée par l'ascorbate peroxydase (APX). Pour permettre la poursuite de cette réaction, l'ascorbate oxydé doit être réduit à nouveau. Deux voies de régénération de l'ascorbate coexistent : la réduction directe du MDA par la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) via l'oxydation d'une molécule de NAD(P)H. Cependant, le MDA est instable et a tendance à se dismuter spontanément en déhydroascorbate (DHA) et ascorbate. La seconde voie de régénération de l'ascorbate consiste en la réduction du DHA par la déhydroascorbate réductase (DHAR), couplée à l'oxydation du GSH. Enfin, le glutathion oxydé est régénéré en GSH grâce à la glutathion réductase (GR) (Figure I.8).

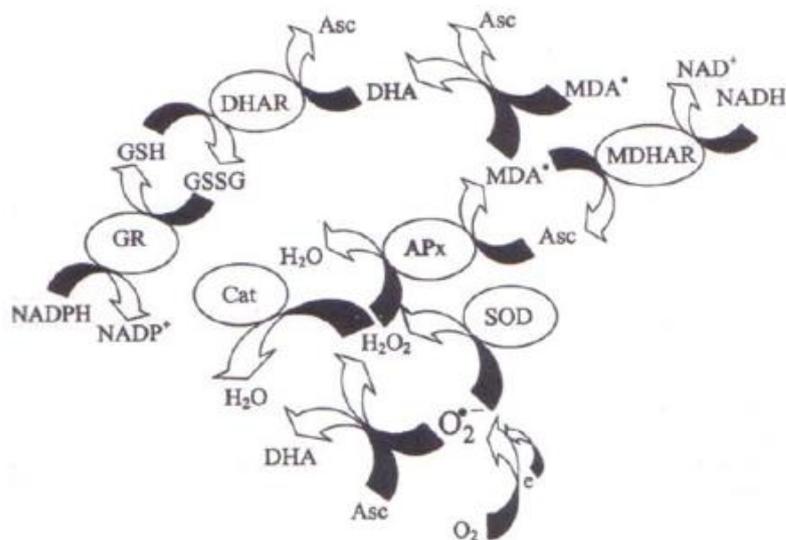


Figure I.8 : Fonctionnement coordonné de divers anti-oxydants chez les plantes [128].

APx: ascorbate peroxydase; Cat: catalase; SOD: superoxyde dismutase; MDHAR: monodéhydroascorbate réductase; DHAR: déhydroascorbate réductase; GR: glutathion réductase; Asc: ascorbate; MDA•: radical monodéhydroascorbate; GSH: glutathion; GSSG: glutathion oxydé.

Une autre classe de composés antioxydants non enzymatiques comprend des molécules telles que les pigments caroténoïdes, certains acides aminés tels que la cystéine, l'hydroxyquinone, l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E), et certains flavonoïdes tels que les anthocyanines [129, 130]. Lorsque ces systèmes de détoxication, qu'ils soient

enzymatiques ou non enzymatiques, sont dépassés, une accumulation de ROS se produit dans les cellules. Cette perturbation de l'équilibre entre les ROS et le système antioxydant définit une situation de stress oxydatif pour l'organisme [131]. Pour éviter ces inconvénients, d'autres mécanismes de stockage ou de détoxification des métaux accumulés ont été développés et sélectionnés par certains végétaux.

#### 1.2.2.2. Autres mécanismes de tolérance

##### **- Chélation et complexation des ETM**

La détoxification des ions métalliques à l'intérieur des cellules repose actuellement sur la présence de ligands organiques, assurant la complexation de nombreux ions métalliques et constituant ainsi un aspect fondamental de la résistance aux ETM. Chez les végétaux, les ligands intracellulaires principaux sont représentés soit par des peptides chélateurs, soit par des petites molécules amphotères capables de former des complexes stables avec les métaux.

Les métallothionéines (MT) sont des protéines caractérisées par leur abondance en cations métalliques, principalement Cuivre (Cu) et/ou Zinc (Zn), et par leur forte proportion de résidus cystéines. Elles sont présentes de manière ubiquitaire chez les organismes vivants [132]. De nombreuses observations suggèrent qu'elles pourraient jouer un rôle dans divers mécanismes de tolérance face à différents ETM [133,134]. Cependant, la synthèse de MT ne semble pas être une réponse spécifique, car ces protéines s'accumulent également en réponse à d'autres stress, tels que les chocs thermiques. Ainsi, la présence généralisée des métallothionéines dans le règne vivant et leur synthèse dans diverses situations laissent penser que ces protéines sont impliquées dans la régulation globale de l'homéostasie cellulaire plutôt que dans des réponses spécifiques aux ETM [135].

Les phytochélatines (PCs) constituent un autre ensemble de chélateurs intracellulaires exclusivement présents chez les plantes. De nature peptidique, ces molécules appartiennent à une famille étroitement liée aux métallothionéines (MT), avec lesquelles elles partagent des similitudes marquées tant au niveau de leur structure (riche en cystéine) que de leur fonction (Figure I.9).

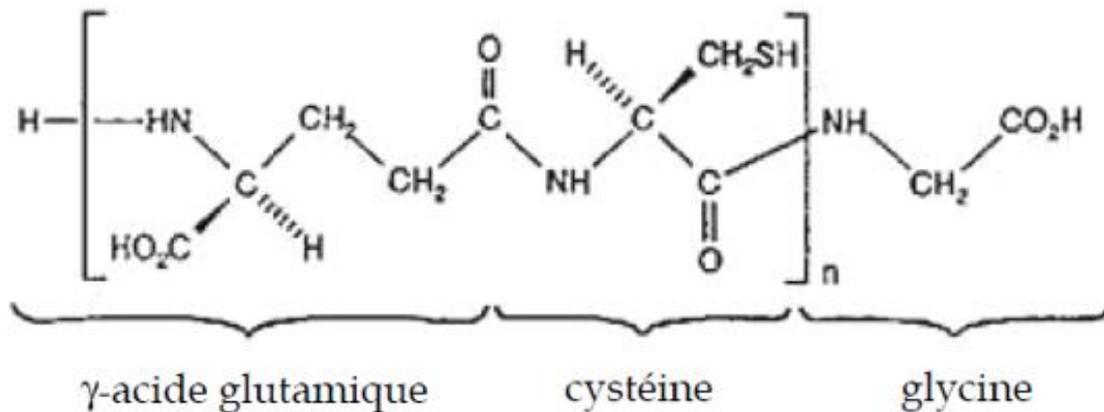


Figure I.9 : Structure d'une phytochélatine n=2 à 11 [119].

Les phytochélatines (PCs) sont produites à partir du glutathion par l'action de la phytochélatine synthase, et leur synthèse est stimulée en présence d'éléments traces métalliques (ETM) [135, 136, 137]. La formation de complexes entre les PCs et les métaux contribue à réduire la phytotoxicité des ions métalliques en diminuant leur concentration libre dans le cytoplasme [138].

L'argument principal en faveur de l'implication des PCs dans la tolérance aux ETM provient de leur induction et de leurs accumulations observées dans une variété étendue de plantes en réponse au cadmium et à d'autres métaux [66, 135, 139]. Des études telles que celles de Gupta et Goldsbrough [140], ont démontré que les cellules de tomate sélectionnées pour leur tolérance au cadmium présentaient des niveaux significativement plus élevés de PCs par rapport aux cellules sensibles.

Les acides organiques constituent un autre ensemble de chélateurs naturels, regroupant des molécules variées telles que les acides dicarboxyliques (acides fumarique, malique, oxalique) ou les acides tricarboxyliques (comme l'acide citrique). Ces molécules sont clairement associées aux phénomènes d'hyperaccumulation. [141, 142] Leur synthèse est souvent stimulée en présence d'éléments traces métalliques (ETM). Des observations ont montré de manière convaincante que, dans certains cas au moins, les acides organiques pourraient jouer un rôle direct dans les mécanismes de tolérance [133]. En dernier lieu, les acides aminés libres tels que la proline, l'histidine et la cystéine s'accumulent en réponse à un stress métallique et pourraient également participer à la chélation de divers métaux lourds [62, 75].

### **- La compartimentation vacuolaire**

L'une des explications couramment avancées pour expliquer le phénomène de tolérance repose sur une compartimentation accrue des éléments traces métalliques (ETM) sous forme ionique dans la vacuole, facilitée par divers transporteurs protéiques. Par exemple, chez un écotype tolérant au zinc de *Silene vulgaris*, un transporteur tonoplastique appartenant à la famille des protéines G a été identifié. Ce transport de zinc sous forme ionique vers les vacuoles dépend de la présence de magnésium et de GTP, permettant ainsi une détoxification plus rapide du zinc par rapport à l'écotype sensible [143].

Dans les cellules de *Rauvolfia serpentina* cultivées en suspension, le cadmium (Cd) réagit avec les phytochélatines pour former des complexes de faible masse moléculaire. Ces complexes s'agglomèrent ensuite par des ponts disulfures, donnant lieu à des structures de masse moléculaire élevée. Un complexe protéique spécifique facilite ensuite leur transport vers la vacuole. À l'intérieur de la vacuole, le pH provoque la dissociation du complexe, et les ions sont capturés par des acides organiques tels que le malate, le citrate ou l'oxalate [109].

### **-Autres systèmes de défense au stress métallique**

D'autres mécanismes de protection contre les effets nocifs des éléments traces métalliques (ETM) peuvent être mentionnés :

Certains transporteurs localisés à la membrane plasmique assurent un efflux actif des ions métalliques hors des cellules. Bien qu'ils contribuent généralement au contrôle de l'homéostasie cellulaire, certains d'entre eux, appartenant aux familles CPx-ATPase et CDF, semblent jouer un rôle clair dans les mécanismes de tolérance aux métaux [62]. Les protéines de choc thermique (HSP), initialement connues pour leur rôle lors de stress thermiques, pourraient également être impliquées dans la tolérance aux éléments traces toxiques [62, 144, 145]. En effet, divers stress capables de dénaturer les protéines peuvent déclencher la réponse de type « choc thermique ». L'induction des protéines de choc thermique (HSP) permet à la cellule de réparer les dommages protéiques en favorisant la redissolution des agrégats, la renaturation des polypeptides, ou, le cas échéant, l'acheminement des protéines dénaturées vers les voies de dégradation.

Des études sur des cellules de tomate ont démontré que la présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induit la synthèse de protéines de choc thermique [146]. De manière similaire, des quantités significatives d'HSP<sub>70</sub> ont été observées dans les cellules de *Lycopersicon peruvianum* exposées à 1 mM de cadmium. Ces HSP<sub>70</sub> étaient localisées au niveau du plasmalemme, de la membrane mitochondriale et du réticulum endoplasmique, sites où surviennent de multiples dégâts dus au stress oxydant provoqué par les éléments traces métalliques [147].

## II. PRÉSENTATION DE LA PLANTE ETUDIÉE

### II.1. Généralités sur le genre *Atriplex*

Le genre *Atriplex*, le plus vaste et diversifié de la famille des Chenopodiaceae, compte environ 400 espèces réparties dans les régions tempérées, sub-tropicales, ainsi que dans les zones arides et semi-arides du monde. Il trouve une grande diversité en Australie, où de nombreuses espèces et sous-espèces sont identifiées. Dans le bassin méditerranéen, le genre *Atriplex* englobe 48 espèces et sous-espèces [148].

Bien que présent en nombre limité dans les régions polaires, ce genre est généralement associé aux sols salins, alcalins, ainsi qu'aux environnements arides, désertiques, ou semi-désertiques [149]. Les membres du genre *Atriplex* sont principalement des plantes herbacées vivaces, bien que quelques arbres et arbustes en fassent également partie. Ces plantes halophytes sont pourvues de caractéristiques écologiques et physiologiques permettant leur croissance et reproduction dans des environnements riches en sels inorganiques. Elles sont souvent des composants dominants des marécages salés, et en raison de la prévalence des sols salins dans les milieux arides, de nombreuses espèces présentent des adaptations xérophytiques.

La morphologie de la fleur, entourée de deux bractéoles généralement foliacées, est souvent cruciale pour l'identification des espèces, en fonction de leur forme et de leur éventuelle soudure. Les espèces d'*Atriplex* se distinguent par leur forte tolérance à l'aridité et à la salinité, ainsi que par leur capacité à fournir des fourrages riches en protéines et en carotène. De plus, elles produisent une biomasse foliaire abondante et la maintiennent active pendant les périodes défavorables de l'année.

Le genre *Atriplex* appartient au groupe de plantes capables de fixer le CO<sub>2</sub> par biosynthèse C<sub>4</sub>. Des études ont montré que ces plantes sont caractérisées par une

grande productivité, une résistance au déficit hydrique, une utilisation efficace de l'énergie lumineuse, et un métabolisme nécessitant du sodium comme élément essentiel. La plupart des espèces d'*Atriplex* sont dioïques, bien que des arbustes monoïques existent également [149].

## II.2. Description et systématique de l'espèce

Selon Chadehaut et Emberger [150], *Atriplex halimus* L. est classée comme suit :

Règne Végétal

Embranchement : Spermaphytes (Phanérogames)

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Apétales

Ordre : Centrospermales

Famille : Amaranthaceae (Chenopodiaceae)

Genre : *Atriplex*

Espèce : *A. halimus* L. (Noms usuels : Guetaf, Salt bush méditerranéen, Arroche, Pourpier de mer)

L'*Atriplex halimus* L., originaire d'Afrique du Nord est très répandue dans cette région, se trouve également dans les zones côtières méditerranéennes de l'Europe et dans les terres intérieures gypso-salines d'Espagne. Cet arbuste, mesurant entre 1 et 3 mètres de hauteur, est fortement ramifié, formant des touffes pouvant atteindre un diamètre de 1 à 3 mètres. Les feuilles, alternes et pétiolées, sont charnues, luisantes, et recouvertes de poils vésiculeux blanchâtres appelés trichomes. Elles sont ovales, assez grandes, mesurant de 2 à 5 cm de longueur et 0,5 à 1 cm de largeur (voir Figure I.10).



Figure I.10 : Aspect général d'*Atriplex halimus* [151]  
 A : Arbuste d'*Atriplex halimus* ; B : Rameau feuillu avec inflorescence et fruit

L'inflorescence, de type monoïque, se présente sous la forme d'une panicule d'épis terminale et nue. Les inflorescences comportent souvent des fleurs mâles au sommet et des fleurs femelles à la base. La floraison et la fructification s'étendent de mai à décembre. La valve fructifère est coriace à la base, et la graine présente une teinte roussâtre [152, 153]. Cette espèce, très polymorphe, démontre une grande adaptabilité à divers habitats, probablement due à la diversité des environnements qu'elle occupe [149]. Le système racinaire pivotant de l'*Atriplex halimus* présente un développement important pouvant atteindre jusqu'à 10 mètres de profondeur [154]. Deux sous-espèces distinctes de l'*Atriplex halimus* ont été identifiées, différenciées par leur morphologie (densité de feuillage et longueur des rameaux florifères) et leur niche écologique : *Atriplex halimus* L. subsp. *halimus* et *Atriplex halimus* L. subsp. *schweinfurthii* Boiss.

De nombreuses populations de cette espèce, souvent associées à d'autres espèces halophytes telles que *Suaeda* sp. et *Salsola* sp., sont réparties dans les zones salées d'Algérie, notamment les Chotts Hodna, Skhouna, Melghigh, Zehrez chergui et gherbi [155].

### II. 3. Résistance d'*A. halimus* aux différents stress

*Atriplex halimus*, endémique des régions méditerranéennes arides et semi-arides, démontre une résistance remarquable à divers stress environnementaux, notamment la salinité [156, 157] la sécheresse [158] et les métaux lourds [159, 160, 161, 162].

#### II.3.1. Résistance à la sécheresse

*A. halimus* sont généralement efficaces dans leur utilisation de l'eau et donc adaptée aux climats secs, elle possède des racines très longues qui lui permettent l'absorption de l'eau des horizons profonds (jusqu'à 5 m) [163].

#### II.3.2. Résistance a la salinité

*A. halimus* accumule les principaux ions de la salinité dans ses tissus en les stockant dans les vacuoles [164]. Elle est particulièrement bien adaptée aux régions arides affectées par la salinité [157].

#### II.3.3. Résistance aux métaux lourds

Dans la culture hydroponique ou dans des boîtes de Pétri [165, 166.] Cette espèce est capable de tolérer de fortes concentrations de Cd, Cu, Mn, Ni, Pb et Zn. Les mécanismes de tolérance au Cd peut se traduit par une précipitation de ce métal avec de l'oxalate dans la tige [159]. Ou son excrétion dans les poils vésiculaires [161].

### II.4. Utilisation des *Atriplex* en phytoremédiation

Les données relatives à *Atriplex halimus* sont lacunaires [167], et dans son milieu naturel, cette espèce est confrontée à divers stress [168] Plusieurs recherches récentes ont mis en lumière le caractère bénéfique de l'espèce, démontrant sa capacité remarquable à absorber certains cations métalliques tels que le cadmium (Cd), zinc (Zn), plomb (Pb), [159, 169, 170, 171], fer (Fe), manganèse (Mn) et aluminium (Al) [172, 173]. Certaines espèces d'*Atriplex* accumulent également du molybdène (Mo) [173, 174] et du sélénium (Se) en quantités importantes. Dans ce dernier cas, la plante pourrait même favoriser la volatilisation du sélénium [169].

*Atriplex halimus* est utilisé pour la phytoremédiation des terrains contaminés par des métaux lourds, bien que la population testée montre une sensibilité particulière au cuivre (Cu) [171, 175]. Dans la plupart des cas, les espèces du genre *Atriplex* sont évaluées en vue de la phytostabilisation plutôt que dans le but de la phytoextraction [176]. La phytoextraction, qui implique l'utilisation des plantes pour éliminer les

polluants de l'environnement, a été suggérée comme une alternative prometteuse pour la décontamination de vastes zones [159]. Des études récentes indiquent que les halophytes peuvent être utiles pour la phytoremédiation des sols salés contaminés [177, 178, 179]. Ceci est particulièrement évident dans le cas de l'espèce américaine *Atriplex canescens*, qui favorise la stabilisation des éléments tels que le baryum (Ba), le chrome (Cr) et le nickel (Ni) dans les horizons superficiels du sol [176]. La résistance aux métaux lourds dans cette espèce peut être liée à la précipitation du cadmium dans des cristaux d'oxalate dans les tiges. Il en découle que le saltbush méditerranéen, capable de produire jusqu'à 5 tonnes de matière sèche par hectare annuellement, pourrait être une espèce très efficace pour la phytoextraction [159].

Diverses études récentes suggèrent que les halophytes pourraient être avantageuses pour la phytoremédiation des sols salés pollués [177, 178, 179]. La comparaison de la salinité des sols avant et après l'expérimentation a également démontré la capacité des halophytes à extraire une quantité significative de sel [180]. Chez les espèces du genre *Atriplex*, il y a une translocation préférentielle des ions  $\text{Na}^+$  vers les parties aériennes [181], le sel qui pénètre dans la plante est stocké dans des sacs cellulaires situés sur les surfaces foliaires, qui sont ensuite excrétés par l'éclatement de ces cellules [182].

Mandak [183], a démontré que certaines espèces halophytes facultatives du genre *Atriplex* se sont propagées de manière non contrôlée en Europe le long des axes routiers où d'importantes quantités de sels ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ) sont utilisées en hiver. Cependant, quel que soit le procédé appliqué sur le site contaminé, il est essentiel de déterminer au préalable le potentiel invasif de l'espèce utilisée [184].

### III. Les stimulants biologiques

En raison de la demande croissante en faveur de la durabilité dans l'agriculture, il devient impératif d'opter pour des engrais naturels ou biologiques afin de remplacer les engrais synthétiques [185, 186]. L'utilisation d'intrants chimiques dans l'agriculture est soumise à des réglementations de plus en plus strictes en raison des préoccupations croissantes du public. Pour résoudre ce problème, les biostimulants jouent un rôle central dans la durabilité en réduisant la dépendance aux engrais, notamment aux intrants chimiques non agricoles [187, 188].

Dans ce contexte, les biostimulants, qui sont des substances naturelles, suscitent un intérêt particulier. Ils offrent une approche potentiellement novatrice pour réguler et modifier les processus physiologiques des plantes, favoriser la croissance, atténuer les contraintes liées au stress et améliorer les performances [189]. Un biostimulant se définit comme une substance organique qui, lorsqu'elle est appliquée en petites quantités, améliore la croissance et le développement des plantes d'une manière qui ne peut être obtenue par l'application de nutriments traditionnels [190]. Selon la définition du jardin, un biostimulant végétal est décrit comme toute substance ou micro-organisme appliqué aux plantes dans le but d'améliorer l'efficacité nutritionnelle, la tolérance aux stress abiotiques et/ou la qualité de sa teneur en nutriments [191]. Ce biostimulant améliore la productivité des plantes grâce à ses propriétés spécifiques résultant d'une combinaison complexe de constituants, plutôt que d'être simplement le résultat de la présence isolée d'un élément nutritif de base [189].

L'étude innovante menée par Hervé constitue une application conceptuelle pionnière. Elle suggère que le développement de nouveaux produits "bio-rationnels" devrait reposer sur une approche systémique intégrant la synthèse chimique, la biochimie et la biotechnologie appliquées aux contraintes physiologiques, agricoles et écologiques des plantes réelles. De plus, Hervé préconise que ces produits devraient fonctionner à des doses faibles, être respectueux de l'environnement et offrir des avantages reproductibles dans la culture des plantes agricoles [192].

Les techniques employées dans la préparation des biostimulants sont diversifiées, englobant des processus tels que la culture, l'extraction, la fermentation, la transformation et la purification, l'hydrolyse, ainsi que le traitement par rupture cellulaire à haute pression. Souvent, le recours à des extraits plutôt qu'à des matières premières brutes est justifié par la nécessité d'un processus de fabrication normalisé visant à assurer la production d'un produit commercial uniforme [193]. Il est important de noter que, bien que les biostimulants commerciaux élaborés à partir de sources similaires soient souvent présentés comme équivalents sur le marché, leurs compositions peuvent différer significativement, influant ainsi sur leur efficacité [194]. Un exemple illustrant cette diversité réside dans les nombreux extraits commerciaux d'algues marines, dérivés fréquemment de la même espèce, mais rarement équivalents [195].

Il convient de souligner que de nombreux fabricants de biostimulants gardent confidentielle leur technologie de production en tant que secret commercial [194].

Dans l'ensemble, les biostimulants sont généralement considérés comme biodégradables, non toxiques, non polluants et sans danger pour les organismes vivants. Cette conclusion peut également être étendue à leurs dérivés [191, 193, 195]

#### IV. Les biofertilisants

Les biofertilisants sont définis comme des préparations renfermant des micro-organismes efficaces, sous forme de cellules vivantes ou latentes, favorisant l'absorption des éléments minéraux par les plantes cultivées. Cette amélioration résulte de leurs interactions dans la rhizosphère, que ce soit lors de leur application sur les semences ou dans le sol [196]. Ces biofertilisants accélèrent des processus microbiens spécifiques dans le sol, contribuant ainsi à augmenter la disponibilité des éléments nutritifs dans une forme aisément assimilable par les plantes, comme l'indique [197].

##### IV.1. Quelques types de biofertilisants

###### IV.1.1. Les engrais d'origine animal

Les engrais d'origine animale se composent spécifiquement de déchets industriels, notamment des résidus provenant d'abattoirs tels que le sang desséché, les bouses de vache et les fientes de poules, entre autres. Ces déchets présentent un intérêt en raison de leur apport en azote à décomposition relativement lente, et ils favorisent également la multiplication rapide de la microflore du sol. Cependant, il est important de noter que ces engrais ne contribuent que modestement à l'enrichissement du sol en humus stable. Ils sont généralement enfouis dans le sol lors de la préparation du terrain ou environ trois semaines avant le repiquage, notamment pendant la saison des pluies [198].

###### IV.1.2. Le compost

###### IV.1.2.1. Définition du compostage

Le compostage représente un procédé biologique aérobie visant à recycler la matière organique fraîche ainsi que l'énergie présente dans les déchets biodégradables. Il constitue un système de gestion et de valorisation des déchets urbains qui supervise et accélère le processus de décomposition de la biomasse par des microorganismes

(et des macroorganismes) décomposeurs. Cette approche est étudiée par des chercheurs tels que Guet et *al.* [199], Leandro & Adriana [200], ainsi que Kavita & Vinod [201].

#### IV.1.2.2. Définition du vermicompostage

Le vermicompostage est communément décrit comme le processus de décomposition des résidus organiques dans un environnement aérobie, exploitant l'activité biologique optimale des vers de terre et des microorganismes [202]. Dans le cadre du vermicompostage, la dégradation des déchets organiques se produit grâce aux microbes intestinaux des vers de terre, aboutissant à la formation d'un lombricompost stable et mature [203, 204] (Figure I.11).



Figure I.11: Vermicomposteur à quatre compartiments avec robinet de récupération [160].

Le Vermicompost stable se présente comme un matériau similaire à l'humus, exhibant un profil riche en macro et micronutriments, en vitamines, en hormones de croissance, ainsi qu'en enzymes telles que protéases, amylases, lipase, cellulase et chitinase,

accompagné d'une microflore immobilisée. Les enzymes persistent dans la désintégration de la matière organique même après l'éjection par les vers, ce qui peut améliorer les propriétés physico-chimiques et microbiennes du sol tout en favorisant la croissance des plantes [205, 206].

De plus, le Vermicompost stable renferme des acides humiques, des polyphénols et des flavonoïdes, contribuant à la gestion efficace du stress oxydatif induit par les contraintes environnementales [207]. Il peut être utilisé sous forme de biofertilisant, que ce soit sous forme liquide ou solide [208, 209].

## V. Formulations

### V.1. Propriétés physico-chimiques des adjuvants

L'augmentation de la population et la réduction de la disponibilité des terres arables ont stimulé l'utilisation des produits agrochimiques pour améliorer la productivité, la protection des cultures et le stockage. Le marché mondial des produits agrochimiques devrait passer de 134 milliards de dollars en 2010 à 223 milliards de dollars en 2015, enregistrant un taux de croissance annuel composé (TCAC) élevé de 10,6 % de 2010 à 2015 [210]. La croissance du marché est également stimulée par l'utilisation des produits agrochimiques dans la production de biocarburants, qui gagnent rapidement en importance par rapport aux carburants traditionnels à base de pétrole.

Les produits agrochimiques (engrais, fongicides, herbicides et insecticides) contiennent, en plus des ingrédients actifs, de nombreux autres composés appelés adjuvants (Figure I.12).

En un sens général, les adjuvants peuvent être définis comme "toute substance qui aide et améliore les performances d'un processus tout en améliorant les caractéristiques du produit fini". Ils peuvent être intégrés à la formulation lors de la fabrication ou utilisés séparément pour être mélangés dans la cuve avec la formulation juste avant la pulvérisation.



Figure I.12 : Fonctionnalité des adjuvants utilisés dans l'industrie agrochimique [225]

Pour comprendre le mode d'action et le comportement de la gamme diversifiée de produits chimiques adjuvants actuellement disponibles, une compréhension complète de leurs caractéristiques physico-chimiques est essentielle. Certains adjuvants remplissent un certain nombre de fonctions importantes, notamment : conférer une stabilité à la durée de conservation des formulations agrochimiques ; disperser, solubiliser, mouiller ou émulsifier les ingrédients actifs ; et lier les granulés.

Le choix de l'adjuvant ou des adjuvants varie en fonction des propriétés de l'ingrédient actif (herbicide, bactérie ou enzyme) et de son mode d'action (résiduel, par contact ou systémique), du type de formulation (solution, émulsion ou suspension), de la nature des barrières des plantes (trichomes, feuille, tige, racine), ainsi que de la cible prévue (mauvaise herbe, champignon, insecte). De plus, l'application par pulvérisation de la formulation agrochimique implique un certain nombre de processus distincts qui se déroulent de manière consécutive, et initialement, dans les premières secondes où les adjuvants jouent leur rôle.

De nombreuses études ont abordé le rôle des adjuvants dans les formulations agrochimiques [211, 212, 213, 214], ou leur effet sur les types de buses de pulvérisation [215, 216, 217], ou leurs conséquences sur le dépôt foliaire [218] et l'absorption des pesticides [219] ou des herbicides [220, 221, 222], voire leur effet

mouillant sur les surfaces foliaires [223, 224]. Cependant, aucune étude n'a abordé en détail la relation entre les fonctions propres de l'adjuvant seul et ses propriétés physico-chimiques.

## V.2. Classification des adjuvants : Utilité et application

Certaines recherches indiquent que jusqu'à 70 % de l'efficacité d'un pesticide dépend d'une application par pulvérisation adéquate. Cependant, le maillon faible du processus de développement des pesticides est l'application réelle par pulvérisation. Par conséquent, l'utilisation d'adjuvants pour minimiser ou éliminer de nombreux problèmes liés à l'application par pulvérisation contribuera à renforcer l'efficacité du pesticide [225]. Les adjuvants sont conçus pour remplir des fonctions spécifiques, notamment le tamponnement, la dispersion, l'émulsification, la diffusion, l'adhérence, la réduction de l'évaporation, la formation de mousse, la dérive de pulvérisation et la volatilisation (Figure I.13).

De plus, les adjuvants permettent de franchir les barrières des plantes (membranes et poils des feuilles et racines) grâce à leur effet mouillant, de rétention et de pénétration (Figure I.13). Aucun adjuvant unique ne peut remplir toutes ces fonctions, mais différents adjuvants compatibles peuvent souvent être combinés pour accomplir plusieurs fonctions en même temps [211].

Les industries agricoles et horticoles sont submergées par les choix d'adjuvants. Avec autant de produits parmi lesquels choisir, comment prendre une décision éclairée sur l'adjuvant à utiliser pour une situation particulière ? Un bon point de départ est de comprendre les caractéristiques physico-chimiques de ce groupe diversifié de produits chimiques [212].

Généralement, les adjuvants peuvent être classés dans quatre familles principales sur la base de leur composition chimique.

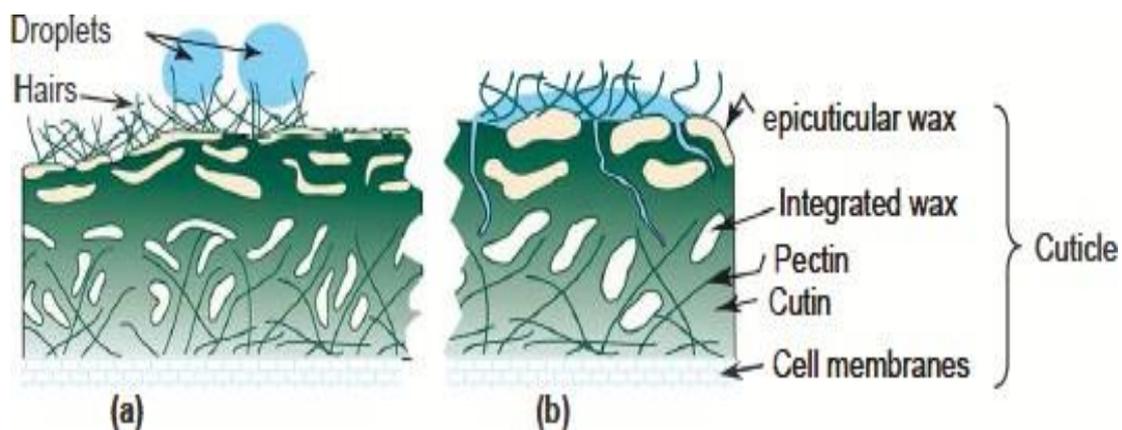


Figure I.13 : Illustration schématique du comportement des gouttelettes de pulvérisation sur la surface des feuilles de plantes  
(a) sans adjuvant ; (b) avec adjuvant [216]

### V.2.1. Surfactants

Les tensioactifs (facteurs agissant en surface), également appelés agents mouillants et dispersants, modifient physiquement la tension superficielle d'une gouttelette de pulvérisation. Pour qu'un pesticide puisse remplir correctement sa fonction sur une plante, la gouttelette de pulvérisation doit être capable de mouiller le feuillage et de s'étaler de manière uniforme. Les tensioactifs augmentent la zone de couverture du pesticide, ce qui augmente l'exposition des ravageurs au produit chimique [217].

Les tensioactifs sont particulièrement utiles lors de l'application d'un pesticide sur une plante aux feuilles cireuses ou velues (Figure I.13). Sans un mouillage et une dispersion adéquate, les gouttelettes de pulvérisation ont souvent tendance à s'écouler ou à ne pas bien recouvrir les surfaces. Cependant, une trop grande quantité de tensioactifs peut entraîner un ruissellement excessif, ce qui peut rendre le pesticide moins efficace [223].

Les tensioactifs sont classés en fonction de la manière dont ils s'ionisent, ou se séparent, en atomes ou molécules chargés électriquement appelés ions.

(i) Les tensioactifs anioniques : ils ont une charge négative et sont les plus efficaces lorsqu'ils sont utilisés avec des pesticides de contact.

(ii) Les *tensioactifs cationiques* : ils ont une charge positive et ne doivent jamais être utilisés seuls en tant que tensioactifs car ils sont généralement phytotoxiques (toxiques pour les plantes).

(iii) *Les tensioactifs non ioniques* : ils n'ont pas de charge électrique. L'activité pesticides en présence d'un tensioactif non ionique peut être tout à fait différente de l'activité en présence d'un tensioactif cationique ou anionique. Les tensioactifs non ioniques sont souvent utilisés avec des pesticides systémiques et aident les pulvérisations de pesticides à pénétrer les cuticules des plantes. De plus, les tensioactifs non ioniques sont compatibles avec la plupart des pesticides et la plupart des pesticides enregistrés auprès de l'EPA qui nécessitent un tensioactif recommandent un type non ionique. Gardez à l'esprit que le choix du mauvais tensioactif peut réduire l'efficacité d'un produit pesticide et augmenter le risque de dommages aux plantes [213].

Les tensioactifs organo-siliconés sont un groupe plus récent de tensioactifs qui prennent la place des tensioactifs non ioniques plus traditionnels. Ils réduisent la tension de surface, augmentent la capacité de diffusion et améliorent la résistance à la pluie (le laps de temps entre l'application d'un pesticide et la pluie). La résistance à la pluie peut être améliorée lorsque plus de pesticide est absorbé par la plante (Figure I.14) [223].

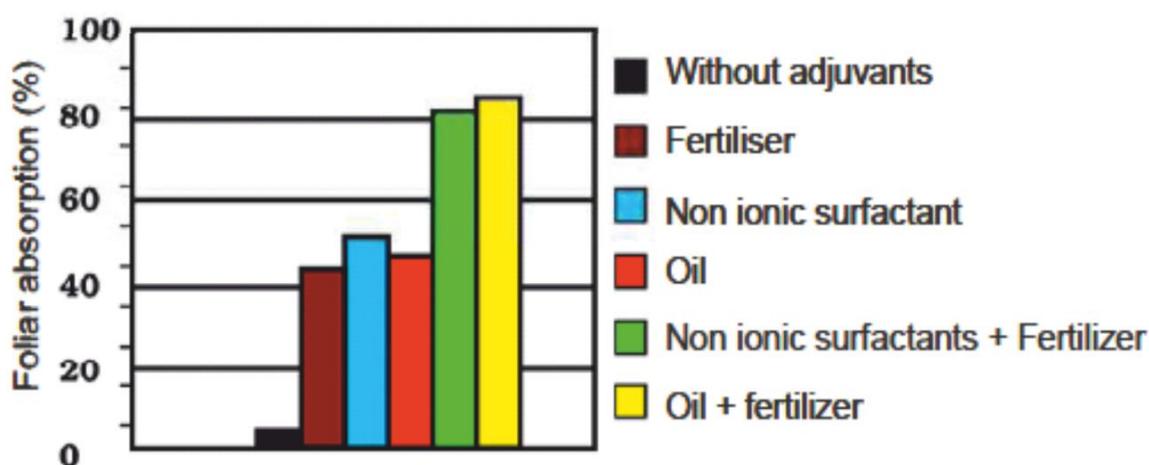


Figure I.14: Pourcentage d'absorption foliaire selon la famille des adjuvants [223]

### V.2.2. Huiles

Les huiles sont utilisées pour lutter contre les mauvaises herbes graminées. Les trois types d'adjuvants à base d'huile comprennent les concentrés d'huile de culture et les concentrés d'huile végétale [225].

(i) *Huile de culture* : est généralement composée à 95 à 98 pour cent d'huile de pétrole à base de paraffine ou de naphta avec 1 à 2 pour cent de tensioactant/émulsifiant. Les huiles de culture favorisent la pénétration d'une pulvérisation de pesticide soit à travers la cuticule cireuse d'une plante, soit à travers la carapace dure et chitineuse d'un insecte. Les huiles de culture traditionnelles sont plus couramment utilisées pour le contrôle des insectes et des maladies et rarement avec des herbicides.

(ii) *Concentrés d'huile de culture (COC)* : sont composés de 80 à 85 pour cent d'huile de pétrole émulsifiable et de 15 à 20 pour cent de tensioactif non ionique. Les concentrés d'huile de culture possèdent les propriétés de pénétration de l'huile et les propriétés de diffusion d'un tensioactif. Les COC sont souvent utilisés avec des herbicides post-levée.

(iii) *Concentrés d'huile végétale (VOC)* : sont composés de 80 à 85 pour cent d'huile de graines d'origine végétale (généralement de coton, de lin, de soja ou de tournesol) et de 15 à 20 pour cent de tensioactif non ionique.

Pour améliorer leurs performances, de nombreux VOC ont subi un processus appelé estérification, qui augmente les caractéristiques hydrophobes de l'huile de graines et donne de l'huile de graines méthylée (MSO). Les MSO fonctionnent de la même manière que les concentrés d'huile de culture traditionnels pour augmenter la pénétration du pesticide dans la cible visée [213].

### V.2.3. Engrais azotés

Une amélioration de l'activité des herbicides a été démontrée en ajoutant du sulfate d'ammonium ou du nitrate d'ammonium urée au mélange de pulvérisation. Les engrais azotés peuvent remplacer certains adjuvants, mais ils sont généralement ajoutés en plus d'un tensioactif et d'un concentré d'huile de culture pour une utilisation avec des produits pesticide systémiques. De nombreux adjuvants à base d'engrais sont disponibles sous forme liquide, ce qui facilite le mélange et offre des résultats plus cohérents [225].

#### V.2.4. Utilités

Comme son nom l'indique, cette classe d'adjuvants est utilisée pour corriger des conditions physiques ou chimiques spécifiques qui peuvent affecter la formulation, la solution de pulvérisation ou l'application du pesticide. Les adjuvants utilitaires peuvent être classés en cinq groupes :

(i) *Agents de compatibilité* : les pesticides sont couramment mélangés avec des engrais liquides ou d'autres ingrédients. Cependant, certaines combinaisons peuvent être physiquement ou chimiquement incompatibles, provoquant des grumeaux et une distribution inégale dans la cuve de pulvérisation. Parfois, le mélange incompatible obstruera la pompe et les tuyaux, entraînant des opérations coûteuses de nettoyage et de réparations. L'utilisation d'un agent de compatibilité peut éliminer ces problèmes.

(ii) *Agents de tamponnement et de conditionnement* : la plupart des formulations, solutions ou suspensions sont stables entre un pH de 5,5 et un pH de 7,0 (légèrement acide à neutre). Les solutions de pesticides ayant un pH supérieur à 7,0 sont plus susceptibles de se dégrader ou de se décomposer. Les acidifiants sont des adjuvants qui abaissent le pH de l'eau dans la cuve de pulvérisation, bien qu'ils ne maintiennent pas nécessairement un niveau de pH constant. Les tampons ont tendance à stabiliser le pH à un niveau relativement constant. Les agents de conditionnement ou d'adoucissement de l'eau réduisent les problèmes causés par l'eau dure. Les minéraux de l'eau dure, en particulier les ions calcium et magnésium, se lient aux ingrédients actifs de certains pesticides, ce qui peut diminuer l'efficacité du pesticide. Avant d'utiliser un tampon ou un agent de conditionnement, tenez compte des exigences spécifiques des ingrédients actifs et testez l'eau pour le pH et la dureté.

(iii) *Agents anti-mousse* : certaines formulations agrochimiques créent de la mousse ou une tête mousseuse dans certaines cuves de pulvérisation. C'est souvent le résultat du type de tensioactif utilisé dans la formulation et du type de système d'agitation de la cuve de pulvérisation. La mousse peut généralement être réduite ou éliminée en ajoutant une petite quantité d'agent anti-mousse.

(iv) *Agents de dépôt* : ces adjuvants, souvent appelés "adhérents", augmentent la capacité des particules solides à adhérer à la surface cible. Ces adjuvants peuvent

réduire la quantité d'ingrédients actifs qui se lave lors de l'irrigation ou de la pluie. Les agents de dépôt peuvent également réduire l'évaporation des ingrédients actifs et certains peuvent ralentir la dégradation des ingrédients actifs causée par les rayons ultraviolets. De nombreux agents de dépôt incluent également un agent mouillant pour créer un produit à usage général qui se répand et adhère à la surface cible.

*(v) Agents de contrôle de la dérive et épaississants* : la dérive est fonction de la taille des gouttelettes, de la vitesse du vent et de la hauteur de la rampe de pulvérisation. Les petites gouttelettes (avec un diamètre de 100 microns ou moins) ont tendance à dériver loin des zones ciblées. Les retardateurs de dérive ou les aides à la déposition améliorent le placement sur la cible de la pulvérisation de pesticide en augmentant la taille moyenne des gouttelettes. La réduction de la dérive est une priorité près des sites sensibles, et l'utilisation d'un agent de dérive peut valoir la petite réduction de l'efficacité de l'application qui peut résulter du changement de taille des gouttelettes. Les épaississants, comme leur nom l'indique, augmentent la viscosité des mélanges de pulvérisation. Ces adjuvants sont utilisés pour contrôler la dérive ou ralentir l'évaporation après que la pulvérisation a été déposée sur la zone cible. Ralentir l'évaporation est important lors de l'utilisation de pesticides systémiques car ils ne peuvent pénétrer la cuticule de la plante que tant qu'ils restent en solution. Une fois que l'eau s'est évaporée, tout pesticide non absorbé restera à la surface de la feuille et ne pourra être absorbé par la plante que s'il retourne en solution par réhumidification.

Ces dernières années, l'utilisation d'adjuvants secs a reçu une attention accrue. Ceux-ci ont tendance à être basés sur des tensioactifs absorbés sur des supports tels que la silice, les argiles, les zéolites, ou dans des complexes tels que les clathrates d'urée. Dans ce dernier cas, la compatibilité physique pour produire un produit dispersible peut être un problème, tout comme l'espace physique disponible dans un produit d'un volume acceptable [225].

## CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

### II. 1. Objectifs

Un biostimulant est une substance ou microorganisme appliqué sur la plante afin d'améliorer sa tolérance au stress abiotique et la qualité de culture en plus de sa teneur en éléments nutritifs.

La présente étude vise l'optimisation des biostimulants d'origine animale (jus de vermicompost) et végétale (extrait aqueux et méthanolique des feuilles de *Moringa oleifera*) par le recours aux formulations et examiner leur effet sur (Figure II. 1).

(i) La germination des graines d'*Atriplex halimus*

(ii) L'amélioration de la résistance face au stress oxydatif

(iii) L'utilisation dans le processus de la phytoremédiation (tolérance et accumulation)

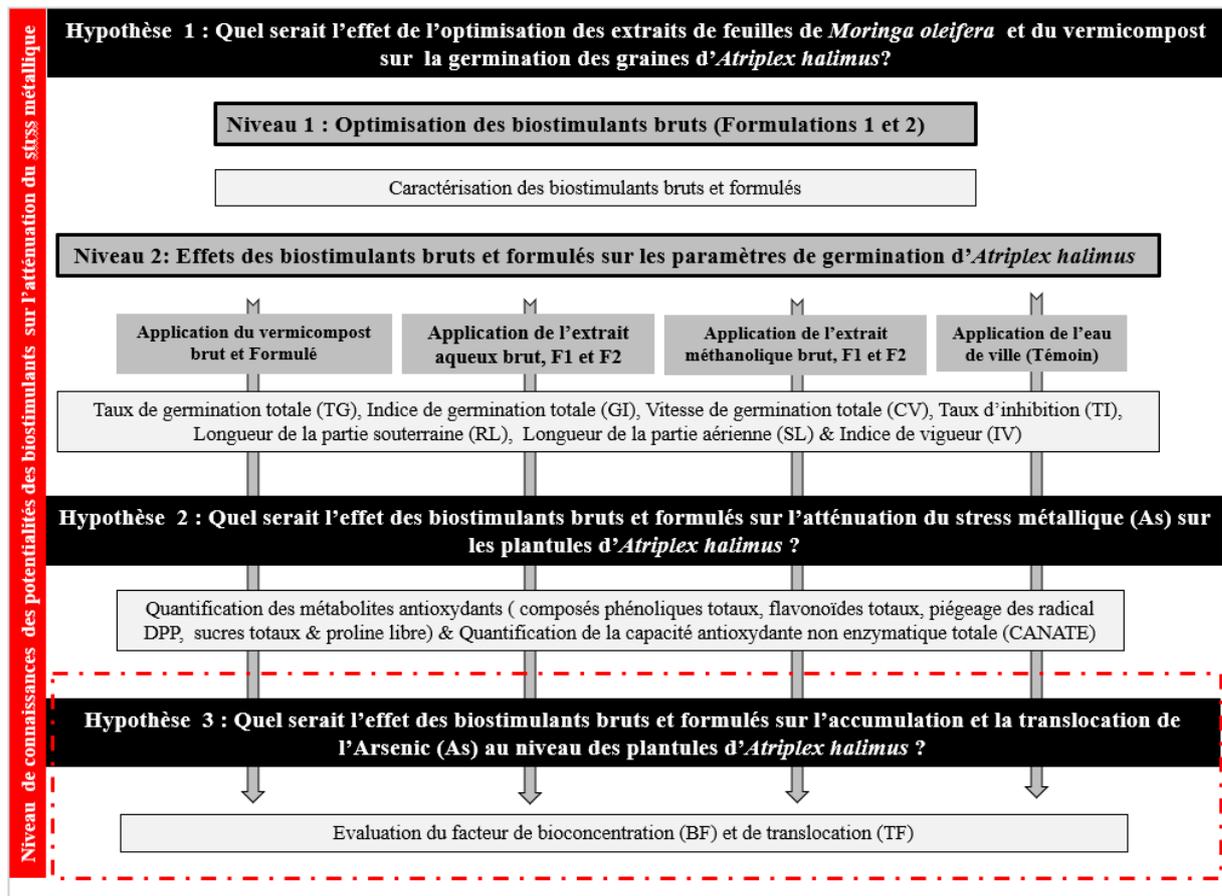


Figure II. 1 : Schéma hypothétique de l'impact de la formulation sur la stimulation des paramètres de croissance des graines et l'atténuation du stress métallique au niveau des plantules

## II.2. Présentation du matériel végétal

La semence utilisée dans cette étude est celle de l'*Atriplex* (*Atriplex halimus* L.), collectée au niveau du périmètre irrigué de l'Institut Technique de Développement de l'Agronomie Saharienne (ITDAS), dans la plaine de l'Otaya (W- Biskra), durant l'automne 2021. La faculté germinative a été estimée à 94%. Les graines sont stérilisées par le chlorure de sodium pendant 20 min à 20% (v/v), puis rincées et trempées dans de l'eau distillée et séchées dans une étuve ventilée. Cette procédure est nécessaire pour éviter la contamination par les microorganismes pendant la germination.

## II.3. Préparation des biostimulants

### **- Préparation des extraits de *Moringa oleifera***

Les feuilles de *Moringa oleifera* ont été collectées au niveau de la ferme de démonstration et de production de semences (FDPS) de Hassi-Benabdallah (Ouargla) durant la saison estivale. La biomasse échantillonnée a été séchée dans une étuve ventilée à 40°C pendant 24h et réduites en poudre par un broyeur à hélice (Ryobi, Alko).

### **- Préparation de l'extrait aqueux**

Selon la méthode d'écrite par Roy [226], 60 g de poudre de Moringa a été mélangée à 400ml d'eau distillée. Le mélange a été homogénéisé sous agitation magnétique pendant 72 h à température ambiante. Après filtration, le filtrat a été centrifugé à 4000 tr/min pendant 15 minutes. Le surnageant (extrait aqueux) est récupéré puis conservé à l'obscurité et à basse température dans des flacons de couleur sombre.

### **- Préparation de l'extrait méthanolique**

Une prise d'essai de 30 g de la poudre végétale de Moringa a été mise à macérer pendant 24 heures à température ambiante, dans un mélange méthanol-eau (80/20 ; V/V). L'extraction est refaite 3 fois avec renouvellement du solvant. Les macéras sont réunis et filtrés sur papier filtre. Le solvant est éliminé du filtrat sous vide à 45°C à l'aide d'un Rotavapeur (Buchi R-300).

### **- Obtention du vermicompost (VLC)**

Le vermicompost utilisé dans cette étude a été produit dans le laboratoire de Biotechnologie des productions végétales de l'Université de Blida 1 (Algérie), par vermicompostage de déchets alimentaires à l'aide du ver de terre *Eisenia foetida* et en suivant les recommandations de Ndegwa et Thompson [227]. Le vermicompost liquide collecté a précédemment montré qu'il contenait des acides humiques, des polyphénols, des auxines, des Cytokinines, des phytohormones et des éléments minéraux dont Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup> [228]. Une seule dilution a été utilisée. La dilution 10% a été préparée en ajoutant du VLC à de l'eau de ville (V/10V). Le choix de cette dilution a été basé sur une étude précédente réalisée dans notre laboratoire [229].

### **- Préparation des formulations**

Notre objectif est l'optimisation d'une formulation avec un effet biostimulant qui protège les cultures contre le stress hydrique et thermique. La réponse des cultures s'améliore face à des conditions défavorables, augmentant leur rendement productif. L'étude envisagée ici porte sur la sécurisation d'un mélange d'extraits de *Moringa* et la Glycine bêtaïne agit comme un osmoprotecteur, régulant les échanges hydriques des cellules, améliorant la résistance des plantes face aux conditions de température et d'humidité qui atteignent des valeurs critiques pour de nombreuses cultures. Le support utilisé varie selon les formulations proposées (tensioactifs & éléments minéraux). Les formulations ont été réalisées au niveau du Laboratoire de recherche de Biotechnologie des Productions Végétales, Université de Blida 1. Leur composition est comme suite :

**Formulation F1** : c'est un mélange original où la quantité des extraits méthanolique et aqueux de *Moringa oleifera* utilisée comme matière active a été réduite jusqu'à 24% et mélangée avec 60% d'un émulsifiant d'extrait de bêtaïne et 16% de mouillant, après une agitation active de 6000 rpm pendant 15 min à l'UltraTurrax IKA [DJAZOULI com. per].

**Formulation F2** : C'est une mixture originale où la quantité des extraits méthanolique et aqueux de *Moringa oleifera* utilisée comme matière active a été réduite jusqu'à 30% et mélangée avec 30% d'un émulsifiant d'extrait de bêtaïne, 14% copper sulfate, 6% Manganèse sulfate, 20% Manganèse chlorure, après une agitation active de 6000 rpm pendant 15 min à l'UltraTurrax IKA [DJAZOULI com. per].

**Formulation F3** : La mixture a été obtenue par l'utilisation du VLC brut à 60% comme matière active à laquelle un mélange de 30% de mouillant, Stasaid et Djazouli [175].10% pénétrant et de tensioactif sont ajoutés, après une agitation active à l'UltraTurrax IKA [DJAZOULI com. per].

## II.4. Méthodologie de travail

### II.4.1. Optimisation des concentrations

Dans le cadre de notre étude, nous avons appliqué quatre concentrations différentes (3 ml, 2 ml, 1,5 ml et 1 ml) de huit biofertilisants (EAM, EMM, EAMF1, EAMF2, EMMF1, EMMF2, VLC et VLCF) sur les graines d'*Atriplex halimus* dans le but d'optimiser leurs concentrations. Ces essais visent à évaluer l'efficacité de chaque concentration sur la germination des graines en prenant en compte plusieurs paramètres de germination. De plus, nous cherchons à étudier l'impact de la formulation sur un produit brut et la possibilité d'y recourir pour conserver les principes actifs et réduire les coûts de production.

#### II.4.1.1. Estimation de la germination

Chaque lot a été soumis à 4 concentrations des extraits brut et formulé. Les graines du traitement témoin ont été également amorcées avec de l'eau courante (hydropriming). L'imprégnation a été effectuée dans l'obscurité à 23°C pendant 6h. Les graines ont, ensuite, été lavées trois fois avec de l'eau désionisée stérile pour éliminer les résidus de l'extrait aqueux et séchées sous flux d'air jusqu'à ce qu'elles atteignent leur niveau d'humidité initial. L'imbibition des graines a été réalisée selon les concentrations arrêtées (D1 : 3ml/L ; D2 : 2 ml/L et D3 : 1,5 ml/L ; D4 : 1ml/L). L'essai a été conduit en cinq répétitions

#### II.4.1.2. Dispositif expérimental

Les graines de l'*Atriplex* ont été décomptées en 5 lots de 500 graines, selon le nombre de traitements (Figure II.2)

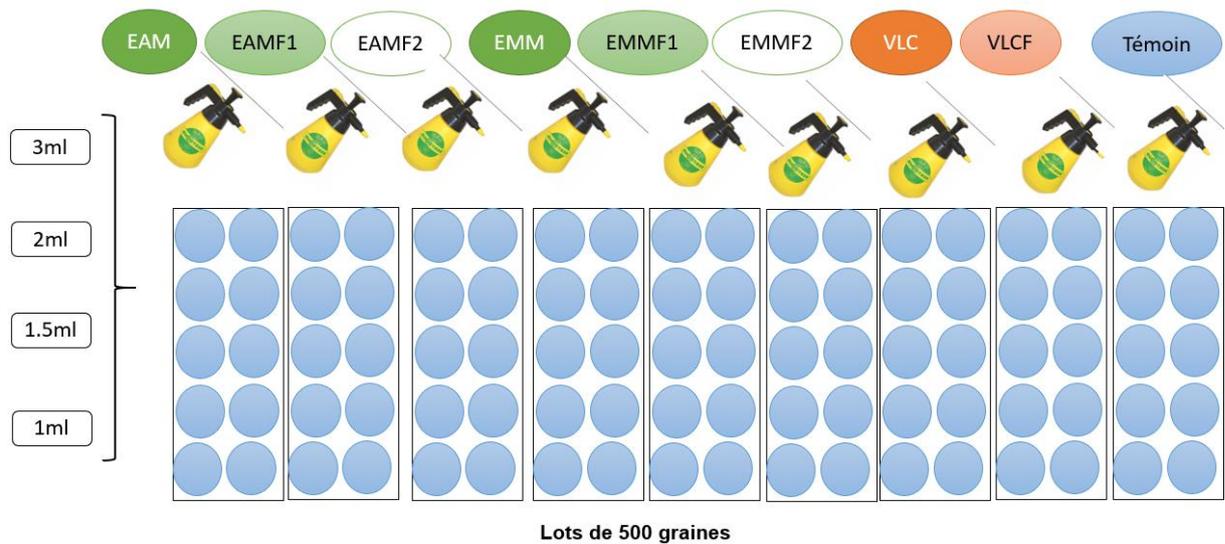


Figure II. 2 : Dispositif expérimental des apports des différents biostimulants

#### II.4.1.3. Conduite de l'essai

L'expérimentation a été conduite au sein du laboratoire de recherche en Biotechnologie des Productions Végétales de l'Université de Blida 1, situé à 36° 30' 36,34" N et 2° 52' 26,05" E en Algérie. Pour l'expérience d'amorçage de la germination, des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre ont été utilisées et placées dans un hortibox avec une photopériode de 16h/8h, une température de 23°C et une humidité de 80% (Figure II.2).

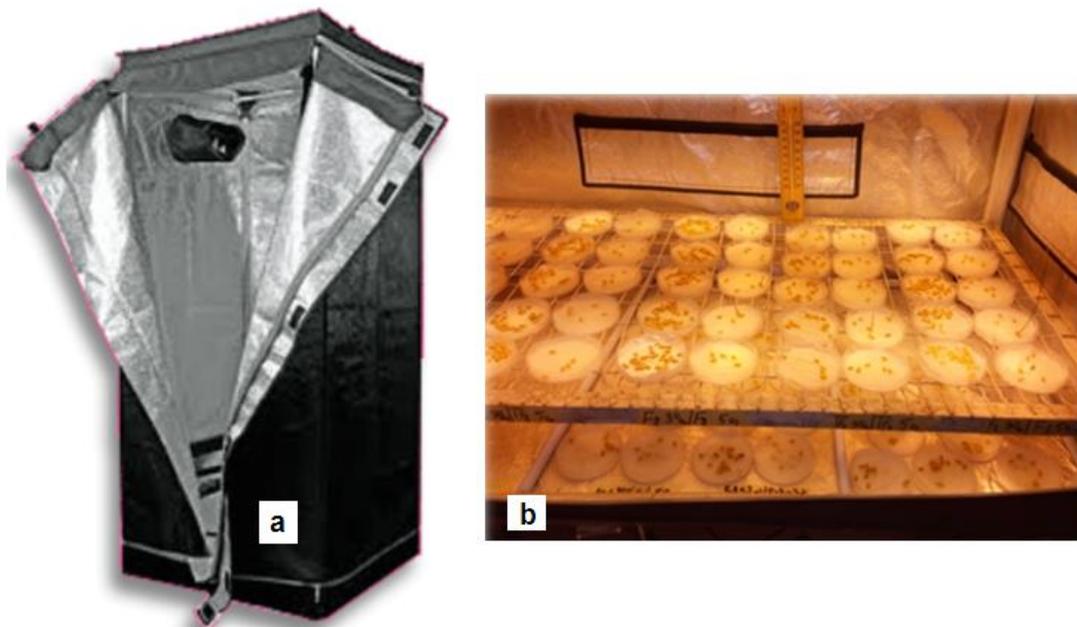


Figure II.3 : Dispositif expérimental des essais en conditions contrôlées  
a: Hortibox, b :Disposition des graines dans l'Hortibox

#### II.4.1.4. Paramètres étudiés

Le suivi du processus de germination a été réalisé pendant 10 jours. La graine a été considérée comme germée, lorsque la radicule a percé l'enveloppe. A ce stade, différents paramètres de germination ont été déterminés comme déjà cité par Cherif et al. [230].

-Le pourcentage de germination totale (TG) a été calculé selon la formule

$$TG (\%) = \frac{\text{Nombre de graines germées}}{\text{Nombre de graines semées}} * 100$$

-Le pourcentage de taux d'inhibition a été calculé selon la formule :

$$Ti (\%) = \frac{\text{Nombre de graines semées}}{\text{Nombre de graines germées}} * 100$$

- L'index de germination a été calculé selon la formule :

$$GI = \sum \left( \frac{Ni}{Ti} \right),$$

Avec :  $Ti$  = nombre de jours après le semis,  $Ni$  = le nombre de graines germées le  $i^{\text{ème}}$  jour.

-La vitesse de germination a été calculée selon la formule :

$$CV = \frac{N1+N2+....+Nn}{(N1T1 +N2T2+.....NnTn)} \times 100.$$

Avec :  $N1$  : nombre de graines germées au temps  $T1$ ,  $N2$  : nombre de graines germées au temps  $T2$ ,  
 $Nn$  : nombre de graines germées au temps  $Tn$ .

-La longueur des parties aérienne et racinaire exprimé en (cm<sup>2</sup>), ont été estimés par analyse d'image (image analysis software Digimizer ver. 3.0. (MedCalc Software bv, Ostend, Belgium))

-La longueur des racines et des pousses de chaque plant a été mesurée pour déterminer l'indice de vigueur selon la formule suivante :

Indice de vigueur (IV) = (longueur moyenne des racines + longueur moyenne des pousses) × % de germination [231].

#### II.4.1.5. Analyses statistiques des données

L'analyse statistique a concerné l'impact des différents traitements (bruts et formulés) sur les paramètres de germination de l'*Atriplex*. Les analyses de la variance sont faites sur des moyennes homogènes adoptées sur la base d'un coefficient de variance (C.V.<15%). La signification des comparaisons des moyennes a été confirmée par un

test de comparaison par paire (Test Tukey). Les contributions significatives retenues sont au seuil d'une probabilité de 5%, les calculs ont été déroulés par le logiciel PAST vers. 3.2 [232]. La tendance des paramètres de germination de l'*Atriplex* par rapport à leurs réactions aux différents biostimulants bruts et formulés ont été établies par une analyse en composante principale (A.C.P.). La projection des variables sur les deux axes de l'analyse multivariée a été conduite par le logiciel PAST vers. 3.2 [232].

#### II.4.2. Application du stress métallique

##### II.4.2.1. Préparation des plantules

Dans le cadre de notre étude, nous avons entrepris un essai de semis dans des plaques alvéolées contenant de la tourbe. Chaque alvéole a étéensemencée avec trois graines d'*Atriplex halimus*. Un arrosage régulier à l'eau du robinet a été assuré tout au long de l'expérience, en veillant à répondre aux besoins hydriques des plantules. Un régime d'arrosage a été instauré tous les trois jours. Ce suivi rigoureux de l'arrosage a été maintenu pendant une période de deux mois afin de permettre aux plantes de développer des racines suffisamment robustes en vue du repiquage ultérieur. L'expérience a été menée dans une serre tunnel, offrant ainsi des conditions semi-contrôlées pour favoriser la germination et la croissance initiale des plantules.

##### II.4.2.2. Repiquage

Les plantules d'*Atriplex halimus* ont été méticuleusement repiquées dans des contenants en plastique mesurant 21 cm de longueur sur 13 cm de largeur, remplis d'un substrat constitué d'un mélange tripartite de tourbe, de terreau et de sable (dans des proportions égales). Les plantules ont été délicatement transférées dans cet environnement de croissance nouvellement aménagé. Un arrosage régulier, réalisé à l'aide d'eau du robinet, a été administré en fonction des besoins spécifiques des plantes, assurant ainsi un apport hydrique adapté à leur stade de développement.

##### II.4.2.3. Dispositif expérimental

##### II.4.2.4. Conduite de l'essai

###### II.4.2.4.1. Application de la solution d'Arsenic

Après 90 jours de repiquage des plantes, une solution métallique a été préparée à base de poudre de trioxyde d'arsenic ( $As_2O_3$ ) diluée dans de l'eau distillée à une concentration de 100  $\mu$  mol/L. la dilution a été effectuée selon les normes dans une

hotte chimique, une irrigation localisée de 100 ml de solution arsenicale par plant a été apportée

#### II.4.2.4.2. Application des traitements

Une application foliaire des traitements a été réalisée selon les concentrations optimisées auparavant. 3ml pour les extraits bruts

#### II.4.2.5. Paramètres étudiés

##### **- Extraction et dosage de la proline**

La méthode suivie est celle de Troll & Lindsley [233]., simplifiée et mise au point par Goring *et al.* [234], qui à partir de matière végétale fraîche mélangée au méthanol est chauffée à 85°C pendant 60 min. Après refroidissement, on ajoute à l'extrait de l'acide acétique, de la ninhydrine et un mélange d'eau distillée, d'acide acétique et d'acide orthophosphorique (0,4 : 1 : 0,26) ; l'ensemble est porté à ébullition pendant 30 min au bout desquelles la couleur vire au rouge. Après refroidissement, l'addition du toluène induit la séparation de la solution en deux phases : la phase supérieure contenant la proline est récupérée, à laquelle on ajoute du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et on lit la densité optique à 528 nm. Les valeurs obtenues sont converties en teneur de proline à partir de courbe étalon dont la relation est la suivante :  $Y = 0,1043 X$

##### **- Extraction et dosage des flavonoïdes**

Kaundun *et al.* [235], préconisent après le broyage du matériel végétal sec une hydrolyse à l'HCl (2N) dans un bain marie bouillant pendant 40 minutes avec insufflation d'air toutes les 10 minutes, l'oxygène permettant l'oxydation des proanthocyanidine en anthocyanidine correspondantes ; après refroidissement de l'hydrolysate, on extrait dans une ampoule à décanter à deux reprises par l'éther diéthylique, les aglycones flavoniques.

La phase aqueuse (phase inférieure) de couleur rouge orange selon les échantillons contient les anthocyanes, nous mesurons son volume total puis nous dosons ces substances à 540 nm.

L'épiphase étherée (phase supérieure) récupérée est traitée un peu plus tard. La phase qui contient les anthocyanes est ensuite reprise au n-butanol, la phase butanolique (phase supérieure) obtenue est de nouveau concentrée à deux reprises

par de l'HCl (2N), elle contient les C-glycosyl-flavones. Une fois le volume des C-glycosyl-flavones mesuré, nous procédons au dosage de ces composés à 365 nm. La teneur des C- glycosides, et des anthocyanes sont calculés par la même formule

$$T(\text{mg} / \text{g}) = \eta \cdot \frac{DO}{\varepsilon} \cdot M.V. \cdot \frac{d}{p}$$

En utilisant les constantes suivantes pour les anthocyanes :

DO : densité optique à 540 nm

$\eta$ : facteur correctif qui tient compte du rendement de transformation des proanthocyanes en anthocyanes et qui égal à 6

$\varepsilon$ : coefficient d'absorption molaire égal à 34 700

M: masse molaire de la Procyanidine égale à 306 g

V: volume de la phase aqueuse mesuré après hydrolyse

d : facteur de dilution

P: poids sec du matériel végétal égal à 0.5 g

T: teneur absolue des anthocyanes en mg/ g de matière végétale sèche.

Et les constantes ci-après pour les C- glycosides

DO : densité optique à la longueur d'onde égale à 365 nm

$\varepsilon$ : coefficient d'absorption molaire égal à 18 850

M : masse molaire d'un C-glycoside égal à 448 g

V : volume de la phase butanolique mesurée après concentration à l'HCl (2N)

d : facteur de dilution

p : poids sec du matériel végétal égal à 0.5 g

T : teneur absolue exprimée en mg / g de matière végétale sèche.

### - Extraction et dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode décrite par Shao & Bao [236]. 0,5-1 g. de graines a été extrait avec 10mL d'éthanol 80% puis a été centrifugé à 10,000 tours/min pendant 20min. Le surnageant a été récupéré et laissé évaporer pendant 20 min à température ambiante. Les résidus ont été récupérés dans de l'eau distillée. 0,5 mL de ce dernier a été additionnée à 2,5 mL de Folin Ciocalteu 1N et à 2 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5%. Après agitation, le mélange a été gardé à l'ombre pendant 30 min à température ambiante. L'absorbance a été effectuée à 760 nm. L'acide gallique a été utilisé comme standard pour la courbe d'étalonnage. La teneur en composés phénoliques est exprimée en équivalent d'acide gallique en utilisant équation linéaire de la courbe d'étalonnage :  $Y=0,0019X + 0,0306$ ,  $R^2=0,9986$ , où Y est l'absorbance et X est la concentration en acide gallique équivalents (g/mL).

#### **- Extraction et dosage des sucres totaux**

Les sucres solubles totaux sont dosés par la méthode de Dubois et *al.* [137]. La matière végétale est mise en contact avec de l'éthanol à 80% durant 48 heures à une température ambiante. Le dispositif est mis à l'étuve à 80°C afin d'évaporer l'alcool, puis on ajoute 20 ml d'eau distillée au résidu. Une fraction de 2 ml de la solution obtenue est additionnée au phénol à 5%, l'acide sulfurique concentré 96%, puis homogénéisé au vortex, après 10 min. On les place au bain- marie à une température de 30°C, pendant 20 min; la lecture de la densité optique se fera à 485 nm au bout de 10mn. Les valeurs obtenues sont reportées sur la gamme étalon, à l'aide de l'équation suivant :  $Y= 4,3918 X - 0,1946$

#### **- Extraction et dosage de la capacité anti-oxydante non enzymatique totale (CANATE)**

Selon Les et *al.* [238], la capacité anti-oxydante non enzymatique totale (CANATE) d'extrait de feuilles correspond à la dose d'antioxydants naturels capables de protéger contre les dommages oxydatifs. Ces antioxydants non enzymatiques peuvent en agissant directement sur les molécules pro-oxydantes ou indirectement en chélatant les métaux de transition, agissant comme piègeurs de radicaux libres. La CANET est exprimée en mg équivalent d'acide ascorbique par g de MVF. A cet effet, une courbe d'étalonnage d'acide ascorbique à 300 µg.ml<sup>-1</sup> est tracée. La conversion des D.O en concentration (µg/mL) a été réalisée à partir de l'équation : (D.O=0,0037X avec R<sup>2</sup>=0,978).

#### **- Estimation de la teneur en eau relative**

Le contenu relatif en eau (RWC) a été libéré selon la méthode de Merah [239] sur dix feuilles. Le poids frais (FW) a été mesuré à l'excision. Le poids sec (DW) a été évalué après 48 h à 80°C. Le RWC a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{RWC (\%)} = [(\text{FW}-\text{DW}) / (\text{FW})] \times 100.$$

### II.4.3. Calcul du paramètre de translocation et d'accumulation

#### II.4.3.1. Récupération des échantillons (tiges, racines, sol)

Des échantillons de sol (0-10 cm de profondeur) ont été prélevés au niveau de chaque bloc expérimental, ce qui donne 28 points d'échantillonnage. Les échantillons ont été

séchés à 60°C pendant 48 h, tamisés à 2 mm et broyés pour passer un tamis de 250- $\mu\text{m}$ .

L'accumulation de métaux dans les tissus végétaux a été évaluée à partir des plants traités et stressés. Les échantillons ont été soigneusement lavés à l'eau du robinet et rincés trois fois à l'eau distillée. Les échantillons Les échantillons ont ensuite été séparés en feuilles, tiges et racines, séchés à 40°C jusqu'à obtention d'un poids constant et broyés jusqu'à ce qu'ils passent un tamis de 2 mm.

#### II.4.3.2. Quantification de l'arsenic

##### II.4.3.2.1. Préparation des échantillons

##### II.4.3.2.2. Digestion des échantillons

Les échantillons de pousses et de racines séchées au four ont été réduits en poudre de 1 mm de diamètre, puis soigneusement mélangés et placés dans des flacons de digestion. Par la suite, 5 ml d'acide nitrique concentré ont été ajoutés à chaque flacon, qui a été ensuite recouvert et laissé reposer toute une nuit à température ambiante. Les flacons ont été chauffés sur une plaque chauffante à 125°C pendant 1 heure. Après refroidissement, 1 à 2 ml de peroxyde d'hydrogène à 30% ont été ajoutés dans chaque flacon et digérés à la même température. Le chauffage et l'addition de peroxyde d'hydrogène ont été répétés jusqu'à ce que le produit de digestion devienne clair. Après refroidissement, le digestat a été filtré et le volume requis de l'échantillon a été préparé en ajoutant de l'eau distillée. Une solution mère standard a été obtenue auprès de Sigma Chemicals. Une solution de sous-stock de concentration de 100 mg/L a été préparée dans de l'eau bidistillée, puis diluée avec du HCl 1M à la concentration souhaitée pour l'étalonnage avant utilisation [240].

##### II.4.3.2.3. Lecture SAA

Le spectrophotomètre d'absorption atomique générateur d'hydrure (SAA -GH) a été calibré selon les instructions manuelles avec 6 M HCl dans le canal acide et 0,6 % de borohydrure de sodium dans 0,5 % NaOH dans le canal acide, réduisant la plage de travail de 0 à 50  $\mu\text{g/L}$  selon les normes. La teneur en As a été déterminée à l'aide d'un SAA-HG [241]

### II.4.3.3. Paramètres mesurés

#### II.4.3.3.1. Détermination du facteur de translocation

- Le facteur de translocation (FT) a été calculé en utilisant la formule décrite par Padmavathiamma & Li [242] qui est la suivante :

$$FT = C_{\text{pousses}} / C_{\text{racines}}$$

Où  $C_{\text{pousses}}$  : est la concentration du métal dans les pousses et  $C_{\text{racines}}$  : est la concentration du métal dans les racines

#### II.4.3.3.2. Détermination du facteur d'accumulation

- Le facteur de bioconcentration (FB) a été calculé comme décrit par Mertens et *al.* [243] et Liang et *al.* [244].

$$FB = C_{\text{tissues récoltés}} / C_{\text{sol}}$$

Où  $C_{\text{tissues récoltés}}$  : est la concentration du métal en question dans les pousses et  $C_{\text{sol}}$  : est la concentration du même métal dans le sol (substrat)

### II.4.4. Analyses statistiques des données

La distribution des échantillons selon la loi Normale ainsi que leur homogénéité sont vérifiés selon le test Levene's. Les résultats ont fait l'objet d'une analyse de la variance à un facteur (ANOVA) afin de déterminer l'effet des différents traitements aux extraits de Moringa sur les paramètres de croissance et biochimiques des graines et des plants de l'*Atriplex halimus*. Lorsque l'analyse ANOVA est significative à un seuil de  $p \leq 0,05$ , les différences entre les moyennes des groupes sont scorées selon le test Student Newman Keuls (SNK). Les données sont présentées sous forme de moyennes arithmétique accompagnées par les valeurs du coefficient de variation C.V. et sont analysées avec les logiciels SYSTAT vers 12. La tendance de l'influence de la fluctuation des paramètres de croissance et biochimiques des graines et des plants de l'*Atriplex halimus* sous l'effet des caractéristiques des extraits de Moringa oleifera bruts et formulés ont été établies par une analyse en composante principale (A.C.P.). La projection des variables sur les deux axes de l'analyse multivariée a été conduite par le logiciel (PAST vers. 3.2) [232] .

## CHAPITRE III : RÉSULTATS

### III.1. Effet des biostimulants sur les paramètres de germination

#### III.1.1. Évaluation de l'effet des différentes concentrations sur les paramètres de germination

Afin de tester l'efficacité des différents biostimulants sous des conditions expérimentales, nous avons testé plusieurs concentrations dans l'esprit de déterminer la dose la plus pertinente pour chaque traitement sur la germination des graines d'*Atriplex halimus*.

Sous l'effet du biostimulant à base de l'extrait aqueux des feuilles de *Moringa oleifera* (EAM), les histogrammes des différents paramètres étudiés, montrent la présence d'une différence significative (test GLM  $p < 0,001$ ). Pour l'ensemble des paramètres les meilleures valeurs sont affichées sous l'effet de la dose 1 (D1=3ml) (Test Tukey, 2 à 3 groupes homogènes) avec les valeurs suivantes : le taux de germination (TG=90%), l'indice de germination (IG=245,25), la vitesse de germination (CV=136,70), le taux d'inhibition (TI=10,00), et l'indice de vigueur (IV=407,95). Cependant, la longueur de la partie racinaire (RL), la longueur de la partie aérienne (SL) n'affichent aucune différence significative sous l'effet doses (test GLM  $p > 5\%$ ) (Figure III.1).

Les résultats de l'application de l'extrait méthanolique des feuilles de *Moringa oleifera* (EMM), sur les différents paramètres de germination, montrent la présence d'une différence significative (test GLM  $p < 0,001$  et  $p < 5\%$ ). Pour l'ensemble des paramètres les meilleures valeurs sont affichées sous l'effet de la dose 1 (D1=3ml) (Test Tukey, 2 groupes homogènes) avec les valeurs suivantes : le taux de germination (TG=81,25%), l'indice de germination (IG=251,87), le taux d'inhibition (TI=18,75), la longueur de la partie racinaire (RL=1,83cm) et l'indice de vigueur (IV= 357,98). Cependant, la longueur de la partie aérienne (SL), la vitesse de germination (CV), n'affichent aucune différence significative sous l'effet doses (test GLM  $p > 5\%$ ) (Figure III.2).

La formulation type 1 de l'extrait aqueux des feuilles de *Moringa oleifera* (EAMF<sub>1</sub>), montre à travers les histogrammes des différents paramètres étudiés, la présence

d'une différence significative (test GLM  $p < 0,01$  et  $p < 5\%$ ). Pour l'ensemble des paramètres les meilleures valeurs sont affichées sous l'effet de la dose 4 (D4=1ml) (Test Tukey, 2 groupes homogènes) avec les valeurs suivantes : l'indice de germination (IG=193,94), la vitesse de germination (CV=96,60), et l'indice de vigueur (IV=270,57). Cependant, le taux de germination (TG), le taux d'inhibition (TI), la longueur de la partie racinaire (RL), la longueur de la partie aérienne (SL) n'affichent aucune différence significative sous l'effet doses (test GLM  $p > 5\%$ ) (Figure III.3).

La formulation type 2 de l'extrait aqueux des feuilles de *Moringa oleifera* (EAMF<sub>2</sub>), montre à travers les histogrammes des différents paramètres étudiés, la présence d'une différence significative (test GLM  $p < 0,001$  et  $p < 5\%$ ). Pour l'ensemble des paramètres les meilleures valeurs sont affichées sous l'effet de la dose 4 (D4=1ml) (Test Tukey, 2 groupes homogènes) avec les valeurs suivantes : l'indice de germination (IG=129,14), la vitesse de germination (CV=85,37), le taux d'inhibition (TI=40,62), la longueur de la partie racinaire (RL=1,52), la longueur de la partie aérienne (SL=2,50) et l'indice de vigueur (IV=218,43). Cependant, le taux de germination (TG), n'affichent aucune différence significative sous l'effet doses (test GLM  $p > 5\%$ ) (Figure III.4).

La formulation type 1 de l'extrait méthanolique des feuilles de *Moringa oleifera* (EMMF<sub>1</sub>), montre à travers les histogrammes des différents paramètres étudiés, la présence d'une différence significative (test GLM  $p < 0,001$  et  $p < 5\%$ ). Pour l'ensemble des paramètres les meilleures valeurs sont affichées sous l'effet de la dose 4 (D4=1ml) (Test Tukey, 2 groupes homogènes) avec les valeurs suivantes : l'indice de germination (IG=199,56), la vitesse de germination (CV=92,46), le taux d'inhibition (TI=28,75), la longueur de la partie racinaire (RL=1,25), la longueur de la partie aérienne (SL=2,91) et l'indice de vigueur (IV=286,55). Cependant, le taux de germination (TG), n'affichent aucune différence significative sous l'effet doses (test GLM  $p > 5\%$ ) (Figure III.5).

La formulation type 2 de l'extrait méthanolique des feuilles de *Moringa oleifera* (EMMF<sub>2</sub>), montre à travers les histogrammes des différents paramètres étudiés, la présence d'une différence significative (test GLM  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 5\%$ ). Pour l'ensemble des paramètres les meilleures valeurs sont affichées sous l'effet de la dose 4 (D4=1ml) (Test Tukey, 2 à 3 groupes homogènes) avec les valeurs suivantes : le

taux de germination (TG=71,25), l'indice de germination (IG=144,28), la vitesse de germination (CV=121,01), le taux d'inhibition (TI=28,75), la longueur de la partie racinaire (RL=1,62), la longueur de la partie aérienne (SL=2,47) et l'indice de vigueur (IV=268,96) (Figure III.6).

Sous l'effet du biostimulant à base du jus de vermicompost (VLC), les histogrammes des différents paramètres étudiés, montrent la présence d'une différence significative (test GLM  $p < 0,001$  et  $p < 5\%$ ). Pour l'ensemble des paramètres les meilleures valeurs sont affichées sous l'effet de la dose 1 (D4=1ml) (Test Tukey, 2 à 3 groupes homogènes) avec les valeurs suivantes : le taux de germination (TG=58,12%), l'indice de germination (IG=108,98), la vitesse de germination (CV=77,04), le taux d'inhibition (TI=41,88), et l'indice de vigueur (IV=275,13). Cependant, la longueur de la partie racinaire (RL), la longueur de la partie aérienne (SL) n'affichent aucune différence significative sous l'effet doses (test GLM  $p > 5\%$ ) (Figure III.7).

La formulation a base du jus de vermicompost (VLCF), montre à travers les histogrammes des différents paramètres étudiés, la présence d'une différence significative (test GLM  $p < 0,01$  et  $p < 5\%$ ). Pour l'ensemble des paramètres les meilleures valeurs sont affichées sous l'effet de la dose 4 (D4=1ml) (Test Tukey, 2 groupes homogènes) avec les valeurs suivantes : la vitesse de germination (CV=64,10), la longueur de la partie racinaire (RL=0,88), la longueur de la partie aérienne (SL=1,97) et l'indice de vigueur (IV=143,60). Cependant, le taux de germination (TG), l'indice de germination (IG), le taux d'inhibition (TI), n'affichent aucune différence significative sous l'effet doses (test GLM  $p > 5\%$ ) (Figure III.8).

Holistiquement, les histogrammes des différents paramètres étudiés, montrent que les meilleurs valeurs du taux de germination TG, de l'indice de germination IG, de la vitesse de germination CV, du taux d'inhibition TI, de la longueur de la partie racinaire RL, de la longueur de la partie aérienne SL et de l'indice de vigueur IV, sont affichées sous l'effet des fortes concentrations D1 (3ml) pour les traitements brut: extrait aqueux EAM et l'extrait méthanolique EMM de feuilles de *Moringa oleifera* (Figure III.1 et 2). En revanche, les traitements formulés ; EAMF1, EAMF2, EMMF1, EMMF2, VLCF et de jus de lombricompost brut VLCP ont enregistré les meilleurs résultats sous l'effet des faibles concentrations D4 (1ml) (Figure III. 3, 4, 5, 6, 7 et 8).

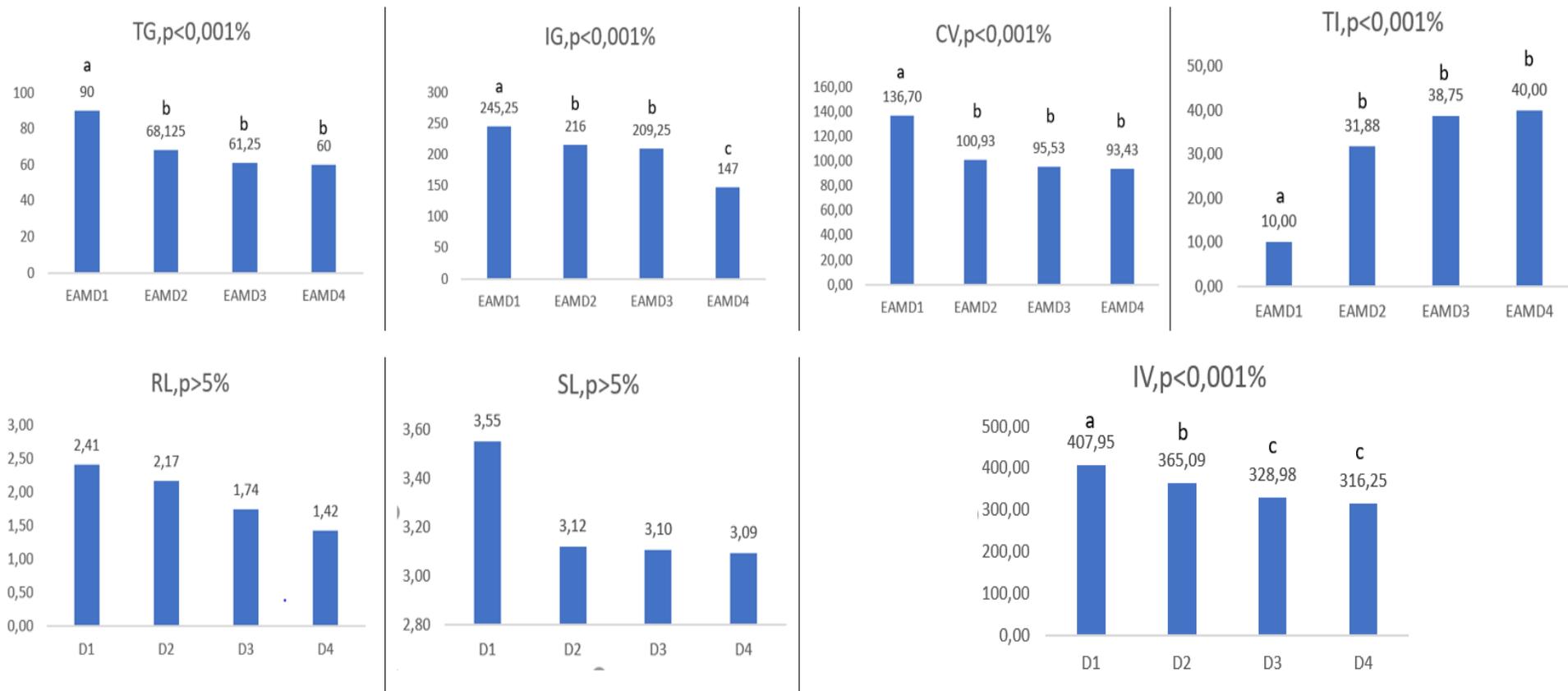


Figure III.1: Evaluation de différentes concentrations du EAM sur les paramètres de germination

TG: taux de germination, IG: indice de germination, CV: vitesse de germination, TI: taux d'inhibition, RL: longueur des racines, SL: longueur des tiges, IV: indice de vigueur

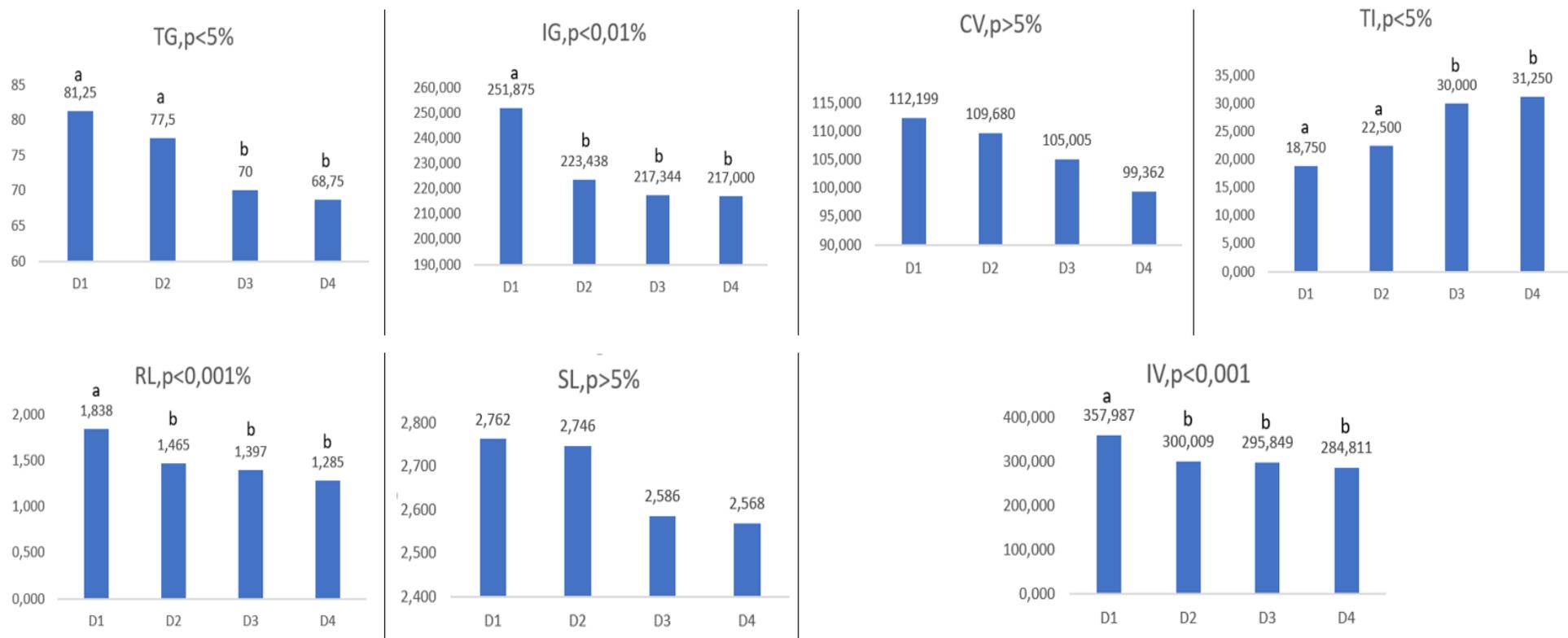


Figure III.2: Evaluation de différentes concentrations du EMM sur les paramètres de germination

TG: taux de germination, IG: indice de germination, CV: vitesse de germination, TI: taux d'inhibition, RL: longueur des racines, SL: longueur des tiges, IV: indice de vigueur

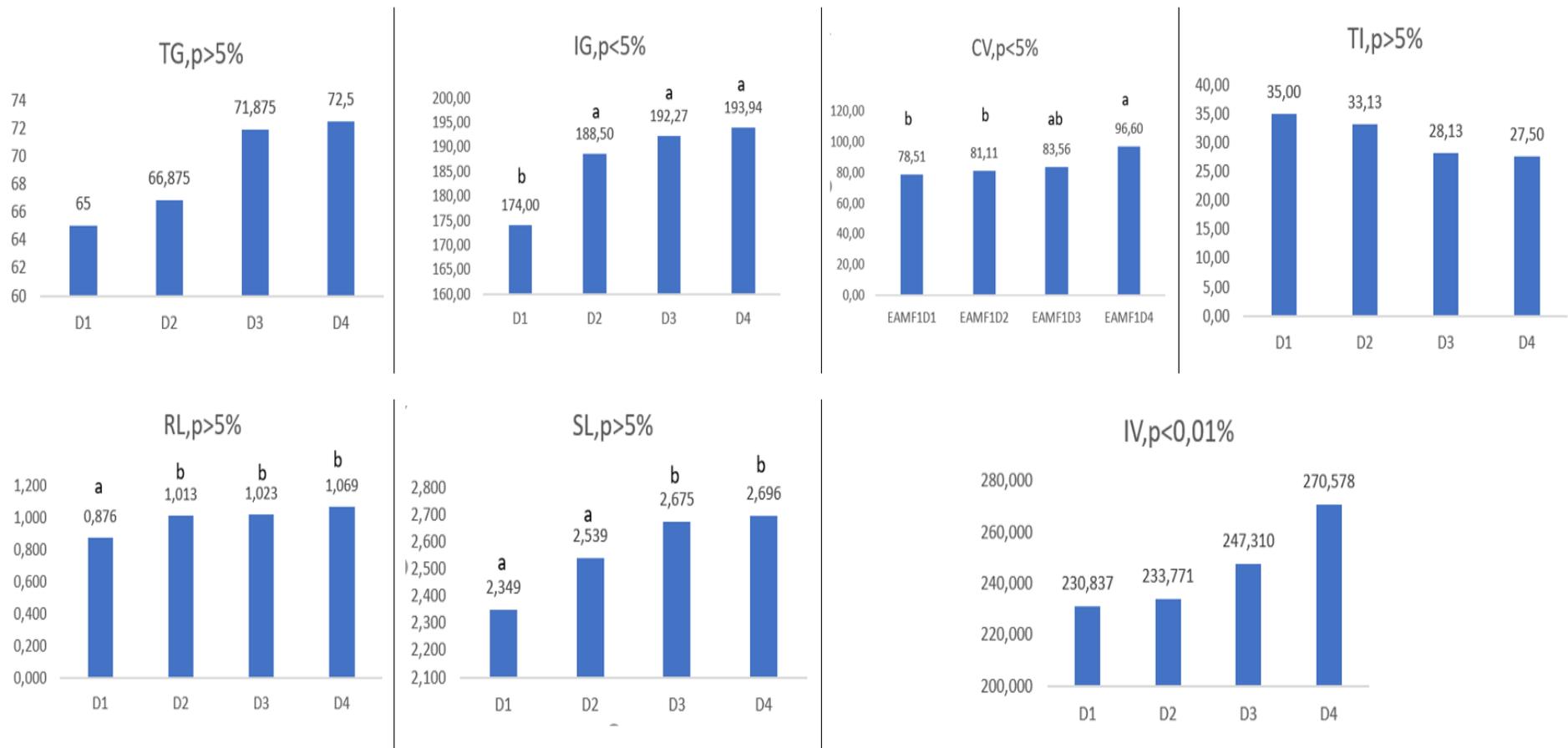


Figure III.3: Evaluation de différentes concentrations du EAM F1 sur les paramètres de germination  
 TG: taux de germination, IG: indice de germination, CV: vitesse de germination, TI: taux d'inhibition, RL: longueur des racines, SL: longueur des tiges, IV: indice de vigueur

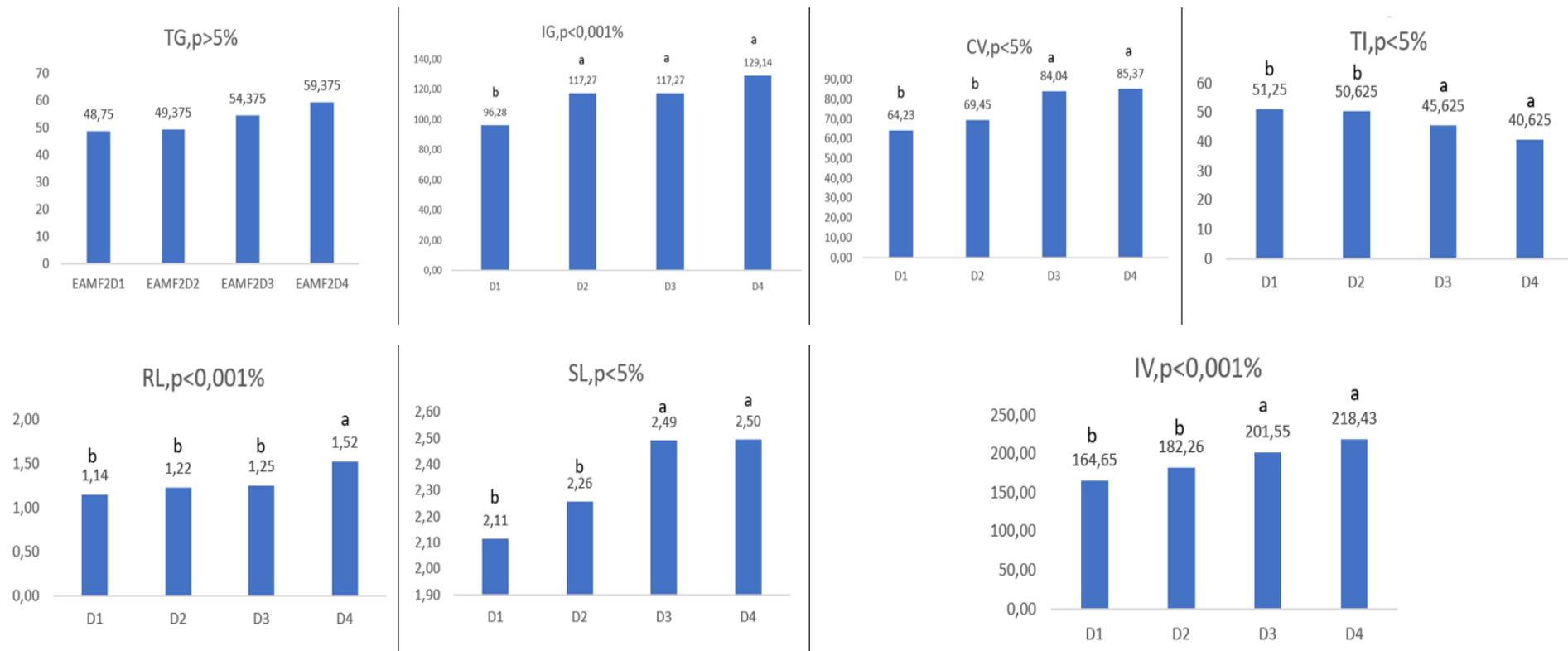


Figure III.4: Evaluation de différentes concentrations du EAM F2 sur les paramètres de germination  
 TG: taux de germination, IG: indice de germination, CV: vitesse de germination, TI: taux d'inhibition, RL: longueur des racines, SL: longueur des tiges, IV: indice de vigueur

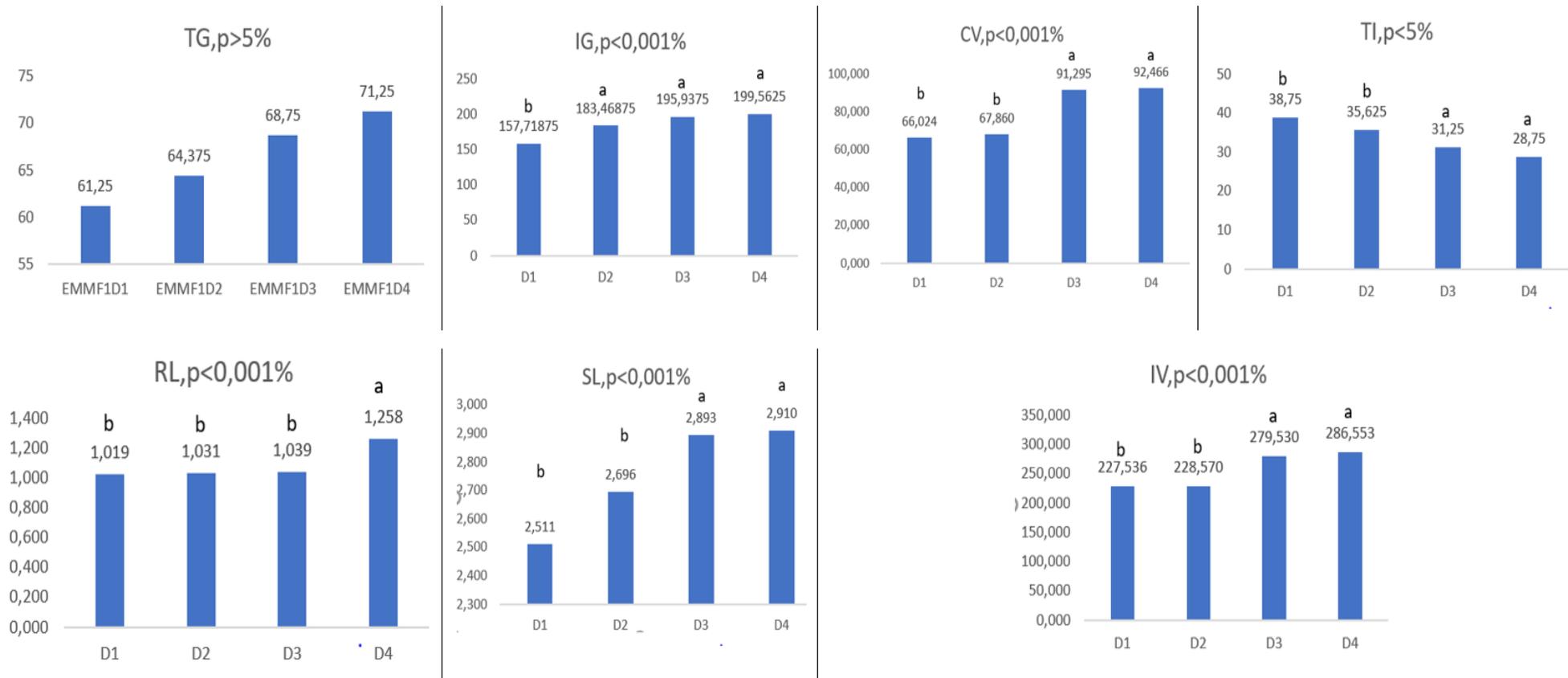


Figure III.5: Evaluation de différentes concentrations du EMM F1 sur les paramètres de germination

TG: taux de germination, IG: indice de germination, CV: vitesse de germination, TI: taux d'inhibition, RL: longueur des racines, SL: longueur des tiges, IV: indice de vigueur

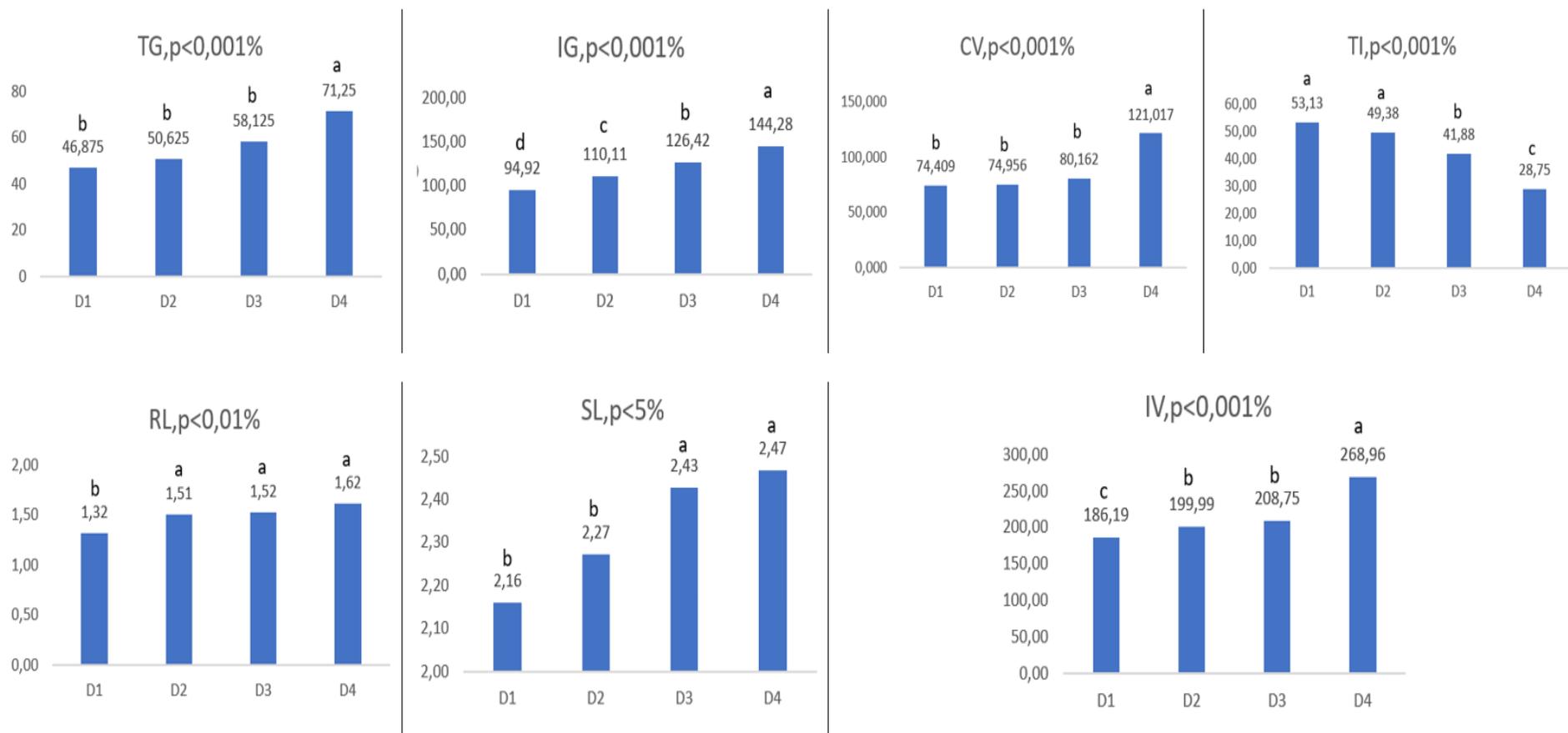


Figure III.6: Evaluation de différentes concentrations du EMM F<sub>2</sub> sur les paramètres de germination  
 TG: taux de germination, IG: indice de germination, CV: vitesse de germination, TI: taux d'inhibition, RL: longueur des racines, SL: longueur des tiges, IV: indice de vigueur

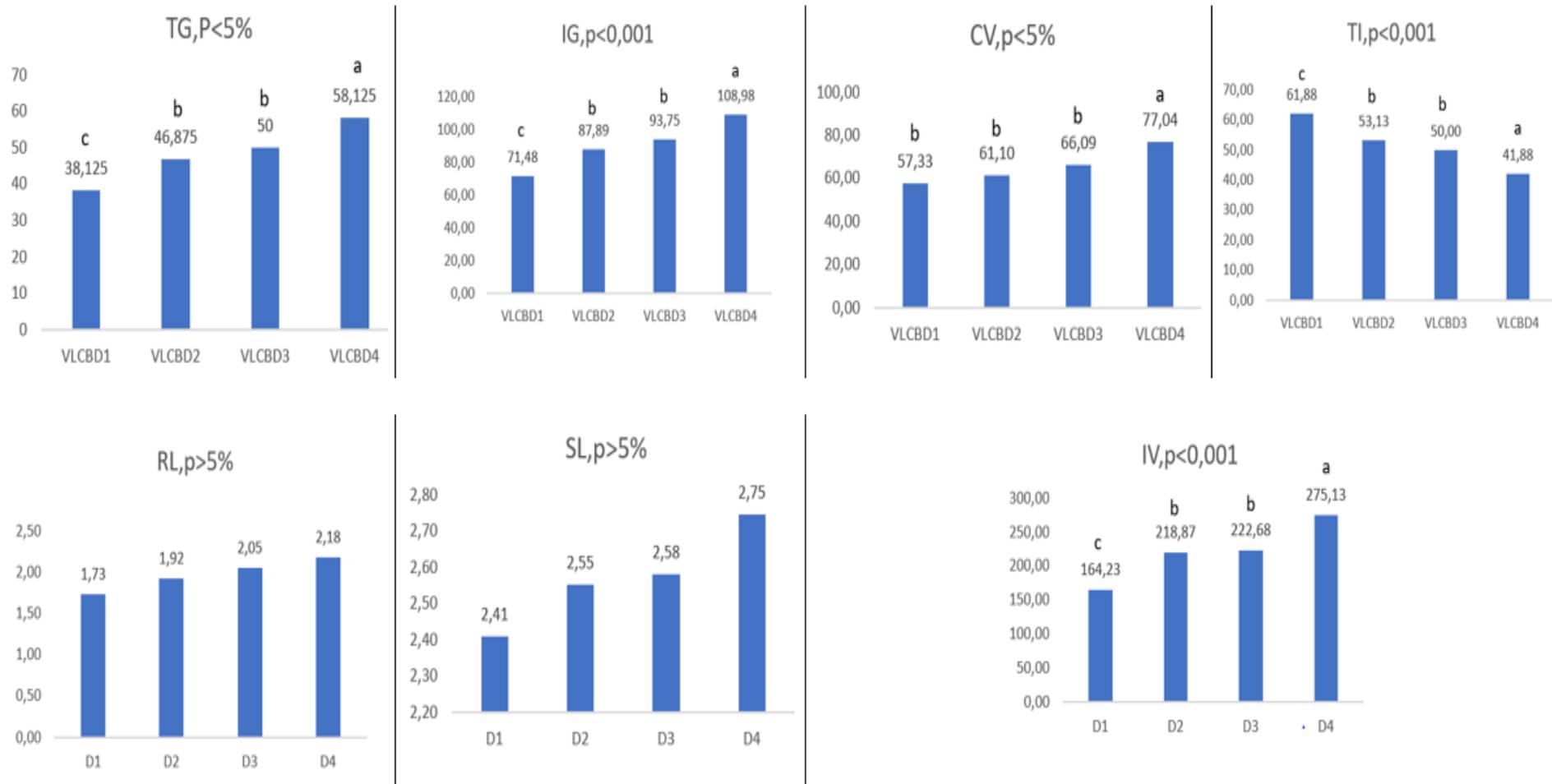


Figure III.7: Evaluation de différentes concentrations du VLC sur les paramètres de germination

TG: taux de germination, IG: indice de germination, CV: vitesse de germination, TI: taux d'inhibition, RL: longueur des racines, SL: longueur des tiges, IV: indice de vigueur

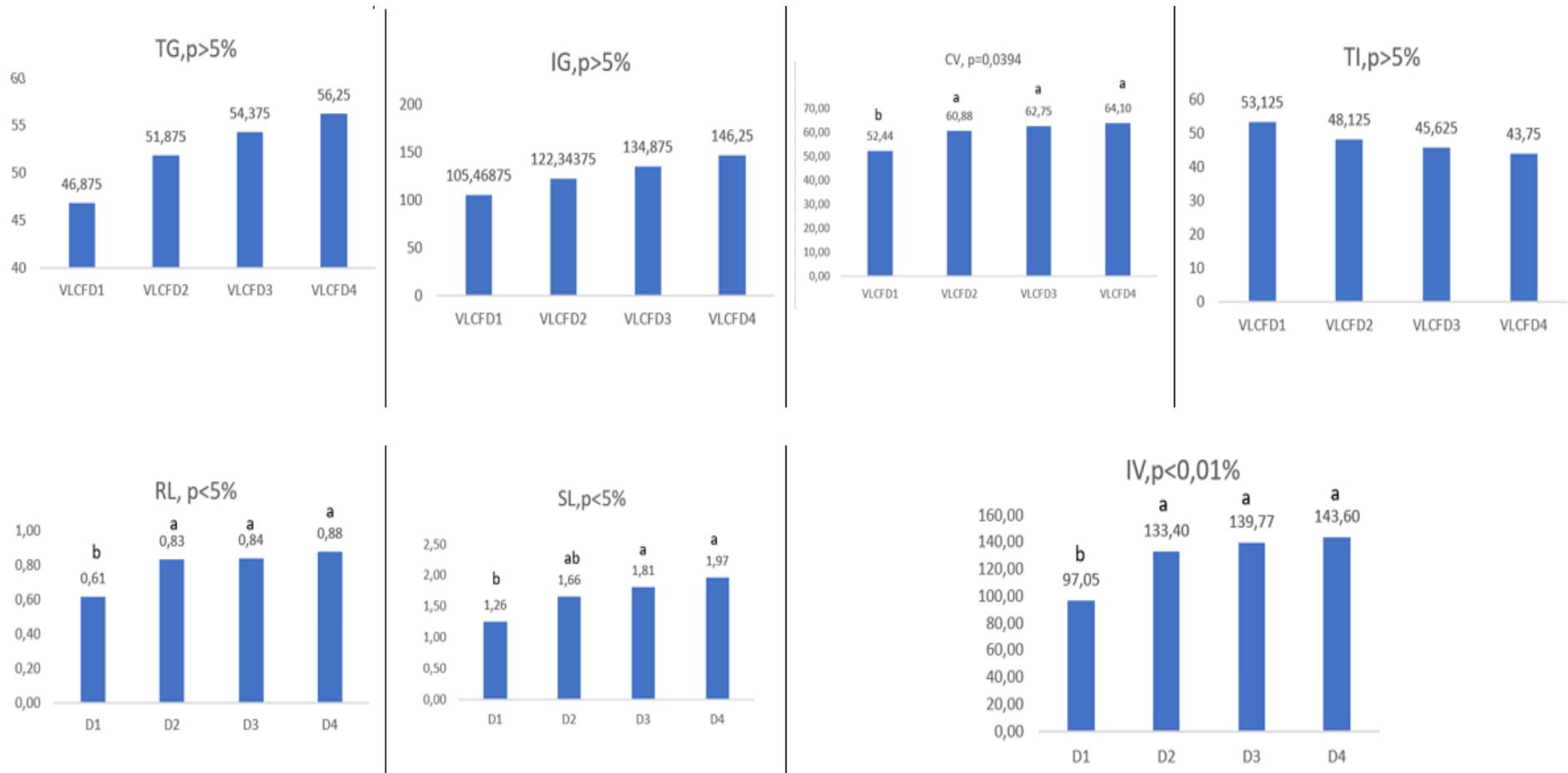


Figure III.8: Evaluation de différentes concentrations du VLCF sur les paramètres de germination  
 TG: taux de germination, IG: indice de germination, CV: vitesse de germination, TI: taux d'inhibition, RL: longueur des racines, SL: longueur des tiges, IV: indice de vigueur

### III.1.2. Étude comparée et tendance de l'effet des biostimulants sur les paramètres de germination

Une analyse type G.L.M a été utilisée pour chaque facteur étudié. Les résultats sont consignés dans le tableau III.1. À partir des résultats obtenus, nous remarquons que les biostimulants bruts et formulés enregistrent un effet très significatif sur les paramètres de germination de l'Atriplex.

Le test de comparaison multiple Post-Hoc de Tukey, désigne l'absence de différence significative entre les extrait aqueux EAM et l'extrait méthanolique EMM en termes d'effets sur les paramètres de germination (groupe homogène a).

Tableau III.1 : Moyennes arithmétique (+ coefficient de variation en %) des paramètres de germination

|              | <b>TG</b>          | <b>IG</b>           | <b>CV</b>                  | <b>TI</b>          | <b>IV</b>           |
|--------------|--------------------|---------------------|----------------------------|--------------------|---------------------|
| <b>EAM</b>   | 90,03 a<br>(0,082) | 245,25 a<br>(0,072) | 136,69 a<br>(0,083)        | 10,01 d<br>(0,004) | 407,95 a<br>(0,029) |
| <b>EMM</b>   | 81,25 a<br>(0,063) | 251,87 a<br>(0,006) | 112,19 a<br>(0,094)        | 18,75 d<br>(0,072) | 357,98 a<br>(0,035) |
| <b>VLCB</b>  | 58,12 c<br>(0,046) | 108,98 d<br>(0,009) | 77,03 c<br>(0,082)         | 41,87 a<br>(0,011) | 275,12 b<br>(0,022) |
| <b>VLCF3</b> | 56,25 c<br>(0,061) | 146,25 c<br>(0,035) | 64,10 d<br>(0,071)         | 43,75 a<br>(0,055) | 143,59 d<br>(0,094) |
| <b>EAMF1</b> | 72,5 b<br>(0,002)  | 193,93 b<br>(0,003) | 96,59 b<br>(0,001)         | 27,5 c<br>(0,021)  | 270,57 b<br>(0,025) |
| <b>EAMF2</b> | 59,37 c<br>(0,011) | 129,14 c<br>(0,010) | 85,37 b<br>(0,009)         | 40,62 b<br>(0,007) | 218,43 c<br>(0,016) |
| <b>EMMF1</b> | 68,75 b<br>(0,005) | 199,56 b<br>(0,018) | 92,46 b<br>(0,010)         | 38,75 b<br>(0,026) | 286,55 b<br>(0,004) |
| <b>EMMF2</b> | 71,25 b<br>(0,023) | 144,28 c<br>(0,041) | 121,01 a<br>(0,007)        | 28,75 c<br>(0,114) | 268,95 b<br>(0,050) |
| <b>F</b>     | 15,15              | 10,31               | 229,1                      | 11,76              | 19,45               |
| <b>p</b>     | 0,035*             | 0,017*              | 1,44×10 <sup>-12</sup> *** | 0,023*             | 0,004**             |

TG : Taux de germination, IG : Index de germination, CV : Vitesse de croissance, TI : Taux d'inhibition, IV : Indice de vigueur, EAM : Extrait aqueux Moringa, EMM : Extrait méthanolique Moringa, VLCB : Vermicompost brut, VLCF3 : Vermicompost formulation 3 EAMF1 : Extrait aqueux Moringa formulation 1, EAMF2 : Extrait aqueux Moringa formulation 2, EMMF1 : Extrait méthanolique Moringa formulation 1, EMMF2 : Extrait méthanolique Moringa formulation 2, \* : Significative à 5%, \*\* : Significative à 1%, \*\*\* : Significative à 0,01%, a, b, c, d : Test Post-Hoc de Tukey

Le même test, nous informe que la formulation F1 appliquées aux extraits aqueux et méthanolique (24% extraits + 60% extrait de Bétaïne + 16% mouillant), a exprimé les valeurs les plus importantes concernant TG, IG, CV et IV par comparaison aux autres

formulations, elle est affiliée au groupe homogène b. En revanche, la formulation F2 appliquées aux extraits aqueux et méthanolique (30% extraits + 30% extrait de Bétaïne + 40% éléments minéraux), a montré qu'avec le maintien de la réduction du principe actif, les paramètres de germination s'expriment avec des valeurs assez importantes.

Le test Post-Hoc de Tukey, indique que la formulation F2 s'adapte mieux à l'extrait méthanolique qu'à l'extrait aqueux. La formulation F3 (60% VLC brut + 30% mouillant + 10% pénétrant & tension actif) s'aligne avec un degré moindre avec la formulation F2 à base des extraits (Tableau III.1).

L'analyse des Clusters réalisée sur tous les paramètres de germinations sous l'effet de l'ensemble des traitements brut et formulés montre que les paramètres de germination de l'*Atriplex* varient en fonction des biostimulants dans leurs forme brut ou formulé (Fig. III.9). Les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 45% de la variabilité totale entre les paramètres mesurés. Sur la base d'une similarité de -150, les résultats de la figure 9, mettent en évidence la présence de différence entre le Cluster 1 et le Cluster 2. A ce stade, nous choisissons d'analyser plus précisément ce qui se passe au sein de chaque Cluster.

L'examen du Clusters 1, nous a permis de constater que les extraits aqueux et méthanolique de *Moringa* formulé F1, qui son sont caractérisés par une faible concentration en principe actif s'alignent en termes d'effet avec les extraits aqueux et méthanolique de *Moringa* caractérisés par une forte concentration du principe actif. Les biostimulants appartenant au Cluster 1 désignent les valeurs de germination les plus importantes. Parallèlement, le Cluster 2, renfermant principalement les extraits aqueux et méthanolique de *Moringa* formulé F2 et le biostimulant à base de vermicompost sous ses concentrations les plus diverses, faible et forte ont été susceptible d'exprimer les valeurs de germination intermédiaires (Fig. III.9).

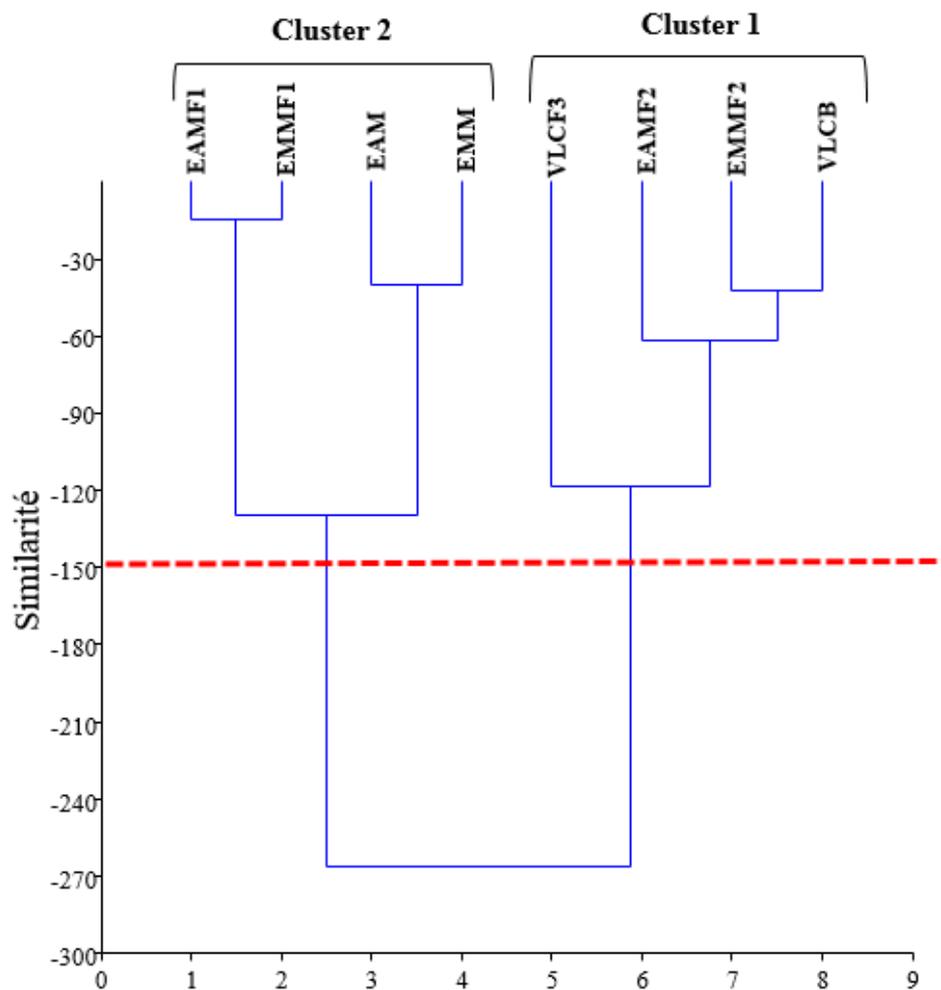


Figure III.9 : Dendrogramme des paramètres de germination de l'*Atriplex* sous l'effet de différentes formulations des extraits aqueux et méthanolique de *Moringa*  
 EAM : Extrait aqueux *Moringa*, EMM : Extrait méthanolique *Moringa*, VLCB : Vermicompost brut, VLCF3 : Vermicompost formulation 3 EAMF1 : Extrait aqueux *Moringa* formulation 1, EAMF2 : Extrait aqueux *Moringa* formulation 2, EMMF1 : Extrait méthanolique *Moringa* formulation 1, EMMF2 : Extrait méthanolique *Moringa* formulation 2

### III.1.3. Tendance de l'effet des biostimulants sur les paramètres de germination

Cette partie de résultats traite la variation des paramètres de germination d'*Atriplex halimus* sur la base des clusters arrêtés par le dendrogramme de la figure III.9.

Les tendances des paramètres (TI, TG, CV, IV et IG) ont été traitées par une analyse en composantes principales (A.C.P.). Le pourcentage de contribution des deux axes 1 et 2 exprime une valeur supérieure à 80% (99,25%) pour le cluster 1 (Figure III.10)

La projection des valeurs des paramètres sur le premier axe 1 (92,77 %), montre que l'apport des biofertilisants à savoir : VLC, EMMF<sub>2</sub>, EAMF<sub>2</sub>, VLCF révèlent une corrélation positive sur l'indice de vigueur (IV) et l'indice de germination (IG). Cette dernière est exprimée par le coefficient de corrélation de Spearman et affichent les valeurs suivantes : VLCF( $r=0,4678$ ), EAMF<sub>2</sub>( $r=0,5185$ ), EMMF<sub>2</sub>( $r=0,5109$ ), VLC( $r=0,5013$ ) (Figure III.10)

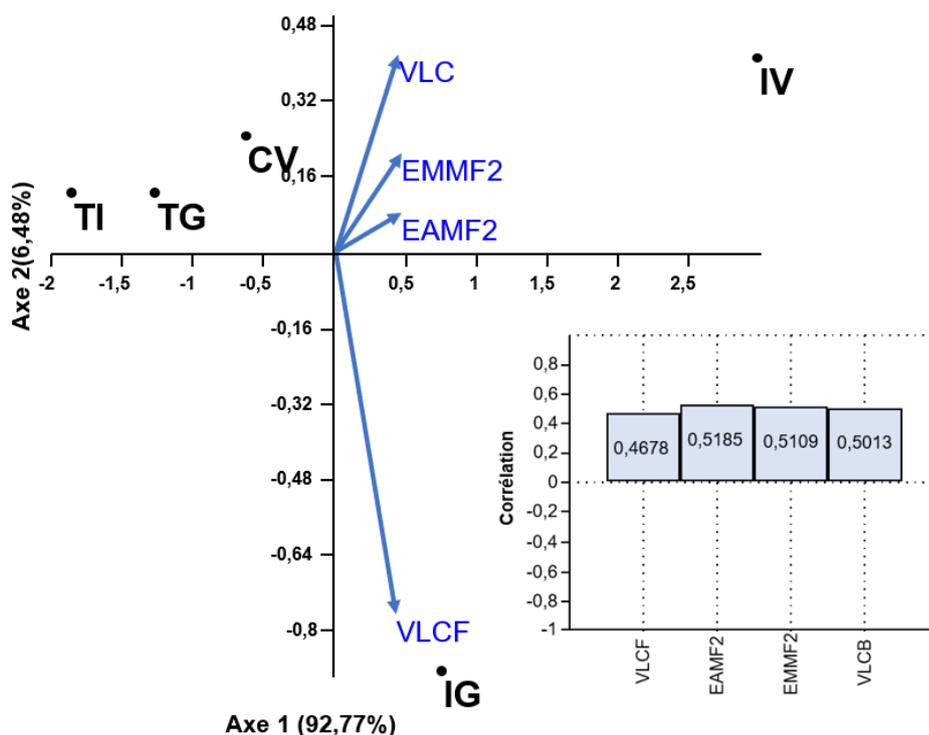


Figure III.10: Projection des paramètres de germination sous l'effet des biostimulants du cluster 1

VLC : Vermicompost brut, VLCF : Vermicompost formulation 3, EAMF<sub>2</sub> : Extrait aqueux *Moringa* formulation 2, EMMF<sub>2</sub> : Extrait méthanolique *Moringa* formulation 2  
TG : Taux de germination, CV : Vitesse de croissance, TI : Taux d'inhibition, IG : Indice de germination, IV : Indice de vigueur,

Dans l'esprit de visualiser l'effet positif des biostimulants VLC, EMMF<sub>2</sub>, EAMF<sub>2</sub> et VLCF sur l'indice de germination (IG) et l'indice de vigueur nous avons procédé à la comparaison deux a deux des profils temporels de l'indice de germination (IG) et celle de l'indice de vigueur (IV).

La comparaison par paire réalisée par le test de Wilcoxon et renforcée par le test de Monte Carlo, montre que le profil temporel de l'indice de germination a une différence significative ( $p < 0,1\%$ ) sous l'effet des traitements (VLC & EAMF<sub>2</sub>) et (VLC & EMMF<sub>2</sub>) (Test de Wilcoxon =  $3,33 \times 10^{-3}$  et  $3,33 \times 10^{-3}$ . Test de Monte Carlo :  $8,2 \times 10^{-4}$  et  $8,5 \times 10^{-4}$ ) respectivement. L'effet sur l'indice de germination est en faveur du EMMF<sub>2</sub>, EAMF<sub>2</sub> par comparaison au VLC avec des moyennes respectives (81,96 ; 68,84 ; 49,57) (Figure III.11). Cependant aucune différence significative n'a été signalée entre les traitements : EAMF<sub>2</sub> & EMMF<sub>2</sub>, VLC & VLCF (Figure III.11).

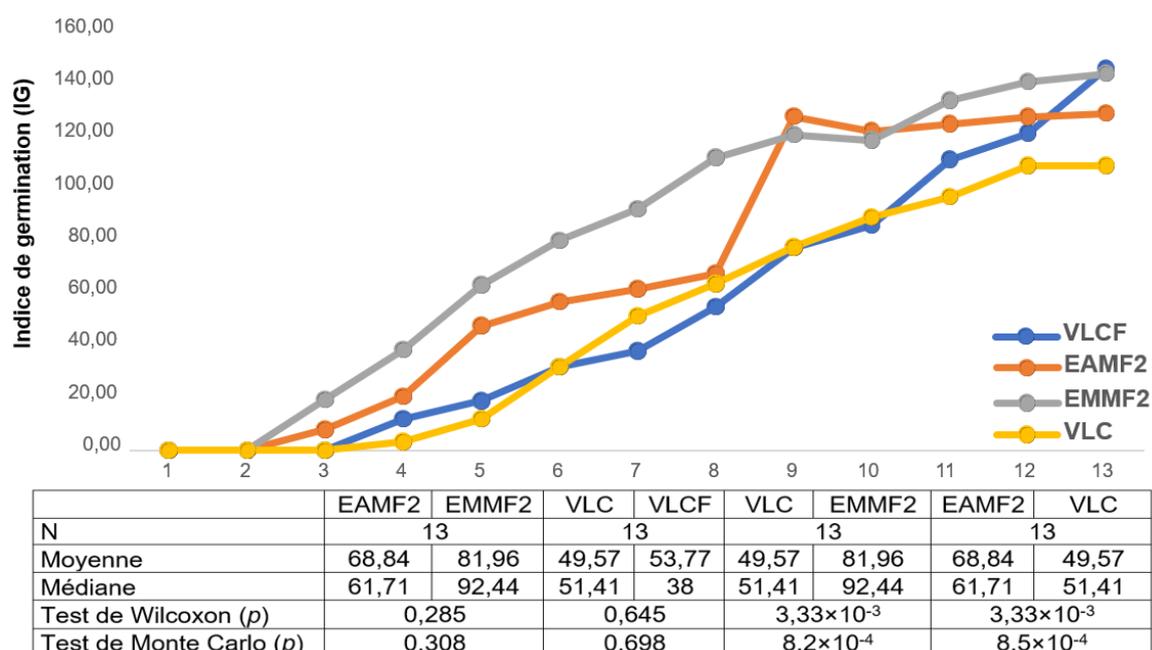


Figure III. 11: Évolution temporelle de l'indice de germination sous l'effet des biostimulants du cluster 1

VLC : Vermicompost brut, VLCF : Vermicompost formulation 3, EAMF<sub>2</sub> : Extrait aqueux *Moringa* formulation 2, EMMF<sub>2</sub> : Extrait méthanolique *Moringa* formulation 2

L'application de la comparaison par paire à l'indice de vigueur (IV) à travers le test de Wilcoxon montre que les traitements VLC, EMMF<sub>2</sub>, EAMF<sub>2</sub>, VLCF, influencent significativement ce paramètre ( $p = 0,045$ ) (Figure III.12). L'histogramme montre que

les meilleures valeurs de l'indice de vigueur sont obtenues sous l'effet du VLC, EMMF<sub>2</sub>, EAMF<sub>2</sub>, (139,77 ; 268,96 ; 218,43) suivis par le VLCF (139,77) (Figure III.12)

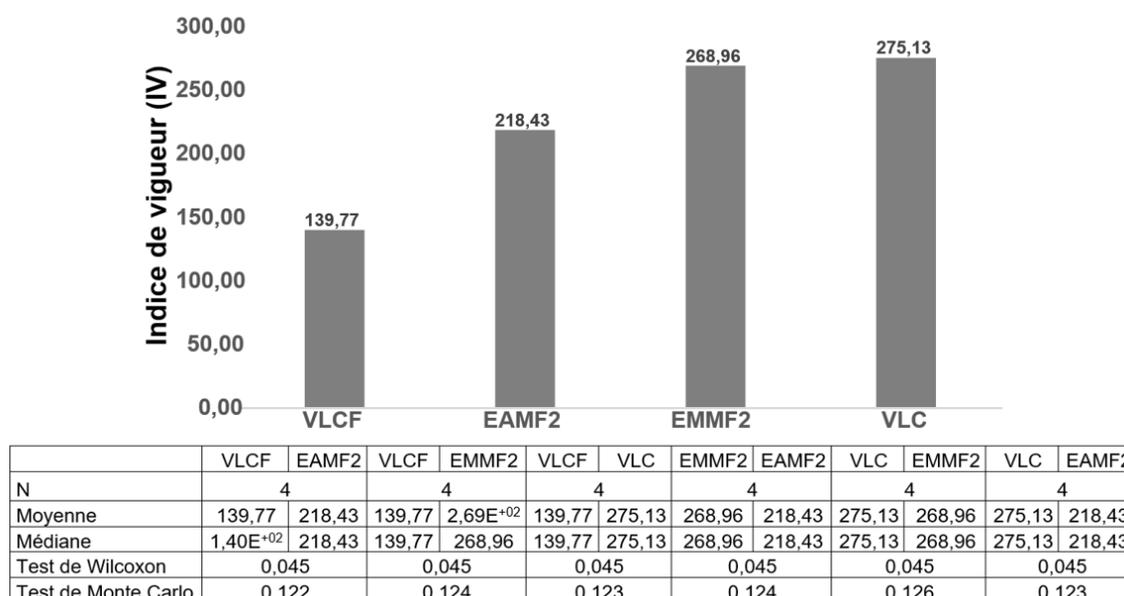


Figure III. 12: Variation de l'indice de vigueur sous l'effet des biostimulants du cluster 1  
 VLC : Vermicompost brut, VLCF : Vermicompost formulation 3, EAMF<sub>2</sub> : Extrait aqueux *Moringa* formulation 2, EMMF<sub>2</sub> : Extrait méthanolique *Moringa* formulation 2

Cette partie de résultats traitent la variation des paramètres de germination d'*Atriplex halimus* sur la base des clusters arrêtés par le dendrogramme de la figure III.9.

Les tendances des paramètres (TI, TG, CV, IV et IG) ont été traitées par une analyse en composantes principales (A.C.P.). Le pourcentage de contribution des deux axes 1 et 2 exprime une valeur supérieure à 80% (99,92%) pour le cluster 2 (Figure III.13)

La projection des valeurs des paramètres sur le premier axe 1 (99,62 %), montre que l'apport des biostimulants à savoir : EAM, EAMF<sub>1</sub>, EMM, EMMF<sub>1</sub>, révèlent une corrélation positive sur l'indice de vigueur (IV) et l'indice de germination (IG). Cette dernière est exprimée par le coefficient de corrélation de Spearman et affichent les valeurs suivantes : EAM (r=0,4988), EAMF<sub>1</sub> (r=0,5007), EMM (r=0,5006), EMMF<sub>1</sub> (r=0,4988) (Figure III.13)

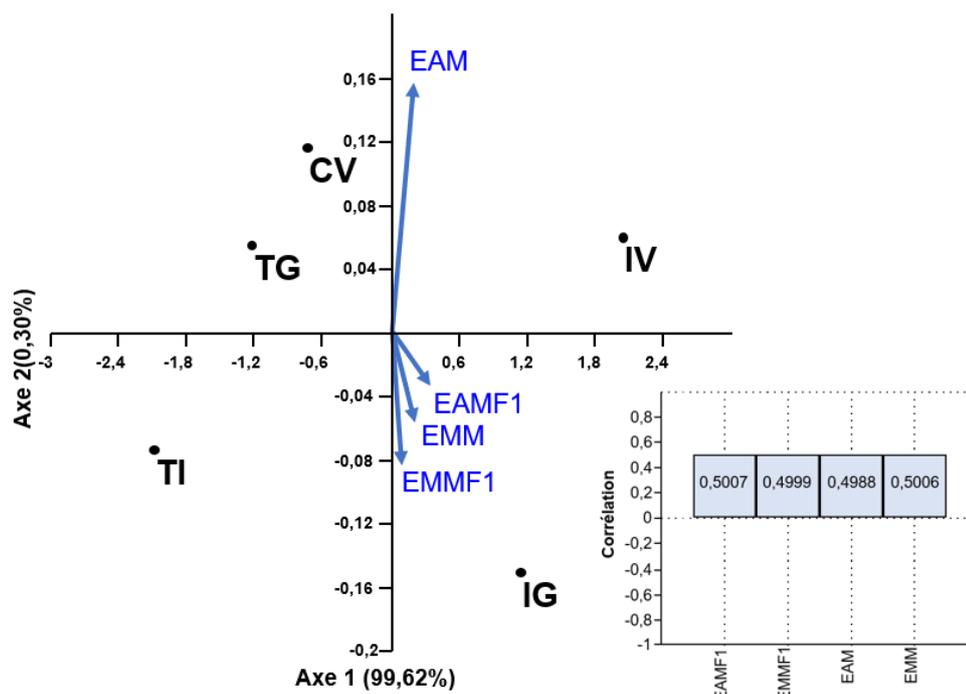
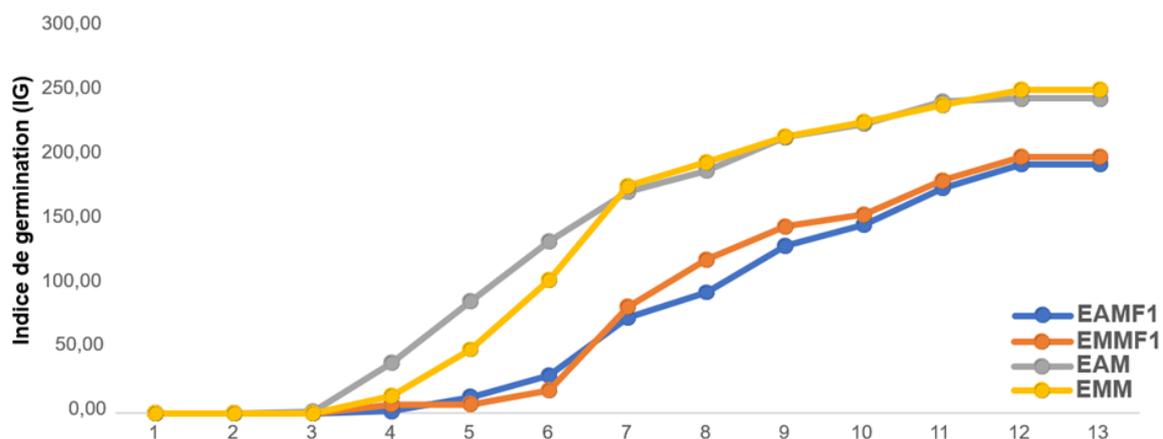


Figure III. 13: Projection des paramètres de germination sous l'effet des biostimulants du cluster 2

EAM : Extrait aqueux *Moringa*, EMM : Extrait méthanolique *Moringa*, EAMF<sub>1</sub> : Extrait aqueux *Moringa* formulation 1, EMMF<sub>1</sub> : Extrait méthanolique *Moringa* formulation 1,  
 TG : Taux de germination, CV : Vitesse de croissance, TI : Taux d'inhibition, IG : Index de germination, IV : Indice de vigueur,

Dans l'esprit de visualiser l'effet positif des biostimulants EAM, EMM, EAMF<sub>1</sub> et EMMF<sub>1</sub> sur l'indice de germination (IG) et l'indice de vigueur nous avons procédé à la comparaison deux a deux des profils temporels de l'indice de germination (IG) et celle de l'indice de vigueur (IV).

La comparaison par paire réalisée par le test de Wilcoxon et renforcée par le test de Monte Carlo, montre que le profil temporel de l'indice de germination présente une différence significative ( $p < 0,1\%$ ) sous l'effet des traitements (EAMF<sub>1</sub> & EMMF<sub>1</sub>), (EMMF<sub>1</sub> & EMM) et (EAM & EAMF<sub>1</sub>) (Test de Wilcoxon =  $1,63 \times 10^{-2}$  et  $3,494 \times 10^{-3}$ ,  $3,33 \times 10^{-3}$ . Test de Monte Carlo :  $1,56 \times 10^{-2}$ ,  $1,88 \times 10^{-3}$  et  $1,17 \times 10^{-3}$ ) respectivement. L'effet sur l'indice de germination est en faveur du EAM, EMM par comparaison au EMMF<sub>1</sub>, EAMF<sub>1</sub> avec des moyennes respectives (138,27 ; 132,82 ; 85,80 ; 81,12) (Figure III.14). Cependant aucune différence significative n'a été signalée entre les traitements : EAM & EMM (Figure III.14).

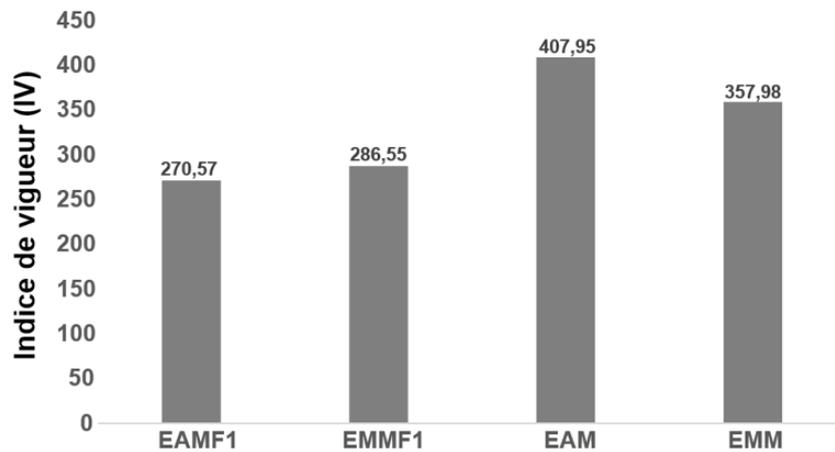


|                             | EAMF1                 | EMMF1 | EAM    | EMM    | EMMF1                 | EMM    | EAM                   | EAMF1 |
|-----------------------------|-----------------------|-------|--------|--------|-----------------------|--------|-----------------------|-------|
| N                           | 13                    |       | 13     |        | 13                    |        | 13                    |       |
| Moyenne                     | 81,12                 | 85,80 | 138,27 | 132,81 | 85,80                 | 132,81 | 138,27                | 81,12 |
| Médiane                     | 74,81                 | 82,88 | 172,5  | 177,13 | 82,88                 | 177,13 | 172,5                 | 74,81 |
| Test de Wilcoxon ( $p$ )    | $1,63 \times 10^{-2}$ |       | 0,213  |        | $4,94 \times 10^{-3}$ |        | $3,33 \times 10^{-3}$ |       |
| Test de Monte Carlo ( $p$ ) | $1,56 \times 10^{-2}$ |       | 0,229  |        | $1,88 \times 10^{-3}$ |        | $1,17 \times 10^{-3}$ |       |

Figure III. 14: Évolution temporelle de l'indice de vigueur sous l'effet des biostimulants du cluster 2

EAM : Extrait aqueux *Moringa*, EMM : Extrait méthanolique *Moringa*, EAMF<sub>1</sub> : Extrait aqueux *Moringa* formulation 1, EMMF<sub>1</sub> : Extrait méthanolique *Moringa* formulation 1,

L'application de la comparaison par paire à l'indice de vigueur (IV) à travers le test de Wilcoxon montre que les traitements EAM, EMM, EAMF<sub>1</sub>, EMMF<sub>1</sub>, influencent significativement ce paramètre ( $p=0,06$ , signification marginale) (Figure III.15). L'histogramme montre que les meilleures valeurs de l'indice de vigueur sont obtenues sous l'effet des extraits bruts EAM et EMM (407,95 et 357,98) suivis par les extraits formulés EMMF<sub>1</sub> et EAMF<sub>1</sub> (286,55 et 270,57)



|                     | EAMF1  | EMMF1  | EAMF1  | EAM    | EAMF1  | EMM    | EMM    | EAM    | EMM    | EMMF1  | EMM    | EMMF1  |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| N                   | 4      |        | 4      |        | 4      |        | 4      |        | 4      |        | 4      |        |
| Moyenne             | 270,58 | 286,55 | 270,58 | 407,95 | 270,58 | 357,99 | 357,99 | 407,95 | 357,99 | 286,55 | 357,99 | 286,55 |
| Médiane             | 270,58 | 286,55 | 270,58 | 407,95 | 270,58 | 357,99 | 357,99 | 407,95 | 357,99 | 286,55 | 357,99 | 286,55 |
| Test de Wilcoxon    | 0,061  |        | 0,065  |        | 0,063  |        | 0,067  |        | 0,064  |        | 0,060  |        |
| Test de Monte Carlo | 0,127  |        | 0,124  |        | 0,125  |        | 0,126  |        | 0,121  |        | 0,122  |        |

Figure III.15: Variation de l'indice de vigueur sous l'effet des biostimulants du cluster 2  
 EAM : Extrait aqueux *Moringa*, EMM : Extrait méthanolique *Moringa*, EAMF1 : Extrait aqueux *Moringa* formulation 1, EMMF1 : Extrait méthanolique *Moringa* formulation 1,

## III.2. Effet des biostimulants sur les paramètres morpho-physiologiques

### III.2.1. Variation des paramètres physiologiques

#### III.2.1.1. Etude comparée de la teneur en proline

La présentation graphique en BoxPlot des données expérimentales est avancée dans le but d'apprécier la variation de la teneur en proline observée sous l'effet des différents traitements à base des extraits de feuilles de *Moringa oleifera* et du jus de vermicompost (Figure III.16). La comparaison des teneurs observées sous l'effet des différents traitements annonce une similarité des extraits brut et VLC aux conditions naturelles (EAM, EMM et VLC). Cependant les extraits formulés (EAMF1, EMMF1, EAMF2, EMMF2) enregistrent des teneurs proches au témoin (stressé).

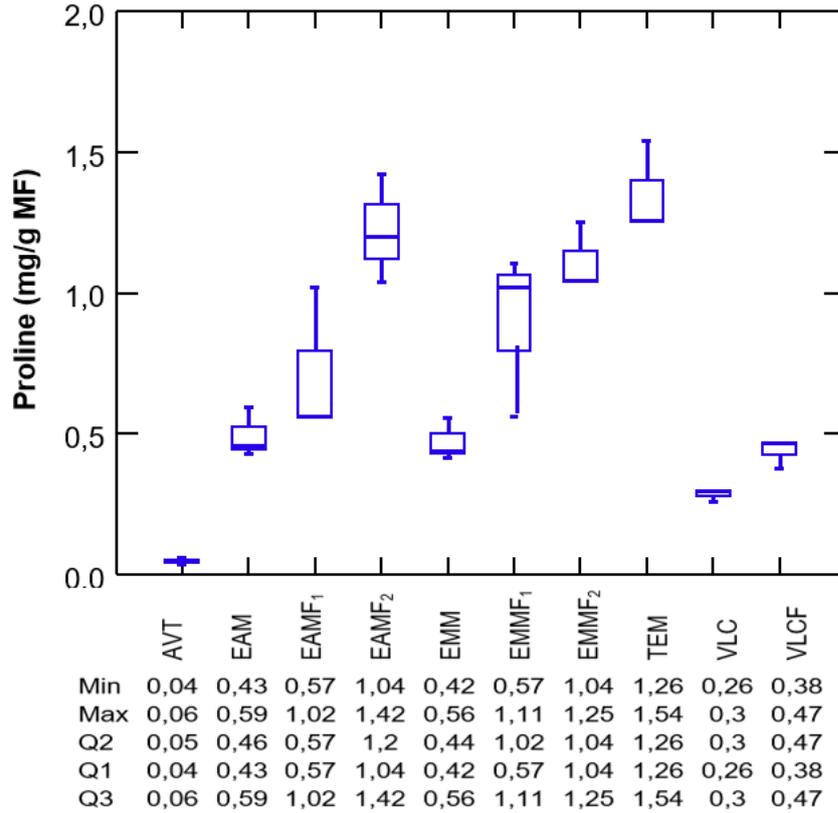


Figure III.16: Présentation en BoxPlot de la teneur en proline sous l'effet des traitements

Une analyse type G.L.M a été réalisée pour le facteur traitement. Les résultats graphiques sont consignés dans les figures III.17 et 18

À partir des résultats obtenus, nous remarquons que le traitement enregistre un effet très significatif sur la teneur en proline ( $p < 0,0001$ ) (Figure III.17).

Le test de comparaison multiple Post-Hoc de Tukey, désigne pour la teneur en proline, la présence de trois groupes homogènes relatifs aux différents extraits (Figure III.18).

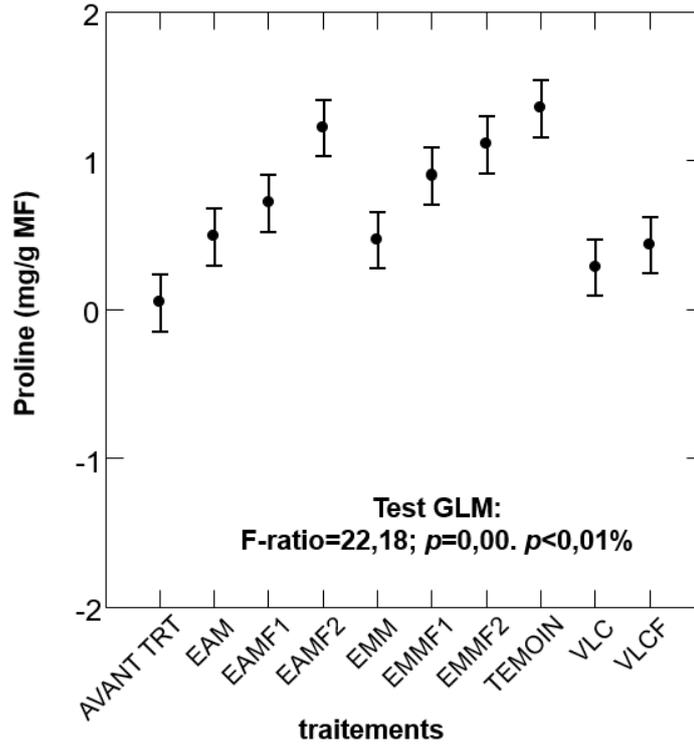
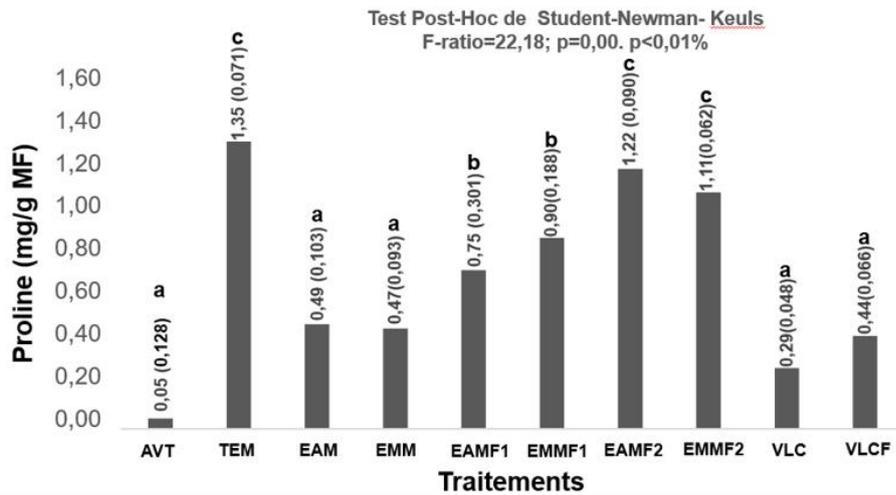


Figure III.17: Analyse de la variance appliquée à la teneur en proline sous l'effet des traitements



|           | AVANT_TRT | TEMOIN    | EAM       | EMM       | EAMF1    | EMMF1    | EAMF2     | EMMF2     | VLC       | VLCF      |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| AVANT_TRT |           | 0,0001786 | 0,05767   | 0,07864   | 0,001395 | 0,000228 | 0,0001787 | 0,0001861 | 0,6974    | 0,1289    |
| TEMOIN    | 14,43     |           | 0,0002205 | 0,0002091 | 0,002501 | 0,04926  | 0,9851    | 0,6663    | 0,000186  | 0,0001976 |
| EAM       | 4,908     | 9,522     |           | 1         | 0,7427   | 0,101    | 0,0006185 | 0,003294  | 0,8249    | 1         |
| EMM       | 4,687     | 9,743     | 0,2214    |           | 0,6505   | 0,07473  | 0,0004856 | 0,002369  | 0,892     | 1         |
| EAMF1     | 7,418     | 7,012     | 2,51      | 2,731     |          | 0,9104   | 0,02312   | 0,1289    | 0,06741   | 0,492     |
| EMMF1     | 9,411     | 5,019     | 4,502     | 4,724     | 1,993    |          | 0,3225    | 0,8121    | 0,003479  | 0,0443    |
| EAMF2     | 12,95     | 1,476     | 8,045     | 8,267     | 5,536    | 3,543    |           | 0,9962    | 0,0001936 | 0,0003472 |
| EMMF2     | 11,74     | 2,694     | 6,828     | 7,049     | 4,318    | 2,325    | 1,218     |           | 0,0002566 | 0,001395  |
| VLC       | 2,62      | 11,81     | 2,288     | 2,067     | 4,798    | 6,791    | 10,33     | 9,116     |           | 0,9638    |
| VLCF      | 4,318     | 10,11     | 0,5905    | 0,3691    | 3,1      | 5,093    | 8,636     | 7,418     | 1,698     |           |

Figure III.18: Étude comparée de la teneur en proline sous l'effet des traitements

### III.2.1.2. Etude comparée de la teneur en polyphénols totaux

La présentation graphique en BoxPlot des données expérimentales est avancée dans le but d'apprécier la variation de la teneur en polyphénols totaux observée sous l'effet des différents traitements base des extraits de feuilles de *Moringa oleifera* et du jus de vermicompost (Figure III.19). La comparaison des teneurs observées sous l'effet des différents traitements annonce une similarité des extraits brut et VLC aux conditions naturelles (EAM, EMM et VLC) cependant les extraits formulés (EAMF1, EMMF1, EAMF2, EMMF2) enregistrent des teneurs proches témoin(stressé).

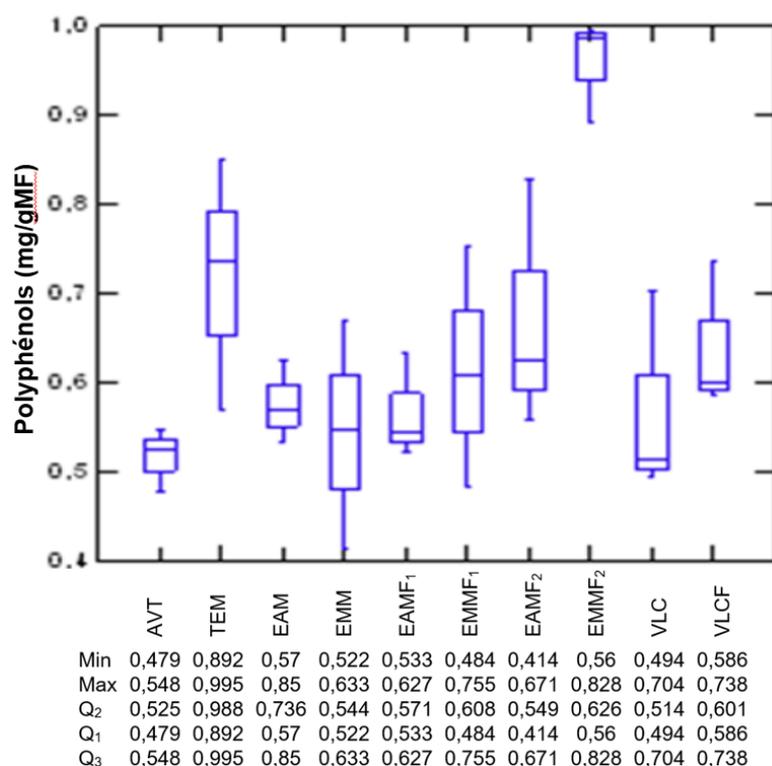


Figure III.19: Présentation en BoxPlot de la teneur en polyphénols totaux sous l'effet des traitements

Une analyse type G.L.M a été réalisée pour le facteur traitement. Les résultats graphiques sont consignés dans les figures III.20 et 21

À partir des résultats obtenus, nous remarquons que le traitement enregistre un effet très significatif sur la teneur en polyphénols totaux ( $p < 0,0001$ ) (Figure III.20).

Le test de comparaison multiple Post-Hoc de Tukey, désigne pour la teneur en polyphénols totaux, la présence de trois groupes homogènes relatifs aux différents extraits (Figure III.21).

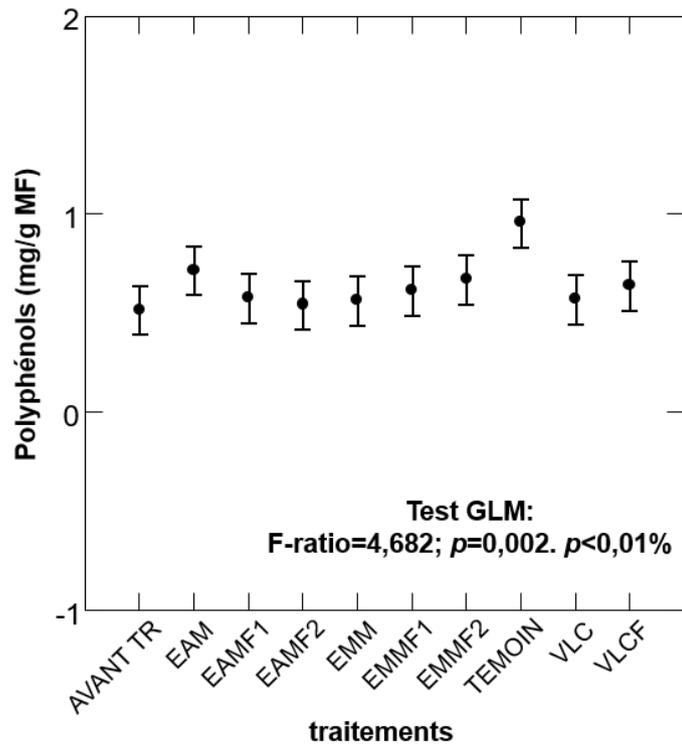


Figure III.20: Analyse de la variance appliquée à la teneur en polyphénols totaux sous l'effet des traitements

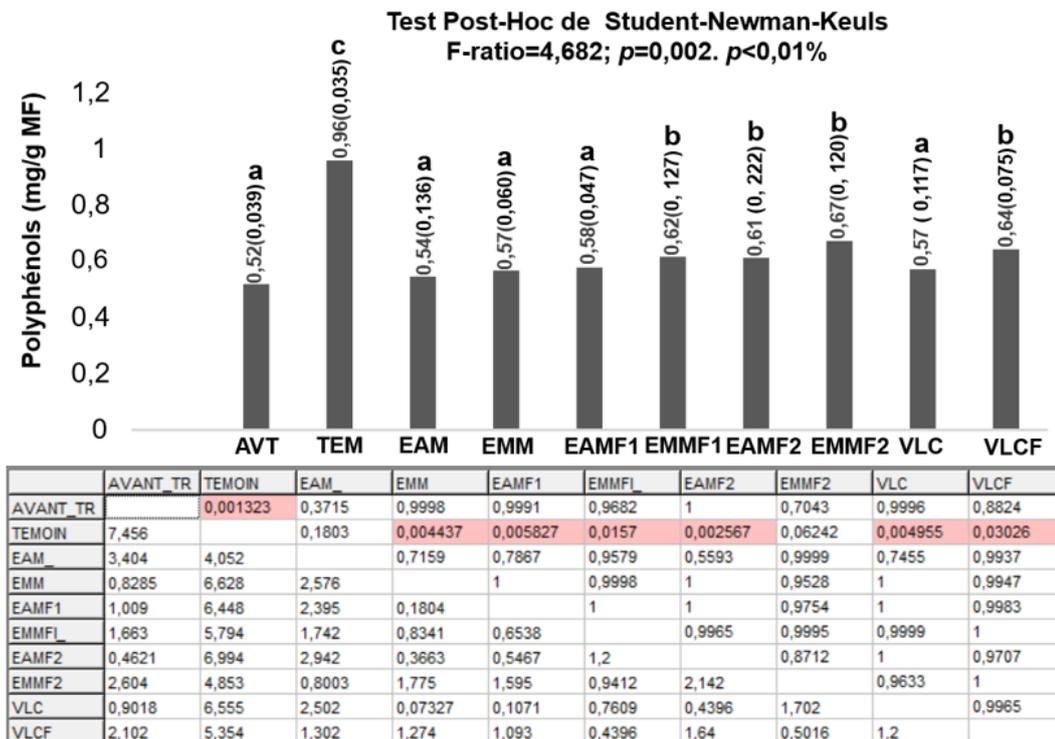


Figure III.21: Etude comparée de la teneur en polyphénols totaux sous l'effet des traitements

### III.2.1.3. Etude comparée de la teneur en flavonoïdes totaux

La présentation graphique en BoxPlot des données expérimentales est avancée dans le but d'apprécier la variation de la teneur en flavonoïdes totaux observée sous l'effet des différents traitements base des extraits de feuilles de *Moringa oleifera* et du jus de vermicompost (Figure III.22). La comparaison des teneurs observées sous l'effet des différents traitements annonce une similarité des extraits brut et VLC aux conditions naturelles (EAM, EMM et VLC) cependant les extraits formulés (EAMF1, EMMF1, EAMF2, EMMF2) enregistrent des teneurs proches témoin(stressé).

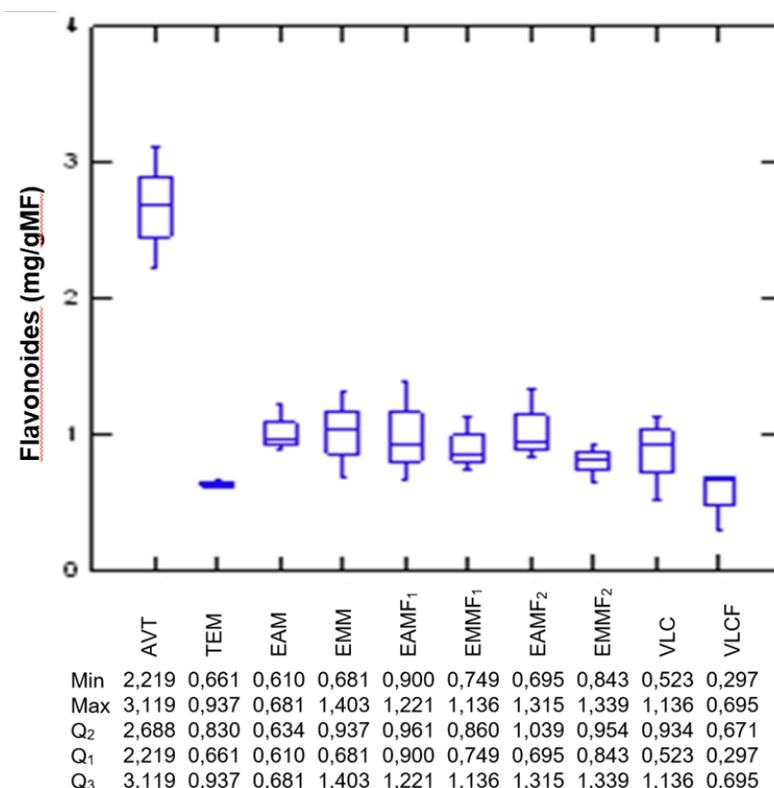


Figure III.22: Présentation en BoxPlot de la teneur en flavonoïdes totaux sous l'effet des traitements

Une analyse type G.L.M a été réalisée pour le facteur traitement. Les résultats graphiques sont consignés dans les figures III. 23 et 24

À partir des résultats obtenus, nous remarquons que le traitement enregistre un effet très significatif sur la teneur en flavonoïdes totaux ( $p < 0,0001$ ) (Figure III.23).

Le test de comparaison multiple Post-Hoc de Tukey, désigne pour la teneur en flavonoïdes totaux, la présence de deux groupes homogènes relatifs aux différents extraits (Figure III.24).

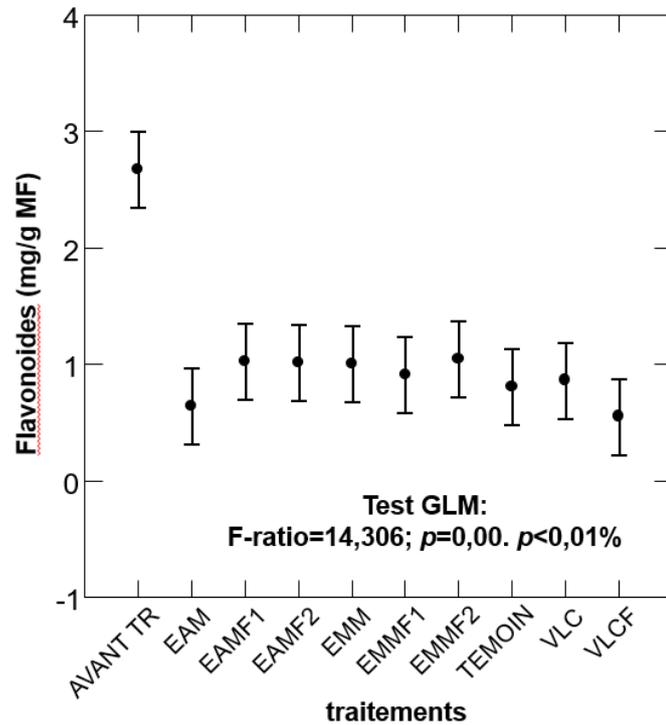


Figure III.23: Analyse de la variance appliquée à la teneur en flavonoïdes totaux sous l'effet des traitements

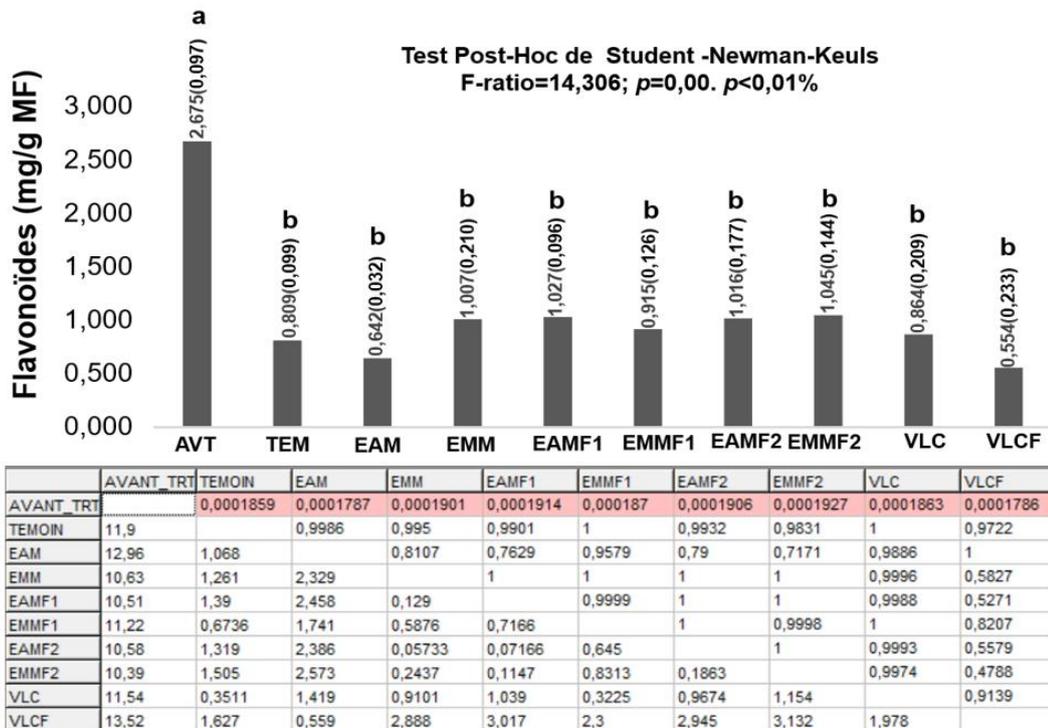


Figure III.24: Etude comparée de la teneur en flavonoïdes totaux sous l'effet des traitements

### III.2.1.4. Etude comparée de la teneur en sucres totaux

La présentation graphique en BoxPlot des données expérimentales est avancée dans le but d'apprécier la variation de la teneur en sucres totaux observée sous l'effet des différents traitements base des extraits de feuilles de *Moringa oleifera* et du jus de vermicompost (Figure III. 25). La comparaison des teneurs observées sous l'effet des différents traitements annonce une similarité des extraits brut et VLC aux conditions naturelles (EAM, EMM et VLC) cependant les extraits formulés (EAMF1, EMMF1, EAMF2, EMMF2) enregistrent des teneurs proches témoin(stressé).

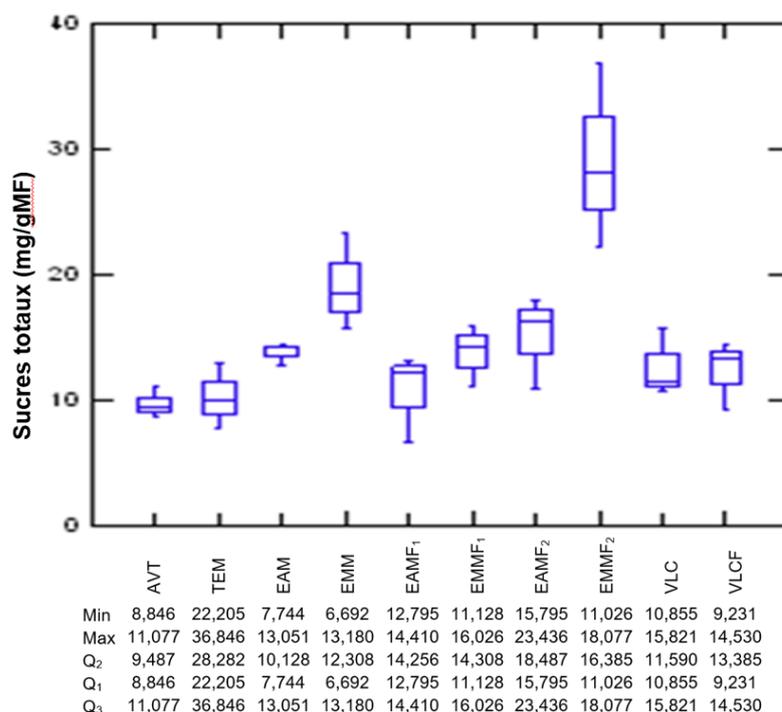


Figure III.25: Présentation en BoxPlot de la teneur en sucres totaux sous l'effet des traitements

Une analyse type G.L.M a été réalisée pour le facteur traitement. Les résultats graphiques sont consignés dans les figures III.26 et 27

À partir des résultats obtenus, nous remarquons que le traitement enregistre un effet très significatif sur la teneur en sucres totaux ( $p < 0,0001$ ) (Figure III.25).

Le test de comparaison multiple Post-Hoc de Tukey, désigne pour la teneur en sucres totaux, la présence de deux groupes homogènes relatifs aux différents extraits (Figure III.27).

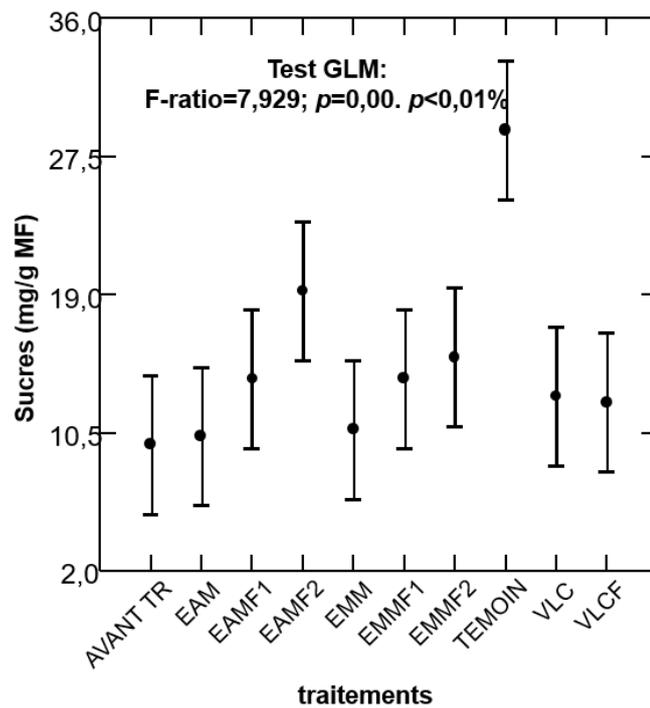


Figure III.26: Analyse de la variance appliquée à la teneur en sucres totaux sous l'effet des traitements

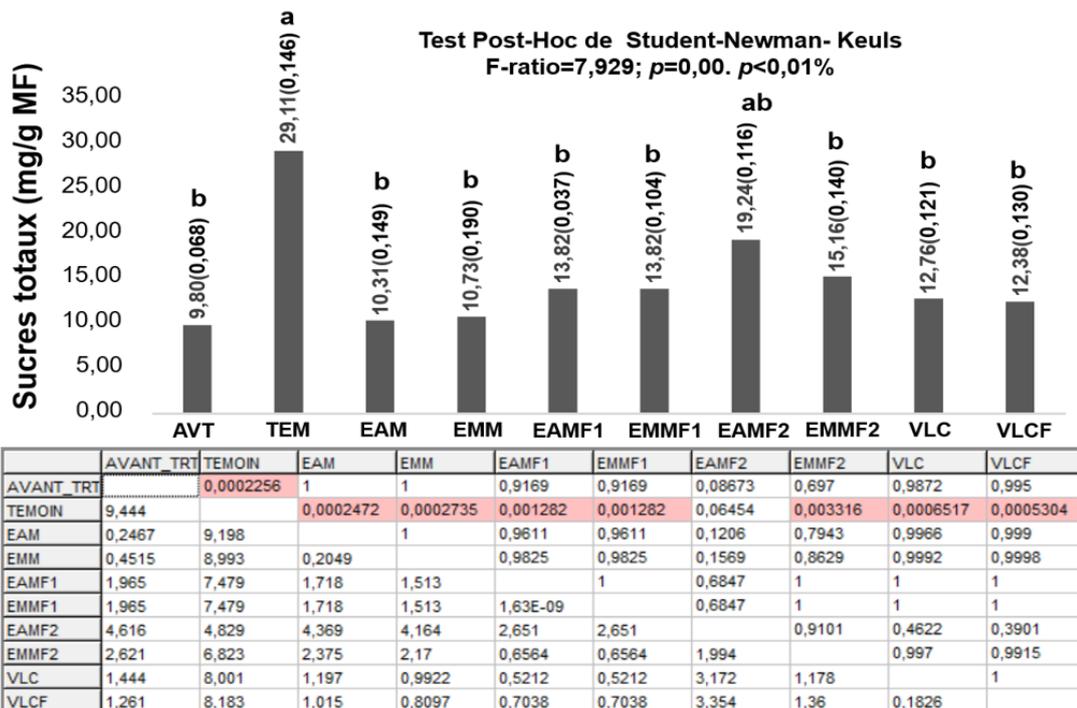


Figure III.27: Etude comparée de la teneur en sucres totaux sous l'effet des traitements

### III.2.1.5. Étude comparée de capacité antioxydante non enzymatique totale CANETE

La présentation graphique en BoxPlot des données expérimentales est avancée dans le but d'apprécier la variation de la capacité antioxydante non enzymatique totale (CANETE) observée sous l'effet des différents traitements base des extraits de feuilles de *Moringa oleifera* et du jus de vermicompost (Figure III.28). La comparaison des teneurs observées sous l'effet des différents traitements annonce une similarité des extraits brut et VLC aux conditions naturelles (EAM, EMM et VLC) cependant les extraits formulés (EAMF1, EMMF1, EAMF2, EMMF2) enregistrent des teneurs proches témoin(stressé).

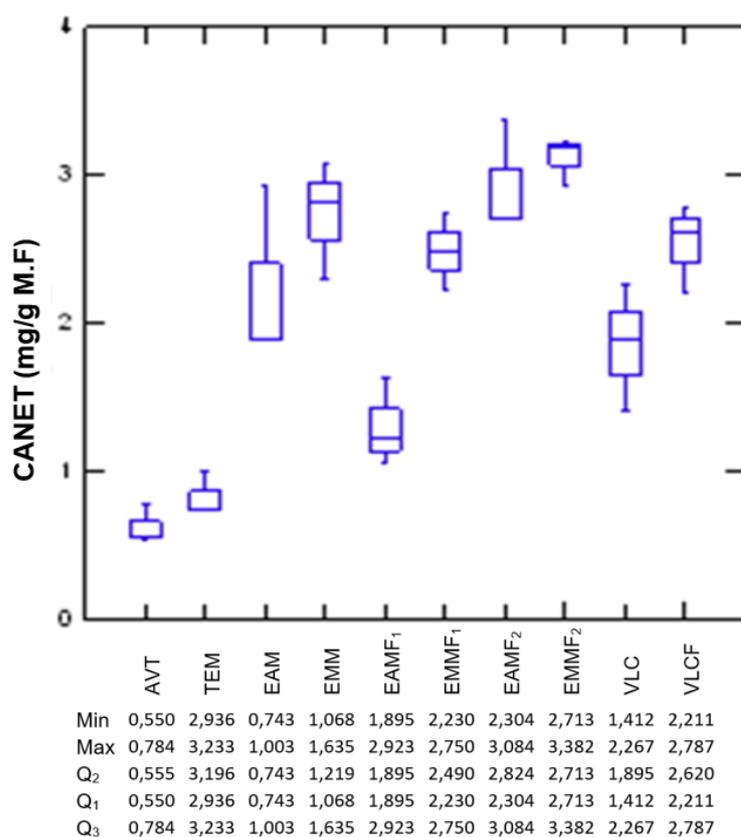


Figure III.28: Présentation en BoxPlot de la capacité antioxydante non enzymatique totale sous l'effet des traitements

Une analyse type G.L.M a été réalisée pour le facteur traitement. Les résultats graphiques sont consignés dans les figures III.29 et 30

À partir des résultats obtenus, nous remarquons que le traitement enregistre un effet très significatif sur la capacité antioxydante non enzymatique totale ( $p < 0,0001$ ) (Figure III.29).

Le test de comparaison multiple Post-Hoc de Tukey, désigne pour la capacité antioxydante non enzymatique totale, la présence de deux groupes homogènes relatifs aux différents extraits (Figure III.30).

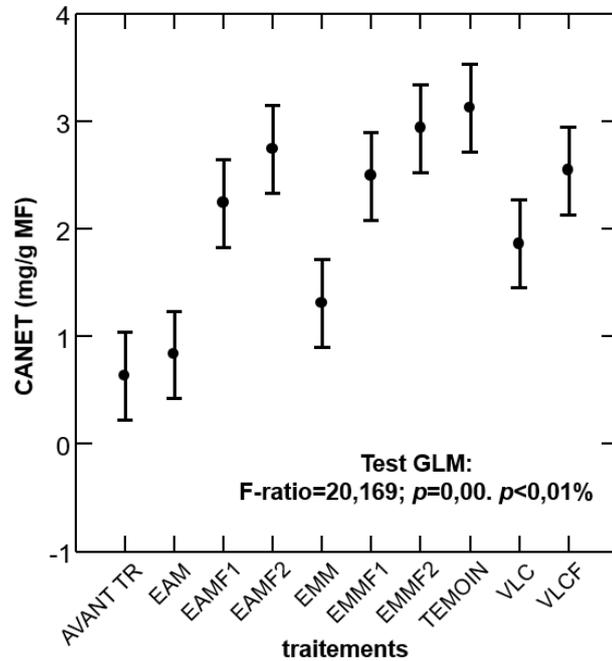


Figure III.29: Analyse de la variance appliquée à la capacité antioxydante non enzymatique totale sous l'effet des traitements

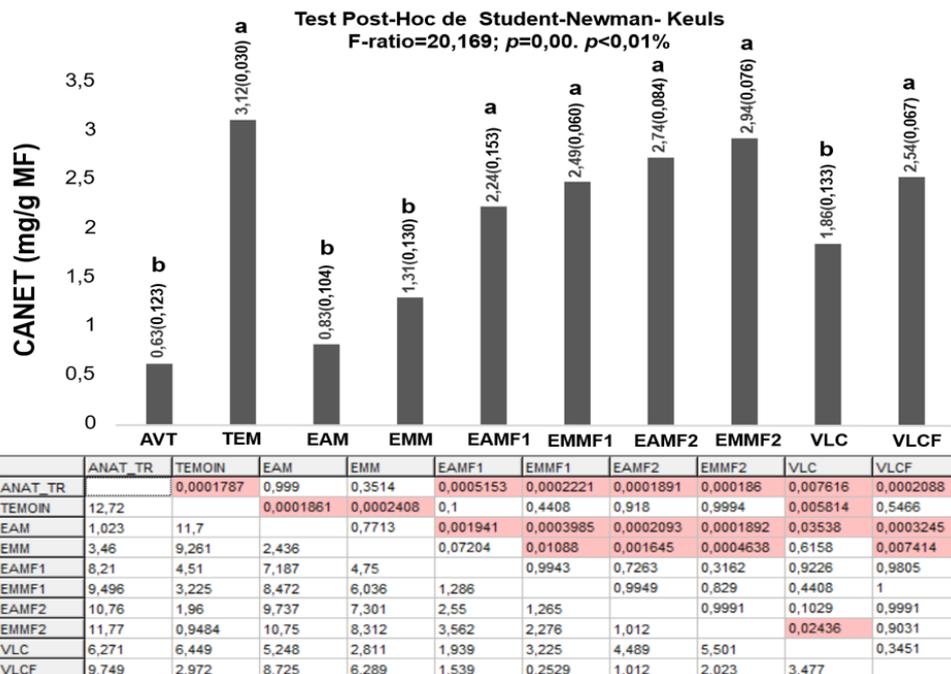


Figure III.30: Etude comparée de la capacité antioxydante non enzymatique totale sous l'effet des traitements

### III.2.1.6. Etude comparée de la teneur en eau

La présentation graphique en BoxPlot des données expérimentales est avancée dans le but d'apprécier la variation de la teneur en eau observée sous l'effet des différents traitements base des extraits de feuilles de *Moringa oleifera* et du jus de vermicompost (Figure III.31). La comparaison des teneurs observées sous l'effet des différents traitements annonce une similarité des extraits brut et VLC aux conditions naturelles (EAM, EMM et VLC) cependant les extraits formulés (EAMF1,EMMF1, EAMF2,EMMF2) enregistrent des teneurs proches témoin(stressé).

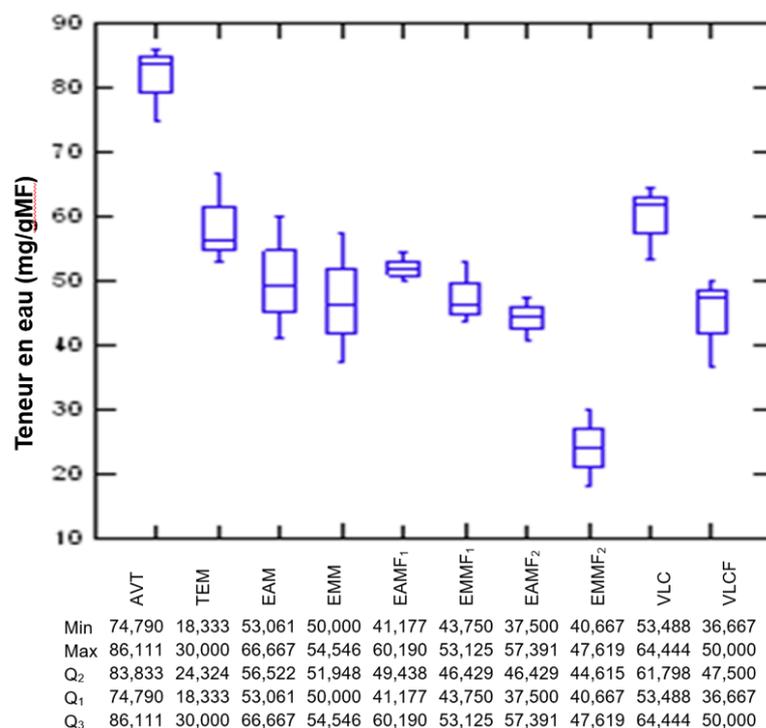


Figure III.31: Présentation en BoxPlot de la teneur en eau sous l'effet des traitements

Une analyse type G.L.M a été réalisée pour le facteur traitement. Les résultats graphiques sont consignés dans les figures III.32 et 33

À partir des résultats obtenus, nous remarquons que le traitement enregistre un effet très significatif sur la teneur en eau ( $p < 0,0001$ ) (Figure III.32).

Le test de comparaison multiple Post-Hoc de Tukey, désigne pour la teneur en eau, la présence de trois groupes homogènes relatifs aux différents extraits (Figure III.33).

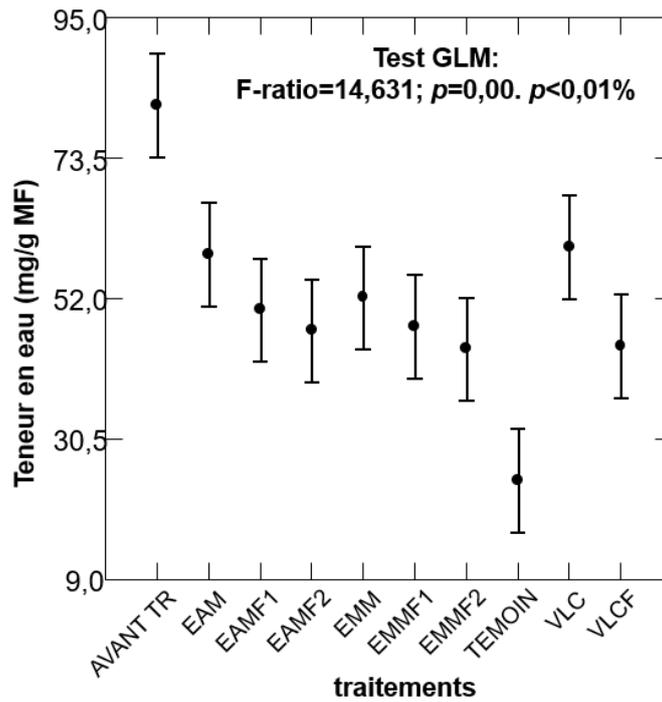


Figure III.32: Analyse de la variance appliquée à la teneur en eau sous l'effet des traitements

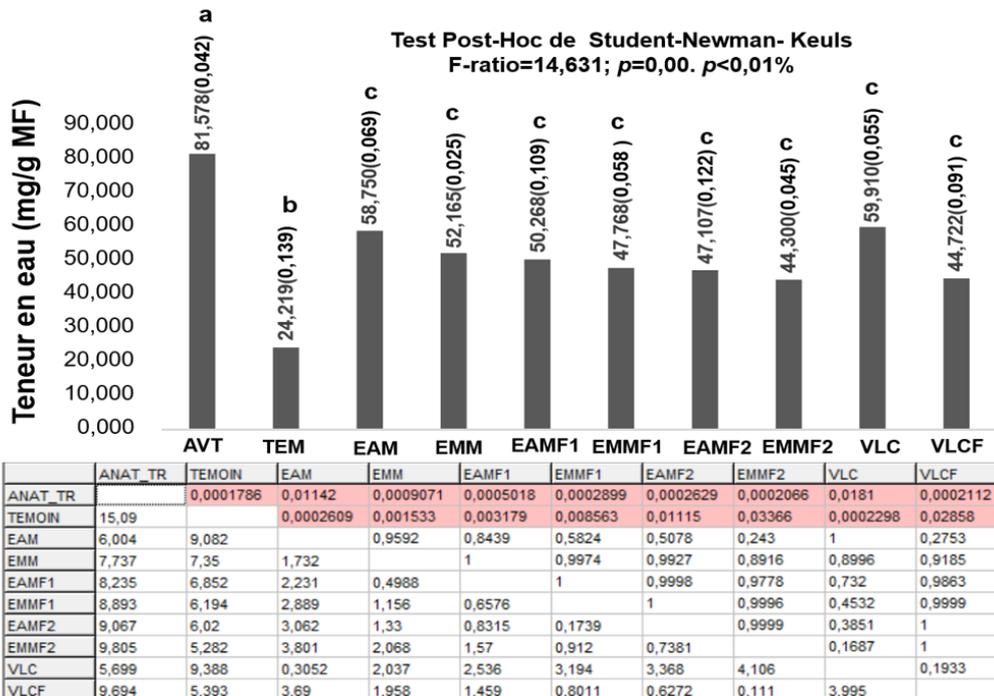


Figure III.33: Etude comparée de la teneur en eau sous l'effet des traitements

### III.2.2. Variation des paramètres morphologiques

#### III.2.2.1. Etude comparée de la longueur de la partie aérienne

La présentation graphique en BoxPlot des données expérimentales est avancée dans le but d'apprécier la variation de la longueur de la partie aérienne observée sous l'effet des différents traitements base des extraits de feuilles de *Moringa oleifera* et du jus de vermicompost (Figure III.34). La comparaison des teneurs observées sous l'effet des différents traitements annonce une similarité des extraits brut et VLC aux conditions naturelles (EAM, EMM et VLC) cependant les extraits formulés (EAMF1,EMMF1, EAMF2,EMMF2) enregistrent des teneurs proches témoin(stressé).

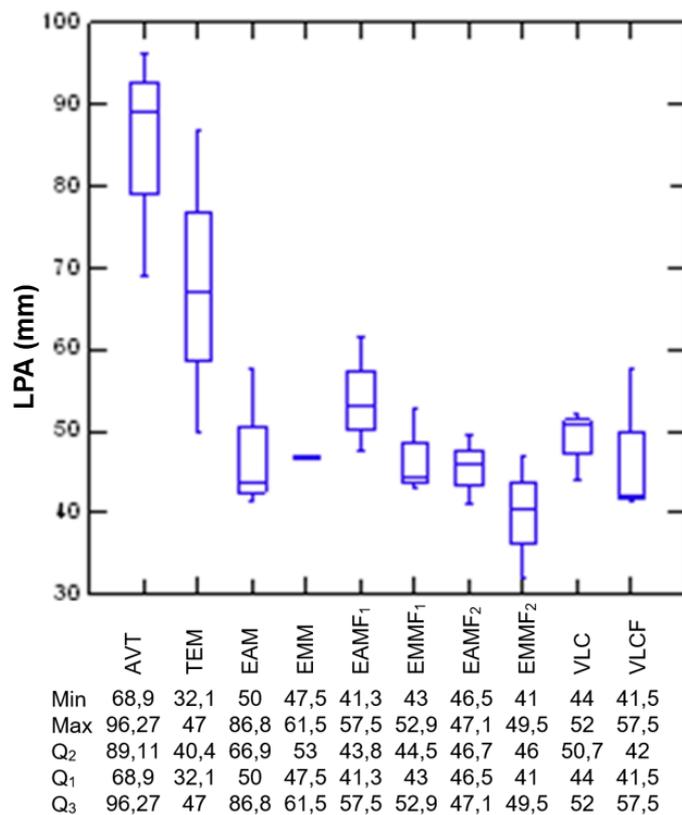


Figure III.34: Présentation en BoxPlot de la longueur de la partie aérienne sous l'effet des traitements

Une analyse type G.L.M a été réalisée pour le facteur traitement. Les résultats graphiques sont consignés dans les figures III.35 et 36.

À partir des résultats obtenus, nous remarquons que le traitement enregistre un effet très significatif sur la longueur de la partie aérienne ( $p < 0,0001$ ) (Figure III.35).

Le test de comparaison multiple Post-Hoc de Tukey, désigne pour la longueur de la partie aérienne, la présence de deux groupes homogènes relatifs aux différents extraits (Figure III.36).

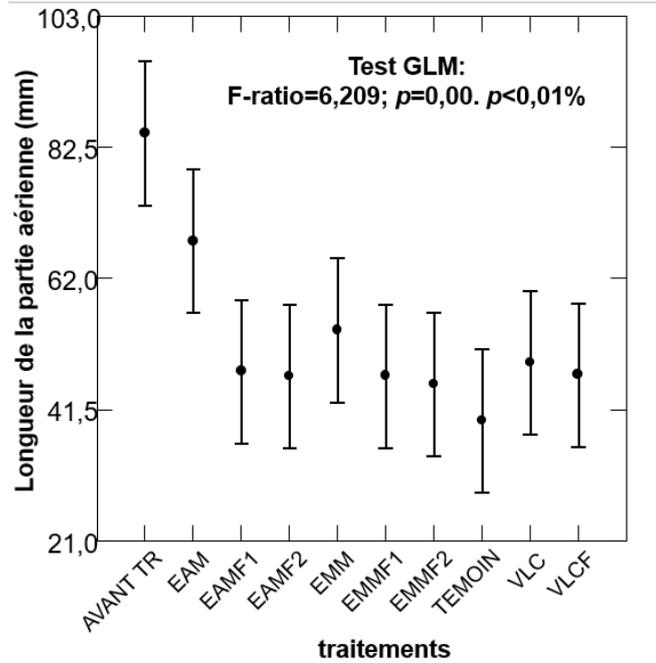


Figure III.35: Analyse de la variance appliquée à la longueur de la partie aérienne sous l'effet des traitements

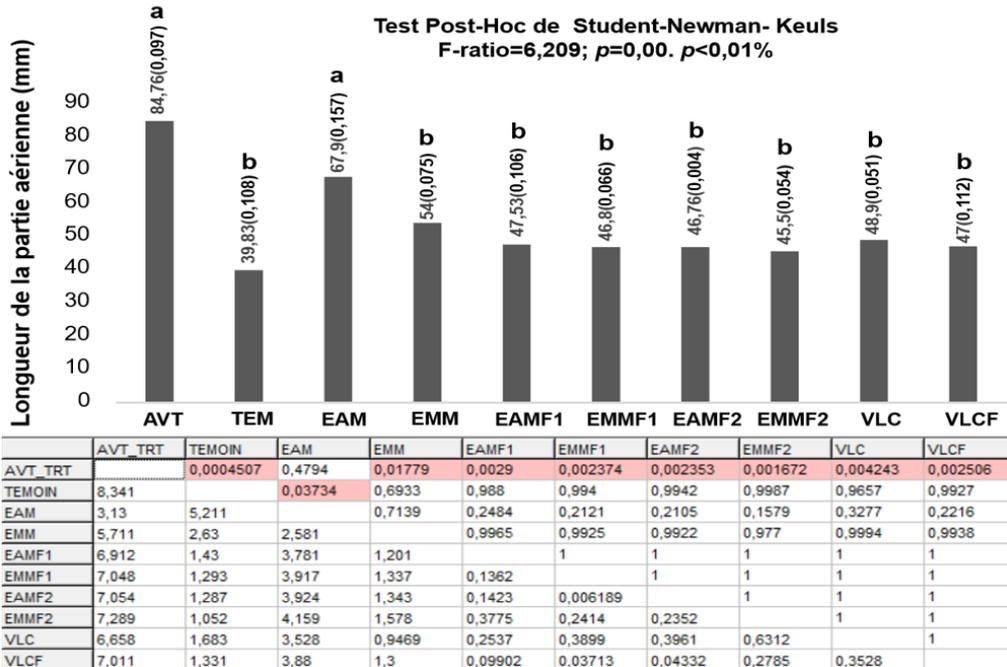


Figure III.36: Etude comparée de la longueur de la partie aérienne sous l'effet des traitements

### III.2.2.2. Etude comparée de la longueur de la partie racinaire

La présentation graphique en BoxPlot des données expérimentales est avancée dans le but d'apprécier la variation de la longueur de la partie racinaire observée sous l'effet des différents traitements base des extraits de feuilles de *Moringa oleifera* et du jus de vermicompost (Figure III.37). La comparaison des teneurs observées sous l'effet des différents traitements annonce une similarité des extraits brut et VLC aux conditions naturelles (EAM, EMM et VLC), cependant les extraits formulés (EAMF1, EMMF1, EAMF2, EMMF2) enregistrent des teneurs proches au témoin (stressé).

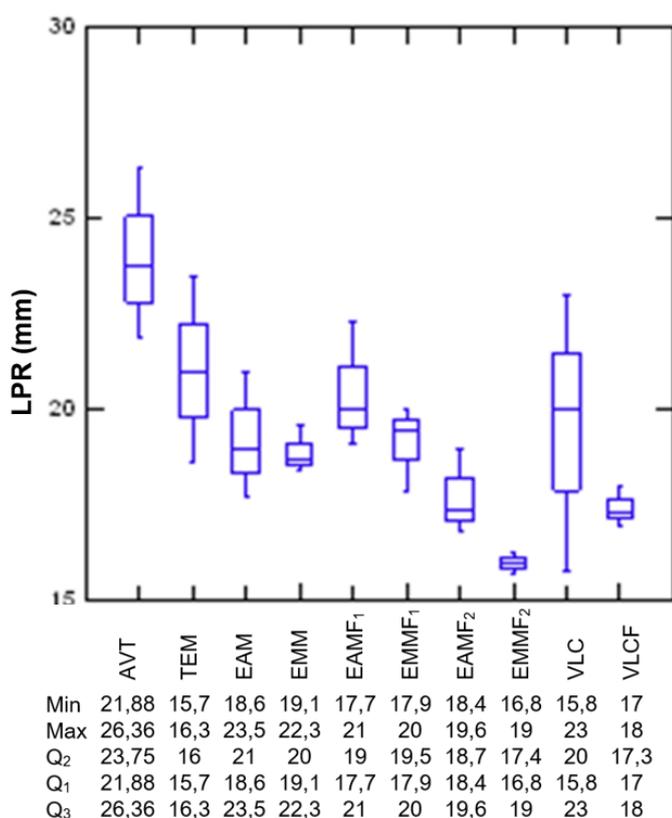


Figure III.37: Présentation en BoxPlot de la longueur de la partie racinaire sous l'effet des traitements

Une analyse type G.L.M a été réalisée pour le facteur traitement. Les résultats graphiques sont consignés dans les figures III.38 et 39.

À partir des résultats obtenus, nous remarquons que le traitement enregistre un effet très significatif sur la longueur de la partie racinaire ( $p < 0,0001$ ) (Figure III.38).

Le test de comparaison multiple Post-Hoc de Tukey, désigne pour la longueur de la partie racinaire, la présence de trois groupes homogènes relatifs aux différents extraits (Figure III.39).

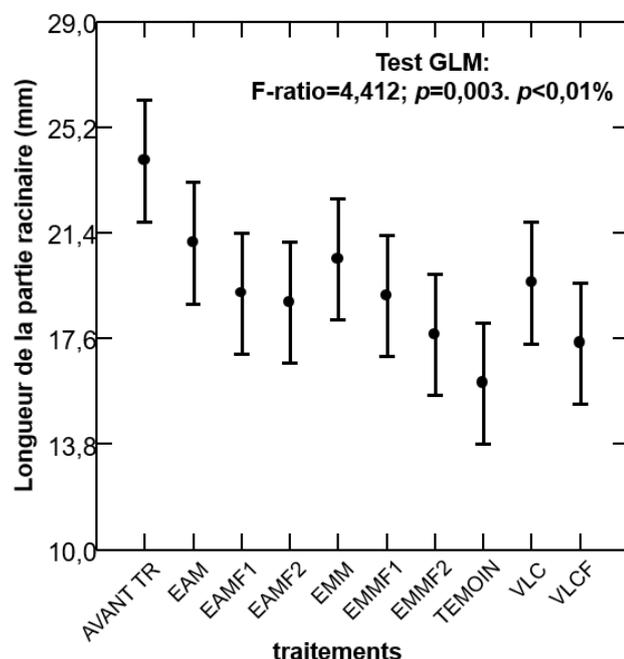


Figure III.38: Analyse de la variance appliquée à la longueur de la partie racinaire sous l'effet des traitements

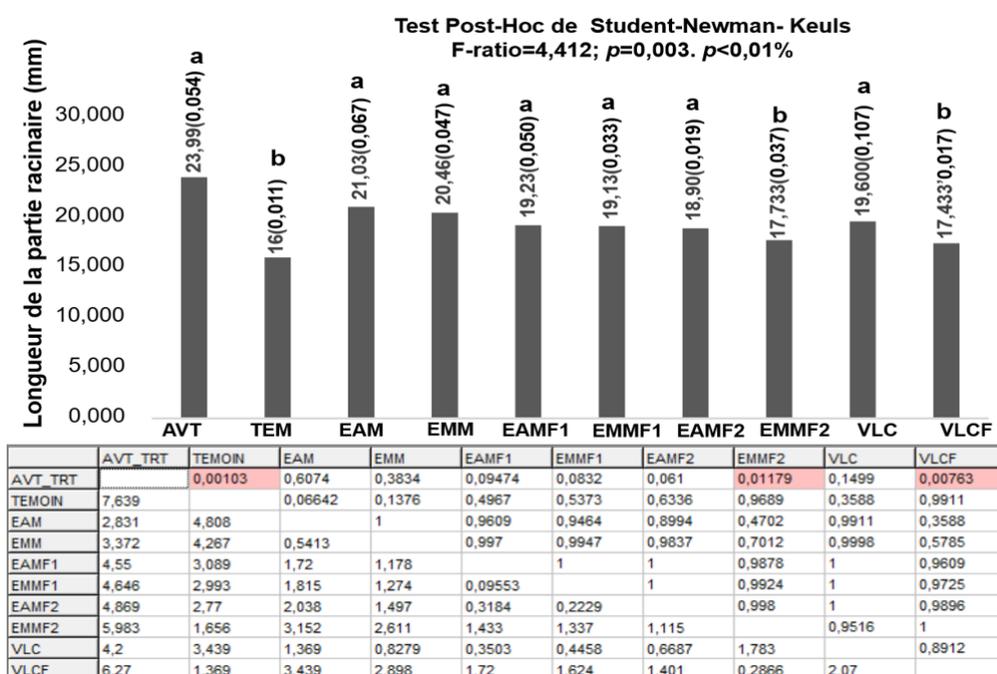


Figure III.39: Etude comparée de la longueur de la partie racinaire sous l'effet des traitements

### III.2.2.3. Etude comparée du nombre de feuilles

La présentation graphique en BoxPlot des données expérimentales est avancée dans le but d'apprécier la variation du nombre de feuilles observée sous l'effet des différents traitements base des extraits de feuilles de *Moringa oleifera* et du jus de vermicompost (Figure III.40). La comparaison des teneurs observées sous l'effet des différents traitements annonce une similarité des extraits brut et VLC aux conditions naturelles (EAM, EMM et VLC), cependant les extraits formulés (EAMF1, EMMF1, EAMF2, EMMF2) enregistrent des teneurs proches au témoin (stressé).

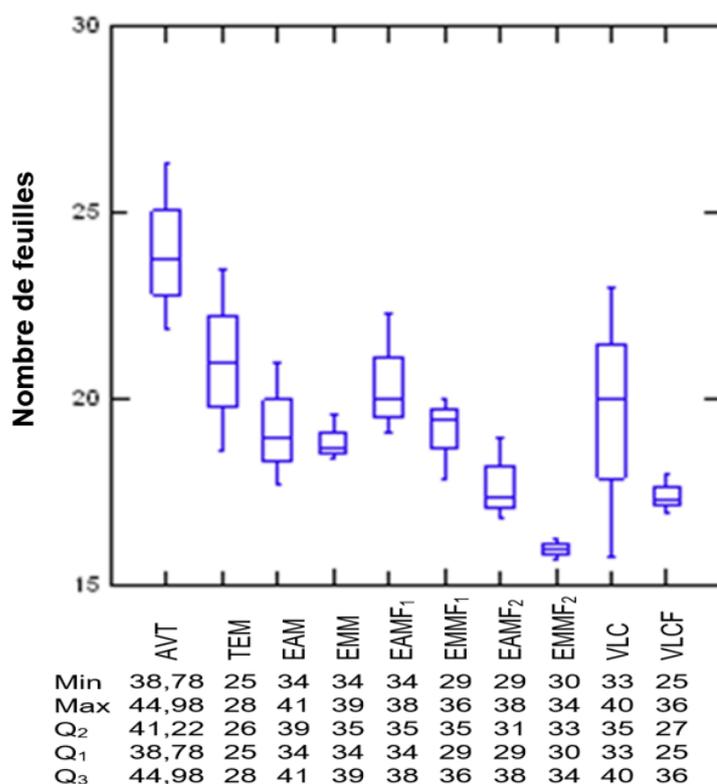


Figure III.40: Présentation en BoxPlot du nombre de feuilles sous l'effet des traitements

Une analyse type G.L.M a été réalisée pour le facteur traitement. Les résultats graphiques sont consignés dans les figures III.41 et 42

À partir des résultats obtenus, nous remarquons que les traitements enregistrent un effet très significatif sur le nombre de feuilles ( $p < 0,0001$ ) (Figure III.41).

Le test de comparaison multiple Post-Hoc de Tukey, désigne pour le nombre de feuilles, la présence de deux groupes homogènes relatifs aux différents extraits (Figure III.42).

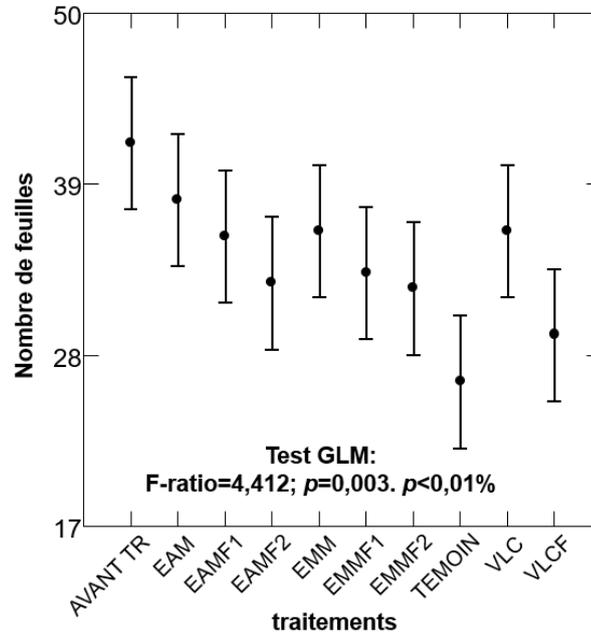


Figure III.41: Analyse de la variance appliquée au nombre de feuilles sous l'effet des traitements

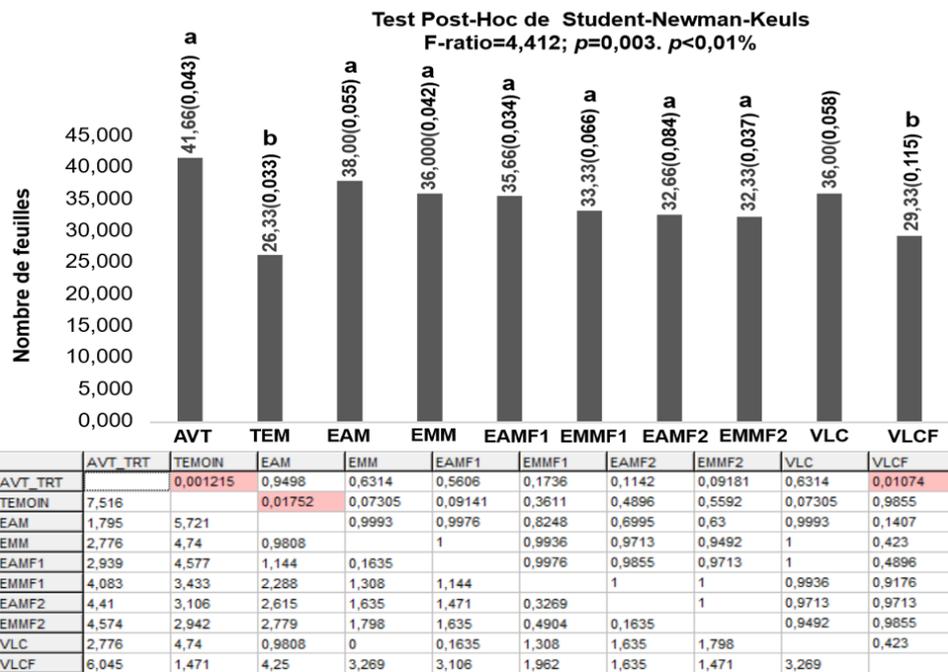


Figure III.42: Etude comparée du nombre de feuilles sous l'effet des traitements

## **Chapitre VI : Discussion générale**

### IV.1. Effet des biostimulants sur les paramètres de germination

Les variations de température, les schémas de précipitations modifiés et les événements météorologiques extrêmes associés au changement climatique peuvent avoir des conséquences néfastes sur la germination des graines. A cet effet, des températures plus élevées peuvent perturber la dormance des graines, réduire leur taux de germination ou même les rendre incapables de germer.

Les biofertilisants sont des substances naturelles utilisées pour améliorer la fertilité des sols et favoriser la croissance des plantes. Leur utilisation peut avoir une influence positive sur la germination des graines. Les biofertilisants contiennent des éléments nutritifs tels que l'azote, le phosphore et le potassium, ainsi que des composés organiques bénéfiques. Il convient de noter que les effets spécifiques des biofertilisants sur la germination des graines peuvent varier en fonction de facteurs tels que le type de biofertilisant utilisé. L'impact positif des biofertilisants sur la germination des graines peut être remarqué à travers la biofourniture des nutriments essentiels, en améliorant la structure du sol et en favorisant un environnement propice à la croissance des plantes [30].

La stimulation de la germination des graines sous les contraintes climatiques et l'amélioration de ses qualités sont considérées comme un challenge pour les chercheurs, car ils représentent un enjeu de haute importance agro-économique. Les extraits de Moringa renferment des propriétés intéressantes, dans la mesure d'innover un bioproduit comme usage, où ce ci sera inclinée vers cette hypothèse. Cette étude œuvre pour démontrer que l'utilisation les extraits de Moringa et leurs dérivés comme agent de priming permettront une augmentation du potentiel de germination des semences. Nombreuse études et dans différentes espèces végétales été démontré que les algues marines [55, 117, 125, 157] améliorent la germination des graines. Accompagné avec la technique de priming, elle ajoute une valeur remarquable. Par références à nos résultats, les graines amorcées par les trois les extraits aqueux

L'extrait de feuilles de *Moringa* contient des substances actives qui peuvent stimuler la germination des graines et la croissance des plantes, comme des hormones végétales, des antioxydants, des enzymes et des minéraux [145]. Plusieurs études ont montré que l'extrait de feuilles de *Moringa* a un effet positif sur la germination des graines de différentes espèces végétales, comme la tomate [186], le maïs [133], le blé [89], le sorgho et le riz. L'extrait de feuilles de *Moringa* augmente le taux de germination, la longueur des racines et des tiges, le poids sec et la teneur en chlorophylle des plantules. Il améliore aussi la résistance au stress hydrique et salin. L'extrait de feuilles de *Moringa* pourrait donc être utilisé comme un activateur naturel et écologique de la croissance des cultures, en complément ou en substitution aux engrais chimiques [190].

La formulation d'un biostimulant brut peut avoir un impact significatif sur son efficacité et son utilisation pratique. L'objectif de notre étude est d'évaluer l'impact de la formulation sur les biofertilisants brut et de tester la concentration adéquate pour chacun. Pour l'extrait aqueux des feuilles de *Moringa oleifera* EAM, et l'extrait méthanolique EMM. Les histogrammes représentent une répartition des valeurs vers la dose 1 D1 pour l'ensemble des paramètres : taux de germination TG, indice de germination IG, vitesse de germination CV, taux d'inhibition TI, longueur de la partie racinaire RL, longueur de la partie aérienne SL, et l'indice de vigueur, ceci nous permet de conclure que une application plus concentrée est nécessaire pour obtenir des résultats rapides et significatifs, cependant une basse concentration contient une quantité réduite d'éléments nutritifs ou de composés actifs et donc ne subviendra pas à stimuler la germination des graines [201],

Pour les produits formulés EAMF1, EMMF1, EAMF2, EMMF2 Les histogrammes représentent une répartition des valeurs vers la dose 4 D4 pour l'ensemble des paramètres: taux de germination TG, indice de germination IG, vitesse de germination CV, taux d'inhibition TI, longueur de la partie racinaire RL, longueur de la partie aérienne SL, et l'indice de vigueur, ceci nous permet de déduire que une application d'une basse concentration d'un produit formulé est suffisante pour subvenir aux besoins de la graine pour germer. De ce fait on peut conclure que la formulation augmente l'efficacité des extraits bruts et nous permet une utilisation modérée de ces produits et donc de minimiser les couts tout en améliorant la qualité du produit, l'utilisation des produits formulés est donc privilégiée

La courbe de tendance montre qu'il y a deux groupes homogènes, le groupe qui contient les valeurs les plus significatives est celui qui comprend les traitements suivants avec une tendance descendante présentés comme suit: VLCB, EAMF2, EMMF2 et le VLCF, , le reste des traitements donnent des valeurs inférieures comparant à ceux du premier groupe, avec une similarité enregistrée pour l'EAM et l'EMM, les traitements de la première formulation EAMF1 et EMMF1 donnent les valeurs les plus inférieures. On peut en déduire que les produits bruts des extraits de feuilles de Moringa n'ont pas de différence significative ce qui nous dirige vers l'utilisation de l'extrait aqueux à la place de l'extrait méthanolique

La première formulation n'a aucune efficacité sur les produits brut mais au contraire elle a diminué l'efficacité des produits, la deuxième formulation a un impact significatif sur l'efficacité et l'utilisation pratique et/ou économique des produits bruts tout en améliorant sa qualité [202], ce qui nous a permis de déduire que la deuxième formulation est beaucoup plus efficace que la première ce qui nous dirige vers l'utilisation de cette dernière

#### IV.2. Effet des biostimulants sur les paramètres morpho-physiologiques

Les extraits de *Moringa oleifera* rend le travail plus intéressant, ses capacités a stimulé tous les paramètres morpho-physiologiques dans la gestion du stress métallique. Ils permettent de projeter la lumière sur une manière pour sécuriser cette matière première (les formulations) et le tester sur une plante modèle *Atriplex halimus*, pour une meilleure exploitation dans le domaine agronomique.

Les premiers résultats de cette étude ont indiqué que les applications foliaires de l'extrait brut de *Moringa oleifera* et les deux formulations ont un effet significatif sur la croissance des parties aériennes et souterraines, ce qui est en accord avec Sabir et al., qui ont testé sur l'*Atriplex sp* l'application de l'extrait d'une algue brune d'*Ascophyllum nodosum* seul a eu un effet significatif sur la croissance générale de la feuille (poids frais, sec et surface de la feuille). Ces différences sont attribuées à l'espèce végétale appliquée, cependant certaines études portant sur les extraits de *Moringa sp* ont rapporté le même effet en améliorant de manière significative la croissance des plantes cultivés comme constaté avec *Moringa oleifera* [190].

Les résultats obtenus dans cette étude ont révélé que l'application de tous les traitements à base de *Moringa oleifera* ont augmenté significativement les paramètres de croissance des feuilles, de l'Atriplex par rapport au témoin, *Moringa oleifera* a un effet positif sur les feuilles émises par l'Atriplex. Des résultats similaires sur l'utilisation de *Moringa oleifera* qui ont augmenté le nombre de branches et de feuilles de tomate [163] et de niébé avec des algues brunes et rouges [191], elles ont amélioré également la croissance des feuilles même sous stress abiotique avec les épinards [120] et que les applications foliaires d'algues en combinaison ou non, augmente la hauteur de la plante et sa croissance [192].

Nos traitements à base de *Moringa oleifera* ont remarquablement augmenté le poids sec et la surface foliaire, nos résultats sont en accord avec l'étude de Wang et al. [193], qui a indiqué que l'utilisation de *Moringa oleifera* augmente la hauteur de la plante et son poids sec, mêmes résultats observés avec Mahmoud et al., [194]. Cet effet positif de notre résultat pourrait être attribué à la synthèse du brut, par exemple, la présence de molécules bioactives solubles dans l'eau [195, 196] comme les hormones (auxines et cytokinines) qui font progresser le développement des plantes par l'expansion de divers événements métaboliques, ce qui peut entraîner l'expansion des feuilles des plantes, comme Hamed et al. [197], l'expliquent : les régulateurs de croissance des plantes changent et traitent la division cellulaire, contrôlent l'extension des racines et la croissance des feuilles des plantes et d'autres capacités métaboliques.

La présente étude met en évidence l'efficacité de F1, qui a la valeur la plus élevée sur presque tous les paramètres de croissance des feuilles par rapport à F2 et au témoin non traitées, ce qui peut être attribué à la composition de la formulation F1 (60% EAM +40% de bio adjuvants) ; le bio adjuvant sécurise l'ingrédient actif (extrait brut de *Moringa oleifera*) d'une manière à assurer la pénétration de tous les éléments présents dans l'extrait dans les feuilles par pulvérisation foliaire, qui permis par la suite une bonne pénétration de l'ingrédient biologique dans les cellules végétales, en raison de la rétention et l'adhésion des gouttelettes qui font un contact élevé entre l'eau - feuilles ce qui participe à augmenter l'activité biologique [198, 199].

Tous les traitements de *Moringa oleifera* (extrait brut et F1) ainsi que le VLC ont eu une efficacité significative sur la quantité du métabolisme basale (métabolites primaires et secondaires) par rapport à celui non traité, ce qui est en accord avec cette

recherche qui a trouvé que *Moringa oleifera* augmente le taux de photosynthèse avec une valeur de 40,6 mg kg<sup>-1</sup> [188], tandis que la valeur de nos résultats est de 40,37 mg kg<sup>-1</sup>. Selvam et Sivakumar, ont montré que *Moringa oleifera* a amélioré les sucres totaux à 2% que les plantes non traitées [201]. Cette augmentation du contenu photosynthétique est due aux différentes compositions des algues comme la bêtaïne, il semble probable que l'action des bêtaïnes ralentisse la dégradation de la chlorophylle des feuilles au lieu d'en augmenter le contenu [118], d'autre part la les polyphénols est présente dans le *Moringa oleifera* [197] .qui peut enrichir les plantes avec des chloroplastes, en outre l'extrait brut de de *Moringa oleifera* contient divers éléments responsable sur l' augmentation de l'interception de la lumière, qui à son tour améliore la photosynthèse comme le “Zn” qui augmente la concentration de la chlorophylle [202].

Nous avons remarqué que l'extrait méthanolique et le et F2 avaient approximativement la même valeur dans les deux expériences. On peut suggérer F2 comme traitement pour augmenter la teneur en eau, d'un côté l'indice d'activité est optimisé à 60% dans la formulation, contrairement à l'utilisation de l'extrait brut qui garde la matière première à 100%, et d'un autre coté on peut obtenir un produit sûr écologiquement avec une efficacité élevée [198].

Les résultats affichent que les traitements de EAM ; EMM ; EAMF1, EAMF2, EMMF1, VLC et VLCF ont un effet remarquable sur les métabolites primaires et secondaires du le plant ; ces résultats affichent que le EAM expose un effet important sur la synthèse de composés phénoliques totaux (CPT). Celui-ci est également impliqué avec EMM, VLC et VLCF pour réduire la proline libre endogène. Concernant l'effet des traitements sur la synthèse des sucres totaux, les taux les plus importants sont enregistrés sous EMMF2.

Tandis que l'effet de tous les traitements y compris EAM, EMM, EAMF1, EMMF1, EAMF2, EMMF2, VLC, VLCF sur le maintien de flavonoïdes totaux et les CANETE n'est pas clairement établie car aucune différence significative n'a été marquée dans les analyses statistiques.

On se basant sur l'hypothèse avancée, nous pouvons l'accordée avec les travaux de plusieurs chercheurs comme Solmaz et al. [207], qui confirment que l'utilisation du jus de vermicompost est une importante source de matière organique pour la

régénération et la prévention de la pollution par les métaux lourds. Selon Vernieri et al. [209], les biostimulants sont des substances naturelles capables de favoriser la croissance végétative, l'absorption minérale des nutriments, la réponse des plantes à différentes conditions pédoclimatiques et la tolérance aux stress abiotiques.

Beaucoup des travaux et des résultats similaires ont été trouvés par divers auteurs qui ont étudié l'effet de l'extrait de *Moringa* sur différents stress des plantes tel que Basra et al. [210]; que Les feuilles de *Moringa* contiennent de nombreux composés bénéfiques pour la croissance des plantes. Lorsqu'elles sont utilisées sous forme d'extrait, à une dose appropriée, elles favorisent la croissance, réduisent les effets du stress biotique et abiotique, et peuvent même améliorer la qualité et le rendement des cultures. Foidl et al. [211], ont été les premiers à découvrir que les feuilles de *Moringa* contiennent une grande quantité d'hormones de croissance, d'antioxydants et de minéraux. Ils ont également constaté que l'utilisation d'une solution aqueuse diluée à base de feuilles tendres de moringa peut augmenter le rendement de nombreuses cultures jusqu'à 35%.

Les résultats affichent que les traitements de EAM ; EMM ; EAMF1, EAMF2, EMMF1, VLC et VLCF ont un effet remarquable sur la croissance et la biomasse aérienne et souterraine des plantes d'*A. halimus*; ces résultats affichent que le VLC, VLCF, EAM et EMM expose un effet important sur la teneur en eau (TE). Celui-ci est également impliqué avec EMM, EAMF1, EAMF2, EMMF2 VLC et VLCF pour augmenter la surface des feuilles des plants *A. halimus*. Tandis que l'effet de tous les traitements y a compris EAM, EMM, EAMF1, EMMF1, EAMF2, EMMF2, VLC, VLCF montre un effet très remarquable sur le maintien de la longueur de la partie aérienne et souterraine dans les analyses statistiques. Les résultats concernant la teneur en eau et la croissance et la biomasse aérienne et souterraine des plants d'*Atriplex halimus* affichent nettement une gradation positive sous l'effet du jus de vermicompost et l'extrait de moringa avec ces formulations. Ces résultats sont conformes à ceux d'Elzaawely et al. [198], qui confirment que l'utilisation du L'extrait des feuilles de moringa contient des antioxydants naturels puissants qui peuvent être utilisés par les producteurs de cultures pour améliorer la croissance et les attributs de rendement de diverses cultures et pour surmonter les stress environnementaux. Plusieurs recherches ont démontré que l'extrait de feuilles de *Moringa* a un impact positif sur le processus de germination de diverses espèces végétales, notamment la tomate [98],

le maïs [101], le blé (FAO), le sorgho et le riz. L'utilisation de l'extrait de feuilles de Moringa se traduit par une augmentation du taux de germination, de la longueur des racines et des tiges, du poids sec, ainsi que de la teneur en chlorophylle des jeunes plants. De plus, il renforce la capacité des plantules à faire face au stress hydrique et salin. D'autre part, Al-Karaki et *al.* [115] a évalué l'effet du vermicompost sur la croissance des plantes de d'Atriplex soumises à un stress salin ou métallique. Les résultats ont montré que le vermicompost peut aider à améliorer la croissance des plantes de d'Atriplex sous stress salin ou métallique en fournissant des nutriments essentiels et en améliorant la structure du sol. Les micro-organismes bénéfiques présents dans le vermicompost peuvent également favoriser la santé du système racinaire, ce qui est crucial pour absorber les nutriments et l'eau, même dans des conditions de stress. Beaucoup de travaux et résultats similaire ont été trouvés par divers auteurs qui ont étudié l'effet du vermicompost sur la croissance des plantes, tel que Kaur et *al.* [89], qui ont évalué l'effet du vermicompost sur la croissance, les réponses physiologiques et l'absorption de métaux de la plante de tournesol soumise à un stress de cadmium et de zinc. Les résultats ont montré que le vermicompost a amélioré la croissance et la tolérance aux métaux lourds et Bouzidi et Baouni [156], sur plantes du haricot et Arancon et *al.* [200], sur la culture de fraisier. Ils ont démontré que le vermicompost a un potentiel considérable pour améliorer significativement la croissance des plantes. Les résultats obtenus nous permettent d'avancer l'hypothèse que les produits utilisés possèdent des éléments nutritifs très importants (VLC riche en hormones, l'extrait de Moringa riche en vitamine et les oligoéléments) qui permet d'influencer le taux en proline, sucres CPT et CANETE et la croissance des plantes d'Atriplex pendant la période de stress métallique.

## CONCLUSION

La pollution, en particulier celle causée par les éléments de trace métallique, représente un problème mondial grave et dangereux. Ces métaux peuvent s'accumuler dans l'environnement, rendant les sols et les eaux potentiellement toxiques pour les plantes, les animaux et les humains. Les effets de la pollution par les métaux lourds sur les plantes sont multiples : altération de la croissance, réduction de la photosynthèse, déséquilibre nutritionnel, perturbation du métabolisme, etc. Cela compromet non seulement la productivité agricole, mais aussi la sécurité alimentaire et la biodiversité. Au terme de gestion du stress métallique en évaluant les effets de différentes formulations de jus de vermicompost et les extraits de *Moringa oleifera* sur les paramètres de croissance et de la production ainsi que les paramètres biochimiques. Afin d'améliorer la capacité de tolérance et accumulation des éléments de trace métallique de l'*Atriplex halimus*, Les résultats obtenus montrent que les traitements de EAM ; EMM ; EAMF1, EAMF2, EMMF1, VLC et VLCF ont un effet remarquable sur les métabolites primaires et secondaires et même sur les traits des paramètres biochimiques du le plant par rapport aux autres traitements. Les biofertilisants représentent une solution prometteuse pour atténuer ce problème, et à propos de notre résultat on peut citer que les biofertilisants à base de *Moringa*, de jus vermicompost. Ils aident à stimuler la croissance des plantes en optimisant l'absorption des nutriments et à renforcer la résistance des plantes aux stress environnementaux. L'utilisation de ces biofertilisants offre donc une alternative viable aux engrais chimiques et permet de réduire considérablement les effets néfastes de la pollution par les métaux lourds sur les plantes. Cela favorise une agriculture plus durable et écologique, tout en préservant la santé des écosystèmes et des êtres vivants. Il serait intéressant d'orienter les recherches vers la réalisation des études approfondies sur l'application des biofertilisants avec différentes formulations et concentrations et ceci pour une bonne optimisation de la diminution des effets du stress métallique sur les plantes et l'environnement.

Il sera judicieux par ailleurs, d'affiner cette recherche avec des expérimentations ultérieures qui pourront nous amener à mieux cerner les effets de biofertilisants sur le stress environnemental des plantes en réalisant un **Développement de produits biologiques pour la gestion des plantes est une avenue intéressante à explorer.**

Il serait également approprié **d'évaluer d'autres paramètres plus affinés tels que le volet OMIX pour avoir une vision globale des effets des biostimulants sur la gestion des stress environnementaux.**

En conclusion, il est essentiel de reconnaître l'importance de la formulation sur les biostimulants et l'influence de la concentration sur l'utilisation de ces derniers. Les discussions précédentes ont souligné que l'utilisation de la deuxième formulation avait un impact significatif sur l'efficacité et l'utilisation pratique des produits bruts sur la germination des graines d'*Atriplex halimus*. A la lumière de nos résultats, quelques conclusions générales peuvent être tirées : (i) les extraits de feuilles de *Moringa oleifera* ont un effet remarquable sur la stimulation de la germination des graines cela met en évidence l'importance d'utiliser les poudres de plantes et les extraits végétaux dans la fabrication des bioproduits, (ii) le jus de vermicompost connu avec ses avantages très nombreux et pour sa richesse en nutriments essentiels tels que l'azote, le phosphore, le potassium, les oligo-éléments et les enzymes bénéfiques pour les plantes cela souligne l'importance de son utilisation dans une culture durable, (iii) les biofertilisants formulés offrent une alternative respectueuse de l'environnement aux engrais chimiques conventionnels. Cela souligne que leur utilisation permet d'améliorer la fertilité du sol, d'augmenter la croissance des plantes, renforcer leur résistance et de favoriser une agriculture durable.

En fin il convient de noter que l'utilisation des formulations pour le développement d'un biofertilisant donné est un sujet complexe et en constante évolution. Il est donc essentiel de poursuivre les recherches et les actions dans ce domaine afin de booster l'effet des biofertilisants formulés et d'augmenter leurs efficacités. Nos résultats ont mis en évidence l'importance des formulations et ont fournis des aperçus importants sur leurs rôles associés aux principes actifs d'origine naturelle. Ces conclusions générales fournissent une base solide pour une réflexion continue et des actions futures visant à développer les bioproduits, en faveur d'une agriculture durable.

Les différentes formulations extraites peuvent être recommandé aux producteurs pour obtenir une meilleure germination, croissance et rendement des plantes cultivables.

Bien que les résultats de la présente étude semblent encourageante, le présent travail comporte quelques limites relatives à l'étendue des effets de l'extrait *Moringa oleifera* sur le pouvoir germinatif et l'atténuation du stress métallique d'autres techniques

analytiques semblent être nécessaires afin d'explorer le mécanisme d'action des molécules bioactives contenues de ce dernier.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC), (2013). Changements climatiques 2013, les éléments scientifiques - Résumé à l'intention des décideurs. Contribution du groupe de travail I au cinquième rapport d'évaluation du groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat, 27p
2. Fenner M. & Thompson K. (2005). The ecology of seeds. Cambridge: Cambridge University Press 142 p.
3. Bradford K. J. (2002). Applications of Hydrothermal Time to Quantifying and Modeling Seed Germination and Dormancy. *Weed Sci.*; 50:248–260.
4. Steinmaus S.J., Prather T.S. & Holt J.S. (2000). Estimation of Base Temperatures for Nine Weed Species. *J. Exp. Bot.*; 51:275–286. doi:10.1093/jexbot/51.343.275.]
5. Ahmed L.Q., Durand J.-L. & Gutiérrez A. E. (2015). Températures extrêmes et variabilité de la germination. Conférence : Adaptation des prairies semées au changement Climatique, Poitiers-France. DOI:10.13140/RG.2.1.4591.3681
6. Ahmad. F., Ahmad I. & Khan M.S. (2006). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbial. Res.*, 36:1-9.
7. Zhao, T.J.; Liu, Y.; Yan, Y.B.; Feng, F.; Liu, W.Q. & Zhou, H.M. (2007). Identification of the Amino Acids Crucial for the Activities of Drought Responsive Element Binding Factors (DREBs) of *Brassica napus*. *FEBS Lett.*; 581:3044–3050.
8. Okcu G.; Kaya M.D. & Atak M. (2005). Effects of Salt and Drought Stresses on Germination and Seedling Growth Pea (*Pisum sativum* L.). *Turk. J. Agric. For.*; 29:237–242.
9. Marjanović-Jeromela, A.; Nagl, N.; Gvozdanović-Varga, J.; Hristov, N.; Kondić-Špika, A.; Vasić, M. & Marinković, R. (2011). Genotype by Environment Interaction for Seed Yield per Plant in Rapeseed Using AMMI Model. *Pesq. Agropec. Bras. Brasilia* ; 46 :174–181.
10. De Figueiredo E., Albuquerque, M.C. & De Carvalho, N.M. (2003). Effect of the Type of Environmental Stress on the Emergence of Sunflower (*Heliantus Annus* L.), Soybean (*Glycine Max* (L.) Merrill) and Maize (*Zea Mays* L.) Seeds with Different Levels of Vigor. *Seed Sci. Technol.*, 31:465–479.
11. Ali, A.S. & Elozeiri, A.A. (2017). Metabolic Processes During Seed Germination. In *Advances in Seed Biology*; InTech: London, UK,
12. Nonogaki, H.; Bassel, G.W. & Bewley, J.D. (2010). Germination-Still a Mystery. *Plant Sci.*, 179, 574–581.
13. Szczerba, A.; Płazek, A.; Pastuszak, J.; Kopeć, P.; Horny ´ák, M. & Dubert, F. (2021). Effect of Low Temperature on Germination, Growth, and Seed Yield of Four Soybean (*Glycine Max* L.) Cultivars. *Agronomy*, 11: 800.
14. Miransari, M. & Smith, D.L. (2014). Plant Hormones and Seed Germination. *Environ. Exp. Bot.*, 99:110–121.
15. Bhardwaj, D.; Wahid Ansari, M.; Kumar Sahoo, R. & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers Function as Key Player in Sustainable Agriculture by Improving Soil Fertility, Plant Tolerance and Crop Productivity. *Microbial Cell Factories*, 13:66.
16. Savaedi, Z.; Parmoon, G.; Moosavi, S.A. & Bakhshande, A. (2019). The Role of Light and Gibberellic Acid on Cardinal Temperatures and Thermal Time Required for Germination of Charnushka (*Nigella sativa*) Seed. *Ind. Crops Prod.*, 132: 140–149.

17. Pill W.G. & Finch-Savage W.E. (1998). Effects of combining priming and plant growth regulator treatments on the synchronization of carrot seed germination. *Ann. Appl. Biol.*, 113: 383–389
18. Halmer P. (2004). Methods to improve seed performance in the field. In: Benech-Arnold, R.L., R.A. Sanchez (eds.), *Handbook of Seed Physiology*, pp: 125–166. New York, Food Products Press, The Harworth Press, Inc
19. Murray G.A. (1990). Priming sweet corn seed to improve emergence under cool conditions. *Hort. Sci.*, 25: 231–232
20. Fuglie L.J. (1999). *The Miracle Tree: Moringa oleifera: Natural Nutrition for the Tropics*, Church World Service, Dakar, 68 p.
21. Foidl, N., Makkar H.P.S. & Becker K. (2001). The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. In: Fuglie, L.J. (eds.), *The Miracle Tree: The Multiple Attributes of Moringa*, pp: 45–76. Wageningen, The Netherlands
22. Noctor G. & Foyer C.H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 249–279
23. Stengel P. et Gelin S., 1998 *Sol interface fragile* Ed. INRA- Paris. 213p.
24. Bethemont J. — *Les grands fleuves. Entre nature et société*. Collection U, Armand Colin, Paris, 1999, 255 p. <https://doi.org/10.4000/rge.2717>
25. Sedairia Loubna, Fares Randa, (2021) stress biotique sur *Atriplex halimus* L : effet des métaux lourds et caractérisation des biomarqueurs stress biotique sur *Atriplex halimus* L : effet des métaux lourds et caractérisation des biomarqueurs , Université laarbi tebessi tebessa, <http://dspace.univ-tebessa.dz:8080/jspui/handle/123456789/http://localhost:8080/jspui/handle/123456789/683>
26. Jay Giri, Akhilesh K. Sista, Ido Weinberg, Clive Kearon, Dharam J. Kumbhani, Nimesh D. Desai, Gregory Piazza, Mark T. Gladwin, Saurav Chatterjee, Taisei Kobayashi, Christopher Kabrhel, Geoffrey D. Barnes and On behalf of the American Heart Association Council on Peripheral Vascular Disease; Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology; Council on Cardiopulmonary, Critical Care, Perioperative and Resuscitation; and Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia. (2019), 140: e774–e801, <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000707>
27. Surbhi Kumawat, Surbhi Kumawat, Nitika Rana, Ruchi Bansal, Gautam Vishwakarma, Sayaji T. Mehetre, Bikram Kishore Das, Manish Kumar, Satish Kumar Yadav, Humira Sonah, Tilak Raj Sharma, and Rupesh Deshmukh. Expanding Avenue of Fast Neutron Mediated Mutagenesis for Crop Improvement. *Plants* 2019, 8(6), 164; <https://doi.org/10.3390/plants8060164>
28. Miquel G., 2001. Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. <http://www.senat.fr/rap/l00-261/l00-261.html>.
29. Alloway B.J., 1995. Soil processes and the behaviour of heavy metals. In: *Heavy metals in soils*. Alloway, B.J., Chapman & Hall, London, 368 p.
30. Baize D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). *References et stratégies d'exploitation*. INRA, Paris, 410 p.
31. Pais I., Benton Jones J., 2000. *The Handbook of Trace Elements*. Boca Raton, FL, St. Lucie Press, 223 p.

32. Adriano D.C., 2001. Trace elements in the Terrestrial Environments. Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals (2nd Ed). Springer Verlag, New York, 866 p.
33. Frangi J.P., Richard D., 1997. Heavy metal soil pollution cartography in northern France. *Sci. Total Environ.*, 205 : 71–79.
34. Sterckeman T., Douay F., Proix N., Fourrier H., 2000. Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environ. Pollut.*, 107 : 377–389.
35. Sterckeman T., Douay F., Proix N., Fourrier H., Perdrix E., 2002. Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. *Water Air Soil Pollut.*, 135 : 173–194.
36. Baize D., Tercé M., 2002. Les elements traces metalliques dans les sols : Approches fonctionnelles et spatiales. Quae, France, 570 p.
37. Douay F., Roussel H., Pruvot C., Waterlot C., 2008a. Impact of a smelter closedown on metal contents of wheat cultivated in the neighbourhood. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 15: 162-169.
38. Douay F., Pruvot C., Roussel H., Ciesielski H., Fourrier H., Proix N., 2008b. Contamination of urban soils in an area of northern France polluted by dust emissions of two smelters. *Water Air Soil Pollut.*, 188: 247-260.
39. Des Ligneris L., Douay F., Sterckeman T., 1999. Programme de Recherches Concertées. Environnement et Activités humaines. Etude d'un secteur pollue par les métaux. 1ere partie : Teneurs en métaux (Pb, Cd et Zn) de végétaux cultivés dans les exploitations agricoles et les jardins familiaux. Ministère de - 162 - l'Enseignement Superieur et de la Recherche. FEDER, Region Nord-Pas de Calais. 130 p.
40. Bourrelier P.H., Berthelin J., 1998. Contamination des sols par les éléments traces : les risques et leur gestion. Rapport n°42 de l'Academie des Sciences, Tec. & Doc., Lavoisier, 440 p.
41. Greger M., 2004. Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. In: Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems (2<sup>nd</sup> Ed.), Prasad M.N.V., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1-27.
42. Bargagli R., 1998. Trace elements in terrestrial plants. An ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery. Springer Verlag, New York, 324 p.
43. Ross S.M., 1994. Toxic metals in soil-plant systems. Wiley, Chichester, 469 p.
44. Barber S.A, 1995. Soil nutrient bioavailability, a mechanistic approach (2nd Ed.). Wiley-Interscience, New York, 414 p.
45. Duchaufour P., 2001. Introduction à la science du sol: Sol, vegetation, environnement. Dunod, Paris, 331 p.
46. Tresmel-Schaub A., Feix I., 2005. Contamination des sols. Transfert des sols vers les plantes. EDP Sciences/Ademe, France, 413 p.
47. Loué A., 1993. Les oligo-elements en agriculture (2nd Ed.). SCPA, Agri-Nathan International, Paris, 577 p.
48. Hettiarachchi G.M., Pierzynski G.M., 2002. In situ stabilization of soil lead using phosphorus and manganese oxide: influence of plant growth. *J. Environ. Quality*, 31: 564-572.
49. Eick M.J., Peak J.D., Brady P.V., Pesek J.D., 1999. Kinetics of lead adsorption/desorption on goethite: residence time effect. *Soil Sci.*, 164: 28-39.
50. Badawy S.H., Helal M.I.D., Chaudri A.M., Lawlor K., McGrath S.P., 2002. Soil solid-phase controls lead activity in soil solution. *J. Environ. Qual.*, 31: 162- 167.

51. Whiting S.N., de Souza M.P., Terry N., 2001. Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environ. Sci. Technol.*, 15: 3144-3150.
52. Lors C., Tiffreau C., Laboudigue A., 2004. Effects of bacterial activities on the release of heavy metals from contaminated dredged sediments. *Chemosphere*, 56: 619-630.
53. He L.Y., Chen Z.J., Ren G.D., Zhang Y.F., Qian M., Sheng X.F., 2009. Increased cadmium and lead uptake of a cadmium hyperaccumulator tomato by cadmium-resistant bacteria. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72: 1343-1348.
54. Li X.L., Marschner H., George F., 1991. Acquisition of phosphorus and copper by VA-mycorrhizal hyphae and root to shoot transport in white clover. *Plant Soil*, 136: 49- 57.
55. Lamand M., 1991. Les oligoelements dans la biosphere. In : Les oligoelements en medecine et biologie. Chappuis P., Tec. & Doc., Lavoisier, pp. 25-39.
56. Zhang S., Hu F., Li H., 2009. Effects of earthworm mucus and amino acids on cadmium subcellular distribution and chemical forms in tomato seedlings. *Bioresour. Technol.*, 100: 4041-4046.
57. Ferrandon M., Chamel A., 1989. Foliar uptake and translocation of iron, zinc and manganese. Influence of chelating agents. *Plant Physiol. Biochem.*, 27: 713- 722.
- Kabata-Pendias A., Pendias H., 2001. Trace element in soil and plants (3<sup>rd</sup> Ed.). Boca Raton, FL. CRC Press, 413 p.
58. McCann M.C., Roberts K., 1994. Changes in cell wall architecture during cell elongation. *J. Exp. Bot.*, 45: 1683-1691.
59. Schat H., Sharma S.S., Vooijs R., 2002. Heavy metal-induced accumulation of free praline in a metal-tolerant and a non-tolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiol. Plant*, 101: 477-482.
60. Ernst W.H.O., Verkleij J.A.C., Schat H., 1992. Metal tolerance in plants. *Acta Bot. Neerl.*, 41: 229-248.
61. Hall J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.*, 366: 1-11.
62. Seregin I.V., Shpigun L.K., Ivaniov V.B., 2004. Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. *Russ. J. Plant Physiol.*, 51: 525-533.
63. Fox T.C., Gueriot M.L., 1998. Molecular biology of cation transport in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 669-696.
64. Perfus-Barbeoch L., Leonhardt N., Vavasseur A., Forestier C., 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J.*, 32: 539-548.
65. Clemens S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88: 1707-1719.
66. White P.J., Whiting S.N., Baker A.J.M., Broadley M.R., 2002. Does zinc move apoplastically to the xylem in roots of *Thlaspi caerulescens*? *New Phytol.*, 153: 201-207.
67. Ranathunge K., Steudle E., Lafitte R., 2005. A new precipitation technique provides evidence for the permeability of Casparian bands to ions in young roots of corn (*Zea mays* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Environ.*, 28: 1450-1462.
68. Lu L.L., Tian S.K., Yang X.E., Li T.Q., He Z.L., 2009. Cadmium uptake and xylem loading are active processes in the hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *J. Plant Physiol.*, 166: 579-587.

69. Tester M., Leigh R.A., 2001. Partitioning of nutrient transport processes in roots. *J. Exp. Bot.*, 52: 445-457.
70. Verret F., Gravot A., Auroy P., Leonhardt N., David P., Nussaume L., Vavasseur A., Richaud P., 2004. Overexpression of *AtHMA4* enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett.*, 576: 306-312.
71. Hanikenne M., Talke I.N., Haydon M.J., Lanz C., Nolte A., Motte P., Kroymann J., Weigel D., Krämer U., 2008. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of *HMA4*. *Nature*, 453: 391-395.
72. Ueno D., Iwashita T., Zhao F., Ma J.F., 2008. Characterization of Cd translocation and identification of the Cd form in xylem sap of the Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Physiol.*, 49: 540-548.
73. Soltner D., 1999. Les bases de la production végétale. Tome III – la plante et son alimentation (2nd Ed.), Collection sciences et techniques agricoles, 304p.
74. Briat J.F., Lebrun M., 1999. Plant responses to metal toxicity. *C.R. Acad. Sci.*, 322: 43-54.
75. Senden M.H.M., Wolterbeek H.A.T., 1990. Effect of citric acid on the transport of cadmium through xylem vessels of excised tomato stem-leaf system. *Acta Bot. Neerl.*, 39: 297-303.
76. Salim R., Al-Subu M.M., Douleh A., Khalaf S., 1992. Effects on growth and uptake of broad beans (*Vicia fabae* L.), by root and foliar treatments of plants with lead and cadmium. *J. Environ. Sci Health*, 27: 1619-1642.
77. Herren T., Feller U., 1996. Effect of locally increased zinc contents on zinc transport from the flag lamina to the maturing grains of wheat. *J. Plant Nutr.*, 19: 379-387.
78. Stephan U.W., Schmidke I., Stephan V.W., Scholz G., 1996. The nicotianamine molecule is made-to-measure for complexation of metal micronutrients in plants. *BioMetals*, 9: 84-90.
79. Mari S., Gendre D., Pianelli K., Ouerdane L., Lobinski R., Briat J.F., Lebrun M., Czernic P., 2006. Root-to-shoot long-distance circulation of nicotianamine and nicotianamine-nickel chelates in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.*, 57: 4111-4122.
80. Morel J.L., 1997. Bioavailability of trace elements to terrestrial plants. In: *Soil Ecotoxicology*, Tarradellas J., Bitton G., Rossel D., Lewis Publisher, CRC, pp.141-176.
81. Lasat M.M., Pence N.S., Garvin D.F., Ebbs S.D., Kochian L.V., 2000. Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.*, 51: 71-79.
82. Tang Y.T., Qiu R.L., Zeng X.W., Ying R.R., Yu F.M., Zhou X.Y., 2009. Lead, zinc, cadmium hyperaccumulation and growth stimulation in *Arabis paniculate* Franch. *Env. Exp. Bot.*, 66: 126-134.
83. Cobbett C., 2003. Heavy metals and plants – model system and hyperaccumulators. *New Phytol.*, 159: 289-293.
84. Macnair M.R., 2003. The hyperaccumulation of metals by plants. *Adv. Bot. Res.*, 40: 63-105.
85. Reeves R.D., Baker A.J.M., 2000. Metal-accumulating plants. In: *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up environment*. Raskin I., Ensley B.D., Wiley-Intersciences, pp. 193-229.
86. Boyd R.S., 2004. Ecology of metal hyperaccumulation. *New Phytol.*, 162: 563-567.

87. Lambinon J., Auquier P., 1964. La flore et la végétation des terrains calaminaires de la Wallonie septentrionale et de la Rhenanie aixoise. Types chorologiques et groupes écologiques. *Natura Mosana*, 16: 113-130.
88. Simon, E., 1978. Heavy metals in soils, vegetation development and heavy metal tolerance in plant populations from metalliferous areas. *New Phytol.*, 81: 175-188.
89. Read J., Jaffré T., Ferris J.M., McCoy S., Hope G.S., 2006. Does soil determine the boundaries of monodominant rain forest with adjacent mixed rain forest and maquis on ultramafic soils in New Caledonia? *J. Biogeography*, 33: 1055-1065.
90. Whiting S.N., Neumann P.M., Baker A.J.M., 2003. Nickel and zinc hyperaccumulation by *Alyssum murale* and *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae) do not enhance survival and whole-plant growth under drought stress. *Plant Cell Environ.*, 2: 351-360.
91. Boyd R.S., Martens S.N., 1998. The significance of metal hyperaccumulation for biotic interactions. *Chemoecology*, 9: 1-7.
92. Boyd R.S., Davis M.A., Wall M.A., Balkwill K., 2002. Nickel defends the South Africa Nickel hyperaccumulator *Senecio coronatus* (Asteraceae) against *Helix aspera* (Mollusca: Pulmonidae). *Chemoecology*, 12: 91-97.
93. Huitson S.B., Macnair M.R., 2003. Does zinc protect the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* from herbivory by snails? *New Phytol.*, 159: 453-460.
94. Noret N., Meerts P., Tolrà R., Poschenrieder C., Barceló J., Escarre J., 2005. Palatability of *Thlaspi caerulescens* for snails: influence of zinc and glucosinates. *New Phytol.*, 165: 763-772.
95. Welch R.M., 1995. Micronutrient nutrition of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 14: 49-82.
96. Rout G.R., Das P., 2003. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie*, 23: 3-11.
97. Broadley M.R., White P.J., Hammond J.P., Zelko I., Lux A., 2007. Zinc in plants. *New Phytol.*, 173: 677-702.
98. Klug A., 1999. Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. *J. Mol. Biol.*, 293: 215-218.
99. Benavides M.P., Gallego S.M., Tomaro M.L., 2005. Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17: 21-34.
100. Sandialo L.M., Dalurzo H.C., Gómez M., Romero-Puertas M.C., del Río L.A., 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.*, 52: 2115-2126.
101. Sobkowiak R., Deckert J., 2003. Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean. *Plant Physiol. Biochem.*, 41: 767-772.
102. Baker A.J.M., Walker P.L., 1989. Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. *Chem. Speciation Bioavail.*, 1: 7-17.
103. Causton D.R., Venus J.C., 1981. *The biometry of plant growth*. Arnold ed., London, 307 p.
104. Arduini I., Godbold D., Onnis A., 1994. Cadmium and copper change root growth and morphology of *Pinus pinea* and *Pinus piaster* seedlings. *Physiol. Plant.*, 92: 675-680.
105. Schat H., Sharma S.S., Vooijs R., 2002. Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a non tolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiol. Plant.*, 101: 477-482.

106. Barceló J., Poschenrieder C., 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J. Plant Nutr.*, 13: 1-37.
107. Zheng S.J., Lin Y., Yang J., Liu Q., Tang C., 2003. The kinetics of aluminium adsorption and desorption by root cell walls of aluminium resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar. *Plant Soil*, 261: 85-90.
108. Sanita Di Toppi L., Gabbriellini R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.*, 41: 105-130.
109. Poschenrieder C., Barceló J., 2004. Water relations in heavy metal stressed plants. In: *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems (2<sup>nd</sup> Ed.)*. Prasad M.N.V., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 249-270.
110. Scandalios J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.*, 101: 7-12.
111. Bartosz G., 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 19: 47-64.
112. Parent C., Capelli N., Dat J.F., 2008. Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *C.R. Biol.*, 331: 255-261.
113. Dat J.F., Van Breusegem F., Vandenameele S., Vranová E., Van Montagu M., Inze D., 2000. Dual action of active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.*, 57: 779-795.
114. Van Breusegem F., Dat J.F., 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol.*, 141: 384-390.
115. Heyno E., Klose C., Krieger-Liszkay A., 2008. Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase. *New Phytol.*, 179: 687-699.
116. Mittler R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7: 405-410.
117. Laloi C., Apel K., Danon A., 2004. Reactive oxygen signalling: The latest news. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7: 323-328.
118. DalCorso G., Farinati S., Maistri S., Furini A., 2008. How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *J. Integr. Plant Biol.*, 10: 1268-1280.
119. Torres M.A., Dangl J.L., 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8: 397-403.
120. Bolwell G.P., 1999. Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2: 287-294.
121. Cheng S., 2003. Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 10: 256-264.
122. Devi S.R., Prasad M.N.V., 2004. Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems (2<sup>nd</sup> Ed.)*. Prasad M.N.V., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 127-145.
123. Abreu H.S., Maria M.A., Reis J.L., 2001. Dual oxidation ways toward lignin evolution. *Florestae Ambiente*, 8: 207-210.
124. Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G., 1996. Resistance gene dependant plant defense responses. *Plant Cell*, 8: 1773-1791.
125. Sánchez-Cassas P., Klessig D.F., 1994. A salicylic acid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. *Plant Physiol.*, 91: 812-815.
126. Foyer C.H., Noctor G., 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytol.*, 146: 359-388.

127. Shaw B.P., Sahu S.K., Mishra R.K., 2004. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems (2nd Ed.), Prasad M.N.V., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 84-126.
128. Larson R.A., 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochem.*, 27: 969-978.
129. Collin V.C., Eymery F., Genty B., Rey P., Havaux M., 2008. Vitamin E is essential for the tolerance of *Arabidopsis thaliana* to metal-induced oxidative stress. *Plant Cell Environ.*, 31: 244-257.
130. Arora A., Sairam R.K., Srivastava G.C., 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.*, 82: 1227-1238.
131. Shah K., Kumar R.G., Verma S., Dubey R.S., 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Sci.*, 161: 1135–1144.
132. Clemens S., 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212: 475-486.
133. Guo W.J., Meenam M., Goldsbrough P.B., 2008. Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. *Plant Physiol.*, 146: 1697-1706.
134. Cobbett C.S., Goldsbrough P.B., 2002. Phytochelatins and metallothioneins : roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 53: 159-182.
135. Vatamaniuk O.K., Mari S., Lu Y.P., Rea P.A., 2000. Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J. Biol. Chem.*, 275: 31451-31459.
136. Verbruggen N., Hermans C., Schat H., 2009. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12: 364-372. -Verma
137. Vögeli-Lange R., Wagner G.J., 1990. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. Implication of a transport function for cadmium-binding peptides. *Plant Physiol.*, 92: 1086-1093.
138. Rauser W.E., 1995. Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiol.*, 109: 1141-1149.
139. Gupta S.C., Goldsbrough P.B., 1991. Phytochelatin accumulation and cadmium tolerance in selected tomato cell lines. *Plant Physiol.*, 97: 306-312.
140. Rauser W.E., 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants – the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins *Cell Biochem. Biophys.*, 31: 19-48.
141. Callahan D.L., Baker A.J.M, Kolev S.D., Wedd A.G., 2006. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 11: 2-12.
142. Chardonens A.N., Koevoets P.L.M., vanZanten A., Schat H., Verkleij J.A.C., 1999. Properties of enhanced tonoplast zinc transport in naturally selected zinc tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiol.*, 120: 779-785.
143. Memon A.R., Aktoprakligil D., Özdemir A., Vertii A., 2001. Heavy metal accumulation and detoxification mechanisms in plants. *Turk J. Bot.*, 25: 111- 121.
144. Timperio A.M., Egidi M.G., Zolla L., 2008. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *J. Proteomics*, 71: 391-411.
145. Banzet N., Richaud C., Deveaux Y., Kazmaier M., Gagnon J., Triantaphylides C., 1998. Accumulation of small heat shock proteins, - 157 - including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. *Plant J.*, 13: 519-527.

146. Neumann D., Lichtenberger O., Günther D., Tschiersch K., Nover L., 1994. Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta*, 194: 360-367.
147. Maalem, S., "Etude écophysiological de trois espèces halophytes du genre *Atriplex* (*A. canescens*, *A. halimus* et *A. nummularia*) soumises à l'enrichissement phosphaté". Thèse de magistère en physiologie végétale et applications biotechnologiques. Université Baji Mokhtar, Annaba, Algérie, (2002) 76p
148. Mulas, M., "Potentialité d'utilisation stratégique des plantes des genres *Atriplex* et *Opuntia* dans la lutte contre la désertification". Short and Medium, Term Priority Environmental Action Programme (SMAP) (2004). 91p
149. Chadefaut, S., et Emberger, J.M., "The influence of sheep on pattern and process in *Atriplex vesicaria* populations from the Riverine Plain of New South Wales". *Aust. J. Bot.* 26, (1960), 381-392
150. Bouabdellah E. « La végétation steppique sur sols salés des hautes plaines sud-Algéroises. Composition, structure et production, » Thèse Doc., Univ. Paris sud. Centre d'Orsay, (1992) 206 p.
151. Franclet et le Houerou, "Les *Atriplex* en Tunisie et en Afrique du Nord". Doc. Tech n° 7, FAO, Rome, (1971) . 249p
152. Quezel, F., et Santa, M., " Range management in Central Tunisia. Office of Livestock and Pastures" Ministry of Agriculture, Tunisia and Oregon State University, Corvallis OR (USA) (1962).
153. Abbad, A., Benchaabane, A. "The phenological study of *Atriplex halimus* L". *Afr. J. Ecol.* 42: 69-73. (2004)
154. Mattia, C., Bischetti, G.B., Gentile, F. "Biotechnical characteristics of root systems of typical Mediterranean species". *Plant Soil* 278: 23-32. (2005)
155. C.H.Wong et H.J.Jager. *Plant science letters* 1978, Vol.12, No.1,63-68 Ref.18
156. M. Bajji, J.M. Kinet, S. Lutts. "Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures". *Plant science*.1998.vol 137,2. P131-142
157. Martinez-Villegas, N., Flores-Velez, L.M. et Dominguez, O., 2004. Sorption of lead in soil as a function of pH: a study case in Mexico. *Chemosphere*, Vol. 57: 1537-1542.
158. Lutts, S., Lefevre, I., Delperee, C., Kivits, S., Dechamps, C., Rebledo, A. et Correal, E., 2004. Heavy metal accumulation by the halophyte species Mediterranean Saltbush. *J. Environ.Qual.*, Vol. 33 (4): 1271-1279.
159. B. Nedjimi et Y. Daoud. 2008, Influence du NaCl sur le comportement d'une espèce halophyte (*Atriplex halimus* subsp. *schweinfurthii*) *Annales de l'institut national agronomique-El-Harrach* ;Vol29N1 et 2, 2008
160. Lefèvre, I., Marchal, G., Meerts, P., Correal, E., et Lutts, S., 2009. Chloride salinity reduces Cd accumulation by the Mediterranean halophyte species *Atriplex halimus* L. *Environmental and Experimental Botany*, Vol. 65: 142–152.
161. Manousaki, E. et Kalogerakis, N., 2009. Phytoextraction of Pb and Cd by the Mediterranean saltbush (*Atriplex halimus* L.): Metal uptake in relation to salinity. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, Vol. 16: 844–854. doi:10.1007/s11356-009-0224-3.
162. Le Houérou, H.N., 1992. The role of saltbushes (*Atriplex* spp) in arid lands rehabilitation in the Mediterranean basin. A review. *Agroforestry systems*, Vol. 18: 107-148.
163. Walker D.J. et Lutts S., 2014. The tolerance of *Atriplex halimus* L. to environmental stresses. *Emir. J. food. Agric.*, Vol. 26 (12): 1081-1090.

164. Márquez-García, B., Márquez, C., Sanjosé, I., Nieva, F.J.J., Rodríguez-Rubio, P. et Muñoz-Rodríguez, A.F., 2013. The effects of heavy metals on germination and seedling characteristics in two halophyte species in Mediterranean marshes. *Mar. Pollut. Bull.*, Vol. 70: 119–124. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.02.019.
165. Mesnoui, M. et Lotmani, B., 2015. Effect of Some Heavy Metals on Germination and Early Seedling Growth of *Atriplex halimus* subsp. *Schweinfurthii*. *Am. J. Agric. Environ. Sci.*, Vol. 15: 2235–2240.
166. Chisci, G.C., Bazzoffi, P., Pagliai, M., Papini, R., Pellegrini, S. et Vignozzi, N., 2001. Association of *Sulla* and *Atriplex* shrub for the physical improvement of clay soils and environmental protection in central Italy. *Agricultural Ecosystems and Environment*, Vol. 84,45-53.
167. Dutuit, P., 1999. Etude de la diversité biologique de l'*Atriplex halimus* par le repérage in vitro et in vivo d'individus résistants à des conditions extrêmes du milieu et constitution de clones. Université de Paris-Sud. CTA. Contrat TS3. CT94., Vol. 264: 138-141.
168. Vickerman, D.B., Shannon, M.C., Bañuelos, G.S., Grieve, C.M. et Trumble, J.T., 2002. Evaluation of *Atriplex* lines for selenium accumulation, salt tolerance and suitability for a key agricultural insect pest. *Environ. Pollut.*, Vol. 120: 463–473.
169. Kadukova, J., Papadontonakis, N., Naxakis, G. et Kalogevakis, N., 2004. Lead accumulation by the salt-tolerant plant *Atriplex halimus*. *Protection*.
170. Belarbi, A., 2008. Contribution à l'étude de l'absorption des métaux lourds (Plomb et Cuivre) par l'*Atriplex halimus* L. Mémoire de magister, option: Biotechnologies Végétales. Département d'Agronomie, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Algérie, 96-105.
171. Voorhees, M.E., 1990. Forage quality of rillscale (*Atriplex suckleyi*) grown on amended bentonite mine spoil. *Great Basin Naturalist*, Vol. 50: 57-62.
172. Voorhees, M.E., Uresk, D.W. et Trlica, M.J., 1991. Substrate relations for rillscale (*Atriplex suckleyi*) on bentonite mine soil. *J. Range Manage*, Watson, M.C., Banuelos, G.S., and Riley, J. J. Trace element, 1994, Vol. 44: 34–38.
173. Stark, J.M. et Redente, E.F., 1990. Plant uptake and cycling of trace-elements on retorted oil- shale disposal piles. *Journal of Environmental Quality*, Vol. 19: 495-501.
174. Martínez, F.D. et Walker, D.J., 2011. The effects of soil amendments on the growth of *Atriplex halimus* and *Bituminaria bituminosa* in heavy metal-contaminated soils. *Water, Air, Soil Pollution*, doi: 10.1007/s11270-011-0839-0.
175. McFarland, M.L., Ueckert, D., Hons, F.M. et Hartmann, S., 1994. Selective-placement burial of drilling fluids: effects on soil properties, buffalograss and fourwing salt-bush after 4 years. *J. Range Managem*, Vol. 47: 475-480.
176. Williams, T.P., Bubb, J.B. et Lester, J.N., 1994. The occurrence and distribution of tracemetals in halophytes. *Chemosphere*, Vol. 28: 1189–99.
177. Glenn, E.P, Brown, J.J. et Blumwald, E., 1999. Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Crit Rev Plant Sci.*, Vol. 18: 227–55.
178. Jordan, F.L., Robin-Abbott, M., Maier, R.M. et Glenn, E.P., 2002. A comparison of chelator-facilitated uptake by a halophyte and a glycophyte. *Environ Toxic Chem.*, Vol. 21: 704-2698.

179. Abdelly, C., 2006. Bioremédiation/ Phytoremédiation. Université de Tunis. Institut supérieur de l'éducation et de la formation continue, Département des Sciences Naturelles, S.N, 232, 32 p.
180. Reimann, C., 1992. Sodium exclusion by *Chenopodium* species. *J. Exp. Bot.*, Vol. 43: 503-510.
181. Niekerk, W., Sparks, C., Rethmani, N. et Coertze, R., 2004. Minéral composition of certain *Atriplex* species and *Cassia sturtii*. *South African Journal of Animal Science*, 105-107.
182. Mandak, B., 2003. Germination requirements of invasive and noninvasive *Atriplex* species: a comparative study. *Flora*, Vol. 198 : 45-54.
183. Belkheiri, O., 2009. Adaptabilité des espèces du Genre *Atriplex* aux conditions de Salinité Et d'aridité. Thèse de doctorat. Università Degli Studi Di Sassari, 33-36.
184. Tauler, M. and E. Baraza, Improving the acclimatization and establishment of *Arundo donax* L. plantlets, a promising energy crop, using a mycorrhiza-based biofertilizer. *Industrial Crops and Products*, 2015. 66: p. 299 304.
185. Tahami, M.K., et al., Plant growth promoting rhizobacteria in an ecological cropping system: A study on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil production. *Industrial Crops and Products*, 2017. 107: p. 97-104.
186. Puntel, L.A., et al., Modeling long-term corn yield response to nitrogen rate and crop rotation. *Frontiers in plant science*, 2016. 7: p. 1630.
187. Bulgari, R., et al., Biostimulants and crop responses: a review. *Biological Agriculture & Horticulture*, 2015. 31(1): p. 1-17.
188. Yakhin, O.I., et al., Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Front Plant Sci*, 2016. 7: p. 2049.
189. Hamed, S.M., et al., Role of marine macroalgae in plant protection & improvement for sustainable agriculture technology. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 2018. 7(1): p. 104-110.
190. Du Jardin, P., Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 2015. 196: p. 3-14.
191. Zhang, X. and R. Schmidt, Biostimulating turfgrasses. *Grounds maintenance.*, 1999.
192. Michalak, I. and K. Chojnacka, Algal extracts: Technology and advances. *Engineering in Life Sciences*, 2014. 14(6): p. 581-591.
193. Traon, D., et al., A Legal Framework for Plant Biostimulants and Agronomic Fertiliser Additives in the EU-Report to the European Commission, DG Enterprise & Industry. 2014.
194. Craigie, J.S., Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of applied phycology*, 2011. 23(3): p. 371-393.
195. Mishra, P.K., Singh, R.K., Gupta, A., Chaturvedi, A., Pandey, R., et al. (2013) Antibacterial Activity of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees Leaves against Clinical Pathogens. *Journal of Pharmacy Research*, 7, 459-462. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jopr.2013.05.009>
196. Embi Féline Laurenza Assemien. (2018) Impact de pratiques agricoles conventionnelles et innovantes sur la fertilité des sols et les acteurs microbiens impliqués dans la zone de savanes humides de Côte d'Ivoire, Laboratoire d'Ecologie Microbienne - UMR 5557, N°d'ordre NNT : 2018LYSE1103

197. Adi, A.J. et Noor, Z.M.,2009. Waste recycling: Utilization of coffee grounds and kitchen waste in vermicomposting. *Bioresource Technology*, vol. 100,pp: 1027-1030. [www.elsevier.com/locate/biortech](http://www.elsevier.com/locate/biortech)(Page consultee le 12 juin 2015).
198. José M.G. Vilar, Calin C. Guet, and Stanislas Leibler.2003, *J Cell Biol*; 161(3): p471-476;
199. Sabrina N. Rabelo, Vany P. Ferraz, Leandro S. Oliveira, and Adriana S. Franca. (2015) FTIR Analysis for Quantification of Fatty Acid Methyl Esters in Biodiesel Produced by Microwave-Assisted Transesterification, *International Journal of Environmental Science and Development*, Vol. 6, No. 12, December 2015
200. Gauri Pathare Gauri Pathare, Sunila Raju Sunila Raju, Vinod Shah Vinod Shah, Manoj Mashru Manoj Mashru, Kavita Shalia Kavita Shalia. (2018) Association of soluble  $\alpha$ -Klotho and Klotho polymorphisms (KL-VS and G-395A) with essential hypertension in Indian population. *International Journal of Biomedical and Advance Research*, 2018, Vol. 9, No. 12, 392-399 ref. 50
201. Margit O., 2019. Review : vermicompost,it's importance and benefit in agriculture. *Agraarteadus. Journal of agricultural science* 2.xxx.2019 93-98.
202. Lim, S. L., Wu, T. Y., 2015. Determination of maturity in the vermicompost produced from palm oil mill effluent using spectroscopy, structural characterization and thermogravimetric analysis. *Ecol. Eng.* 84, 515-519. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.09.050>.
203. Lim, S. L., Lee, L. H., Wu, T. Y. 2016. Sustainability of using composting and vermicomposting technologies for organic solid waste biotransformation: recent overview, greenhouse gases emissions and economic analysis. *J. Clean. Prod.* 111, 262-278. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.08.083>.
204. Srivastava, V., De Araujo, A. S. F., Vaish, B., Bartelt-Hunt, S., Singh, P., Singh, R. P. 2016. Biological response of using municipal solid waste compost in agriculture as fertilizer supplement. *Rev. Environ. Sci. Bio.*15, 677-696. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9407-9>.
205. Bhat, S. A., Singh, J., Vig, A. P., 2017. Instrumental characterization of organic wastes for evaluation of vermicompost maturity. *Journal of Analytical Science and Technology.* 8, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s40543-017-0112-2>
206. García, A.C., et al., 2012. Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. *Ecological Engineering*, 2012. 47: p. 203-208.
207. Tejada, M., et al., 2008. Agricultural use of leachates obtained from two different vermicomposting processes. *Bioresource Technology*, 2008. 99(14): p. 6228-6232
208. Gutiérrez-Miceli, F.A., et al., 2008. Formulation of a liquid fertilizer for sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using vermicompost leachate. *Bioresource Technology*, 2008. 99(14): p. 6174-6180.
209. Marketsandmarkets reports (2010-2015),MarketsandMarkets ([www.Marketsandmarkets.com](http://www.Marketsandmarkets.com)).
210. Green J.M., Beestman G.B., (2007). Recently patented and commercialized formulation and adjuvant technology, *Crop Protection*,26, 320-327.
211. Mulqueen P., (2003). Recent advances in agrochemical formulation. *Advances in colloid and interface science*,106,83-107.

212. Rodham D.K., (2000), Colloid and interface science in formulation research for crop protection products. *Current Opinion in colloid & interface science*, 5, 280-287.
213. Knowles A., (2005). New developments in crop protection product Formulation, *Agrow reports*, T&F informa UK ltd, May, 344p.
214. Butler Ellis M.C., Tuck C.R., Miller P.C.H., (1997). The effect of some adjuvants on sprays produced by agricultural flat fan nozzles. *Crop protection*, 16(1), 41-50.
215. Miller P.C.H., Butler Ellis M.C., (2000). Effects of formulation on spray nozzle performance for applications from ground-based boom sprayers, *Crop Protection*, 19,609-615.
216. Butler Ellis M.C., Tuck C.R., (1999). How adjuvants influence spray formation with different hydraulic nozzles. *Crop protection*, 18,101-109.
217. Holloway P.J., Butler Ellis M.C., Webb., Western N.M., Tuck C.R., Hayes A.L., Miller P.C.H., (2000). Effects of some agricultural tank-mix adjuvants on the deposition efficiency of aqueous sprays on foliage, *crop protection*, 19,27-37.
218. Wang C.J., Liu Z.Q., (2007). Foliar uptake of pesticides-present status and future challenge (2007). *Pesticide biochemistry and physiology*, 87, 1-8.
219. Streibig J.C. (2003), *Assessment of herbicide effects*, Book, Chap I, pp. 1-41.
220. Z. Liu, (2004). Effects of surfactants on foliar uptake of herbicides\_ a complex scenario, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 35,149\_153.
221. Mouloungui Z., Gauvrit C., (1998). Synthesis and influence of fatty acid esters on the foliar penetration of herbicides, *Industrial Crop and Products*, 8,1\_15.
222. Taylor P., (2011). The wetting of leaf surfaces, *Current Opinion in Colloid & interface Science*,16,326-334.
223. Ivanova N.A., Starov V.M., (2011). Wetting of low free energy surfaces by aqueous surfactant solutions, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16, 285-291.
224. Zebib B., Merah O. & Djazouli Z.E.. (2012), Physiochemical properties of adjuvants as predicted key for agrochemical behaviour. *Revue Agrobiologia*; 3 : 64-70.
226. Roy S., (2011). A multiple network learning approach to capture system-wide condition-specific responses. *Bioinformatics Research Support*, N.I.H., 27(13):1832-8.
227. Ndegwa, P.M. & Thompson, S.A. (2001). Integrating composting and vermicomposting the treatment and bioconversion of biosolids. *Bioresource Technology*, 76 : 107-112. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00104-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00104-8)
228. Salima Benazzouk & Petre I. Dobrev, ZahrEddine Djazouli , Vaclav Motyka & Stanley Lutts (2019). Positive impact of vermicompost leachate on salt stress resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) at the seedling stage: a phytohormonal approach. *Plant Soil*, <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04361-x>
229. Djazouli, Z., W. Chaichi, I. Djemai, S. Abdelkader, I. Ribera, & J. Nancée. (2017). Stimulation des défenses naturelles par l'application d'un Lombricompost. Effet sur les paramètres populationnels d'Aphis fabae Scop. (Homoptera: Aphididae) et la qualité Phytochimique de la fève. *Lebanese Science Journal* 18 (1):81–97.
230. Cherif, R., Kemassi, A., Boual, Z., Bouziane, N., Benbrahim, F., Hadjseyd, A., Gharib, T., Ould el Hadj-Khelil, A., Sakeur, M. L., & Ould el Hadj, M. D. (2016).

- Activités biologiques des extraits aqueux de *Pergularia tomentosa* L. (Asclepiadaceae). *Lebanese Science Journal* 17:25-35.
231. Abdul Baki A.A., & Anderson J.D. (1973). Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Sci.*, 13: 630–633.
  232. Hammer, Øyvind, Harper, David A.T., and Paul D. Ryan, (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and. Data Analysis. 9 pages
  233. Troll, W., & Lindsley, J.,J.A (1955) . Photometric method for the determination of proline. *Biol. Chem.* 215, 655
  234. Goring H., Dreier W. & Heinke F. (1977). Cytoplasmic osmoregulation by proline in maize roots. *Biologische Rundschau*, 15(6) : 377-380.
  235. Kaundun, S.S., Lebreton, P., & Bailly, A. (1998). Needle flavonoid variation in coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*) populations. *Canadian Journal of Botany*, 76(12) : 2076-2083.
  236. Shao, Y., & Bao, J. (2015). Polyphenols in whole rice grain: Genetic diversity and health benefits. *Food Chemistry*, 180 : 86-97.
  237. Dubois M., Mc Cowen L.K., Schotch T.J., Roben F.A. & Smith F., (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, 28 :360–356.
  238. Les, F., Prieto, J.M., Arbonés-Mainar, J.M., Valero, M.S., & López, V. (2015). Bioactive properties of commercialised pomegranate (*Punica granatum*) juice: antioxidant, antiproliferative and enzyme inhibiting activities. *Food & function*, 6(6) : 2049-2057.
  239. Merah, O. (2001). Carbon isotope discrimination and mineral composition of three organs in durum wheat genotypes grown under Mediterranean conditions. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 324(4): 355-363.
  240. Parsons, C., Grabulosa, E. M., Pili, E., Floor, G. H., Roman-Ross, G., & Charlet, L. (2013). Quantification of trace arsenic in soils by field-portable X-ray fluorescence spectrometry: considerations for sample preparation and measurement conditions. *Journal of hazardous materials*, 262 : 1213-1222.
  241. Hébrard-Labit, C. & Meffray, L. (2004). Comparaison de méthodes d'analyse des éléments traces métalliques (ETM) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sur les sols et les végétaux (Doctoral dissertation, Centre d'études sur les réseaux, les transports, l'urbanisme et les constructions publiques (CERTU)).
  242. Padmavathiamma, P.K., & Li, L.Y. (2007). Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants. *Water, Air, and Soil Pollution*, 184, 105-126.
  243. Mertens F, Saint-Charles J, Mergler D, Passos CJ & Lucotte M. (2005). A network approach for analysing and promoting equity in participatory Ecohealth research, *Ecohealth*, 2: 113-26.
  244. Liang, L., Liu, W., Sun, Y., Huo, X., Li, S., & Zhou, Q. (2017). Phytoremediation of heavy metal contaminated saline soils using halophytes : Current progress and future perspectives. *Environmental Reviews*, 25(3) : 269-281.