

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis-
Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

MEDJEDDED HOUSNA et LOUCHENE ILHEM

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : Biochimie Appliquée

THÈME

**Effet de l'engrais chimique NPK sur les
composés phénoliques et le statut redox de la
tomate (*Solanum lycopersicum* L.)**

Soutenu le 06/09/2020

DEVANT LE JURY

Présidente	HENNIA Aïcha	MCB	U. Mostaganem
Examinatrice	BEKENNICHE Nahla	MAA	U. Mostaganem
Encadreur	NEMMICHE Saïd	Prof.	U. Mostaganem
Co-encadreur	BENTAMRA Zoubida	Doctorante	U. Mostaganem

*Thème Réalisé au laboratoire de Recherche « Physiologie Animale Appliquée » de
l'Université de Mostaganem.*

Année Universitaire : 2019 - 2020

Dédicace

Il a été dit qu'avec des efforts, et non par des vœux, que l'on arrive au but qu'on se propose, et c'est dans l'effort que l'on trouve la satisfaction et non dans la réussite.

Aujourd'hui, nous écrivons ces mots avec toute la satisfaction de nos efforts consentis afin de réaliser ce modeste travail. Pour cela, nous avons le grand plaisir de dédier ce travail aux personnes les plus chères à nos cœurs.

Nos parents

Qui nous ont tout donnés sans rien demander, qui ont fait de grands sacrifices, qui nous ont aidés et encouragés tout au long de notre chemin. Vous étiez et vous êtes encore comme un nuage généreux qui arrose la terre et la rend verte, vos faveurs sont illimitées que l'étendue du ciel. Qu'ALLAH vous en rétribue abondamment, vous préserve et vous accorde une longue vie.

Nos frères et sœurs

Qui nous ont donnés des conseils pour contribuer à cette réussite, merci pour votre présence à nos côtés, vous êtes le meilleur appui et soutien que l'on puisse avoir en cette vie.

A nos amies et collègues

Pour les agréables moments passés ensemble, pour leurs vraies amitiés qui ne meurent jamais.

Remerciements

*Nous tenons en premier lieu à remercier notre encadreur **Mr. NEMMICHE** pour le temps précieux qu'il nous a consacré, pour sa présence, sa pertinence et sa rigueur.*

Nous vous remercions pour la confiance que vous nous avez accordée, merci du fond du cœur d'avoir été si gentil et compréhensif et de nous avoir toujours encouragé et rassuré. Nous avons eu beaucoup de chance de vous avoir comme encadreur. Nous vous exprimons notre sincère gratitude.

*Nous voudrions remercier ensuite notre Co-encadreur **Mme BENTAMRA Zoubida** d'avoir rendu le travail si agréable, merci pour ton implication et d'avoir été si disponible et gentille, merci pour tout le temps que tu nous as consacré et de nous avoir fait profiter de tes conseils même en dehors du laboratoire. Merci pour la complicité qui est née entre nous.*

*Un grand merci est adressé au **Professeur Halbouche**, directeur du laboratoire de recherche « Physiologie Animale Appliquée », pour nous avoir permis d'utiliser son laboratoire.*

*Nous adressons un merci tout particulier à **Mme HENNIA** d'avoir accepté d'être président du jury et **Mme BEKENNICHE** d'avoir bien voulu être rapporteur de ce travail. Merci d'avoir dégagé du temps pour vous y consacrer, nous avons été touchés que vous ayez répondu si rapidement, et avec enthousiasme.*

Merci à toutes les personnes qui travaillent au laboratoire de recherche de l'INES qui nous ont si gentiment aidé et avec qui nous avons eu le plaisir d'échanger quelques mots.

Bien évidemment, nous tenons à montrer toute notre gratitude et sincères remerciements à toute personne qui a contribué de près ou de loin pour nous encourager et nous motiver afin de réaliser ce travail.

ملخص

يشغل إنتاج الطماطم (*Solanum lycopersicum L.*) مكانا اقتصاديا في غاية الأهمية. تبحث دراستنا الحالية عن تأثير السماد الكيميائي NPK المعدل في جرعات زراعية مختلفة ع: 15 كغ / هكتار، ع: 20 كغ / هكتار ع: 25 كغ / هكتار) على محتويات المركبات الفينولية، أصبغة التركيب الضوئي (اليخضور أ، ب، اليخضور الكلي وأشباه الكاروتينات)، المؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي (مالونديالدهيد وبيروكسيد الهيدروجين)، وكذلك نشاط مضادات الأكسدة غير الإنزيمية (البرولين، وحمض الأسكوربيك). بالإضافة إلى ذلك، تم استخدام طريقتين لتقييم القدرة المضادة للأكسدة: DPPH وFRAP. الهدف هو تحديد أحسن جرعة زراعية NPK.

أظهرت النتائج المتحصل عليها أن الطماطم المخصبة بجرعة مقدرة بـ 25 كغ/هكتار من NPK تشير إلى تزايد في محتويات المؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي مقابل انخفاض في نشاط مضادات الأكسدة ومركبات مضادات الأكسدة الفينولية. بينما باستخدام جرعة تقدر بـ 20 كغ / هكتار سجلنا انخفاض في المؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي وارتفاع في مركبات النشاط المضاد للأكسدة غير الإنزيمي، لذلك يقترح أن هذه الجرعة الزراعية المستخدمة هي أفضل خيار من أجل الحصول على أحسن عائد زراعي واقتصادي.

الكلمات المفتاحية: الطماطم (*Solanum lycopersicum L.*)، NPK، المركبات الفينولية، أصبغة التركيب الضوئي، المؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي.

Résumé

La production de la tomate (*Solanum lycopersicum* L.) occupe une place économique très importante. Notre présente étude investigate l'impact de l'engrais chimique NPK amendé à différentes doses agronomiques (T0 : 15kg/ha, T1 : 20kg/ha, et T2 : 25kg/ha) sur les teneurs des composés phénoliques, les pigments photosynthétiques (chlorophylle a, b, totale et caroténoïdes), les biomarqueurs du stress oxydatif (malondialdéhyde et peroxyde d'hydrogène), ainsi que l'activité antioxydante non enzymatique (la proline, et l'acide ascorbique). Aussi, deux méthodes de l'évaluation de la capacité antioxydante ont été utilisées, FRAP et DPPH. L'objectif est de déterminer la meilleure dose agronomique NPK.

Les résultats obtenus montrent que la tomate fertilisée avec 25 kg/ha de NPK indiquent une augmentation des teneurs des biomarqueurs du stress oxydatif contre une diminution de l'activité antioxydante et des composants antioxydants phénoliques. Cependant, avec le traitement T1 (20 Kg/ha) on a enregistré une diminution des biomarqueurs du stress oxydatif et une augmentation des composés de l'activité antioxydante non enzymatique. Donc, on suggère que cette dose agricole utilisée est le meilleur choix afin d'obtenir un meilleur rendement sur le plan agricole et économique.

Mots clés : La tomate (*Solanum lycopersicum* L.) ; NPK ; les composés phénoliques ; les pigments photosynthétiques ; les biomarqueurs du stress oxydatif.

Abstract

The production of tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) occupies a very important economic place. Our present study investigates the impact of the chemical fertilizer NPK amended at different agronomic doses (T0: 15kg / ha, T1: 20kg / ha, and T2: 25kg / ha) on the contents of phenolic compounds, photosynthetic pigments (chlorophyll a, b, total and carotenoids), biomarkers of oxidative stress (malondialdehyde and hydrogen peroxide), as well as non-enzymatic antioxidant activity (proline, and ascorbic acid). Also, two methods of assessment antioxidant capacity were used, FRAP and DPPH. The aim is to determine the best NPK agronomic dose.

The results obtained show that tomato fertilized with 25 kg/ha of NPK indicate an increase in the levels of oxidative stress biomarkers against a decrease in antioxidant activity and phenolic antioxidant components. However, with the T1 treatment (20 Kg/ha) a decrease in oxidative stress biomarkers and an increase in non-enzymatic antioxidant activity compounds was recorded. Therefore, it is suggested that this agronomic dose used is the best choice in order to obtain a better agricultural and economic yield.

Keywords: Tomato (*Solanum lycopersicum* L.); NPK; phenolic compounds; photosynthetic pigments; biomarkers of oxidative stress.

Table des matières

Liste des figures	vi
Liste des tableaux	vii
Introduction générale	1
Chapitre I : Le stress oxydatif	
Introduction :	2
1. Définition	2
1.1 Stress oxydant.....	2
1.2 Radicaux libres :	3
1.3 Espèces réactives de l'oxygène (ROS)	3
1.4 Espèces azotées réactives (RNS).....	4
1.5 Espèces réactives du soufre	5
2. Les sources d'espèces réactives	6
2.1 Les sources des ROS	6
2.2 Les sources des RNS	6
2.3 Les sources des RSS	7
3. L'importance des espèces réactives dans la vie d'une plante	8
4. Les cibles des dérivés actifs de l'oxygène.....	9
4.1 Les cibles lipidiques	10
4.1.1 La peroxydation non enzymatique	10
4.1.2 Les conséquences de la peroxydation lipidique	11
4.2 Les cibles non lipidiques	12
4.2.1 L'oxydation des sucres	12
4.2.2 L'oxydation des protéines	13
4.2.3 L'oxydation de l'ADN	13
5. Les systèmes de protection.....	14
5.1 Les antioxydants enzymatiques	14

5.1.1	Les superoxydes dismutases (SOD).....	15
5.1.2	Catalase (CAT).....	16
5.1.3	Ascorbate peroxydase (APX).....	16
5.1.4	Les enzymes du cycle d'oxydoréduction du glutathion.....	16
5.1.4.1	Glutathion peroxydases (GPx).....	16
5.1.4.2	Glutathion réductase (GR).....	17
5.1.4.3	Glutathion S-Transférases (GST).....	17
5.2	Les antioxydants non-enzymatiques.....	17
5.2.1	L'acide ascorbique (Vitamine C).....	17
5.2.2	Alpha-tocophérol (Vitamine E).....	18
5.2.3	Glutathion réduit (GSH).....	18
5.2.4	Les groupements thiols.....	19
5.2.5	Les caroténoïdes.....	19
5.2.6	Les flavonoïdes.....	19
5.2.7	Proline.....	20
5.2.8	Polyphénols.....	20

Chapitre II : La fertilisation

1.	Définition.....	21
2.	Nutrition des plantes.....	21
2.1	Les besoins d'une plante.....	21
2.1.1	Les éléments majeurs.....	21
2.1.2	Les oligo-éléments.....	21
3.	Les engrais.....	22
3.1	Les différents types d'engrais.....	22
3.1.1	Les engrais simples.....	22
3.1.2	Les engrais composés.....	22
4.	Types de fertilisation.....	22

4.1	L'azote	22
4.1.1	La fertilisation azotée	22
4.1.2	L'azote dans le système sol-plante	23
4.1.3	Rôles de l'azote	23
4.1.4	Les formes d'azote absorbé par les plantes	23
4.2	La fertilisation phospho-potassique	24
4.2.1	Le phosphore	24
4.2.1.1	La fertilisation phosphatée	24
4.2.1.2	Rôles du phosphore chez les plantes	24
4.2.1.3	Formes du phosphore dans le sol	25
4.2.2	Le potassium	26
4.2.2.1	La fertilisation potassique	26
4.2.2.2	Source de potassium	26
4.2.2.3	Formes du potassium dans le sol	26
4.2.2.4	Le potassium et la plante	26
5.	La biofertilisation	27
5.1	Quelques rhizobactéries utilisées comme biofertilisants	28
5.2	L'activité microbologique de la rhizosphère	29
5.3	Les PGPB	30
5.3.1	Les PGPR	31
5.3.1.1	La promotion directe	31
5.3.1.2	La promotion indirecte	31
5.3.2	Les rôles des PGPR	32
5.3.3	Quelques bactéries PGPR	33
5.3.3.1	Les bactéries du genre Pseudomonas	33
5.3.3.2	Les bactéries du genre Bacillus	34
5.3.3.3	Les bactéries du genre Azospirillum	34

5.3.4	Mode d'action des PGPR	34
5.4	L'importance des PGPR dans l'acquisition des plantes d'une tolérance aux stress biotique et abiotique	35

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

1.	Le but de l'étude.....	36
2.	Matériel végétal.....	36
2.1	Description botanique de l'espèce	36
2.2	La classification.....	36
2.3	Conditions à satisfaire pour garantir une bonne culture	37
2.3.1	Le climat et le sol	37
2.3.1.1	La température et la lumière	37
2.3.1.2	L'eau et l'humidité.....	38
2.3.1.3	Le sol.....	38
2.4	Les maladies de la tomate.....	38
3.	Extraction Et Dosage Des Polyphénols.....	39
3.1	Extraction.....	39
3.2	Dosage des polyphénols totaux	39
3.3	Dosage des flavonoïdes	40
4.	Quantification des pigments chlorophylliens et caroténoïdes	41
5.	Les marqueurs du stress oxydatif	41
5.1	Dosage de malondialdehyde	41
5.2	Dosage du peroxyde d'hydrogène	42
6.	Mesure de l'activité antioxydante	42
6.1	Evaluation de l'activité anti radicalaire DPPH.....	42
6.2	Réduction du fer par la méthode FRAP.....	43
7.	Détermination de l'activité antioxydante non enzymatique.....	43

7.1	Dosage de la proline	43
7.2	Dosage de la vitamine C (acide ascorbique)	44
8.	Etude statistique	45
II. Résultats et discussion		
1.	Dosage des composés phénoliques	46
1.1	Polyphénols totaux	46
1.2	Flavonoïdes.....	46
2.	Les marqueurs de stress oxydatif	47
2.1	Effet du NPK sur le niveau du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	47
2.2	Effet du NPK sur la teneur des malondialdéhydes (MDA).....	48
3.	Estimation des pigments.....	49
3.1	Quantification de la teneur en chlorophylles et caroténoïdes.....	49
4.	Effet du NPK sur l'activité anti radicalaire DPPH.....	49
5.	Effet du NPK sur l'activité FRAP	50
6.	Impact de l'engrais NPK sur la teneur en proline	51
7.	L'effet du NPK sur la teneur en ascorbate	52
8.	Discussion	53
8.1.	Effet des différents traitements NPK sur les teneurs en chlorophylles et caroténoïdes	53
8.2.	Effet des différents traitements NPK sur la teneur en composés phénoliques.....	54
8.3.	Effet des différents traitements NPK sur la teneur des malondialdéhydes (MDA) et en peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	54
8.4.	Effet des différents traitements NPK sur l'activité anti radicalaire DPPH et la réduction du fer par la méthode FRAP.....	54
8.5.	Effet des différents traitements NPK sur la teneur en proline.....	55
8.6.	Effet des différents traitements NPK sur la teneur de l'ascorbate	55
Conclusion.....		57
Références bibliographiques		58

Liste des figures

Figure 01: Déséquilibre de la balance pro-oxydant / antioxydant.....	2
Figure 02 : Les ROS cellulaires radicalaires et non radicalaires.....	4
Figure 03 : Sites de production de différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène chez les plantes	6
Figure 04 : Représentation schématique d'oxyde nitrique synthase.....	7
Figure 05 : Les états d'oxydation du sulfure des RSS sélectionnés.....	8
Figure 06 : Feuille de chêne montrant (a) les symptômes d'oxydation de la chlorophylle et (b) les nécroses liées à la mort de cellules	9
Figure 07 : Stress oxydatif au niveau des biomolécules.....	10
Figure 08 : Processus de la peroxydation des lipides.....	10
Figure 09 : La peroxydation lipidique non enzymatique.....	11
Figure 10 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire	14
Figure 11 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants	15
Figure 12 : Synthèse et dégradation de l'acide ascorbique.....	18
Figure 13 : Cycle redox du glutathion.....	19
Figure 14 : Cycle de l'azote en agriculture	23
Figure 15 : Effet du phosphore sur deux plantations.....	25
Figure 16 : Mécanisme hypothétique de l'action des fertilisants.....	28
Figure 17 : Les associations microbiennes avec les plantes , sols et leurs attributs fonctionnels	30
Figure 18 : Les différents rôles de PGPR.....	33
Figure 19 : Effet des différentes doses du NPK sur la teneur des polyphénols totaux	46
Figure 20 : Effets des différentes doses du NPK sur la teneur des flavonoïdes.....	47
Figure 21 : L'effet du NPK sur l'accumulation du peroxyde d'hydrogène	48
Figure 22 : Effet du NPK sur la teneur en malondialdéhyde	48
Figure 23 : Variations des teneurs en chlorophylles (a, b et totale) et caroténoïdes dans les feuilles sous l'effet de différents apports de NPK	49
Figure 24 : Evaluation de l'effet scavenger du radical DPPH	50
Figure 25 : L'effet des différentes doses de NPK sur l'activité FRAP	51
Figure 26 : Effet des différentes doses de NPK sur la teneur en proline	52
Figure 27 : L'effet de l'engrais NPK sur la teneur en acide ascorbique	53

Liste des tableaux

Tableau 01: Les espèces réactives d'oxygène.	3
Tableau 02: Les principaux formes réactives de nitrogène.	4
Tableau 03: Les principaux formes réactives du soufre	5
Tableau 04: Les différentes classes des SOD et leurs fonctions.....	16
Tableau 05 : L'augmentation de la croissance des plantes et la protection aux maladies par les rhizobactéries	29
Tableau 06 : Températures requises pour les différentes phases de développement d'un pied de tomate	37

Introduction

Générale

Le monde des sciences agrobiologiques et médicales est envahi par le concept du « stress oxydant », c'est-à-dire une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux libres oxygénés toxiques qui constitue une « background » pour la plupart des pathologies humaines. La découverte d'espèces chimiques radicalaires, présentes normalement, dans l'organisme a bouleversé notre compréhension des mécanismes biologiques. Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont très utiles pour l'organisme à dose raisonnable, mais la production peut devenir excessive par le biais des sources exogènes, et l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme des radicaux, l'état généré par l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant ».

En agriculture, les engrais chimiques sont administrés en vue d'augmenter le rendement des cultures. Ils sont responsables d'une pollution massive des sols, mais sont surtout la cause majeure de la pollution de l'air et de l'eau et affecte non seulement les organismes ciblés, mais aussi les espèces sauvages (non ciblées) comme les vers de terre.

Les plantes sont dotées d'un système unique pour se défendre contre les espèces réactives oxygénées (ROS), en régulant les activités des enzymes antioxydants, tels que les superoxyde dismutases (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxydase (APX) et glutathion réductase (GR) qui diminuent la production des ROS et réduisent les niveaux de peroxyde d'hydrogène, de peroxydation des lipides et des électrolytes, ce qui confère une tolérance aux ROS pour les plantes soumises à un stress.

Dans cette étude le matériel végétal utilisé est la tomate (*Solanum lycopersicum* L.) qui appartient à la famille des *Solanaceae*. La tomate, culture stratégique, est le second produit maraîcher suite à la place qu'elle occupe dans les habitudes alimentaires des algériens. Cette étude a été menée afin d'étudier l'effet de l'engrais chimique NPK amendé à différentes doses agricoles sur la culture de tomate. L'effet sur le rendement final recherché par les agriculteurs nécessite un apport efficace et économique en NPK. Ainsi, cette étude permet d'examiner l'effet des différentes doses de NPK sur les composés phénoliques ainsi que le métabolisme oxydatif de la plante comme biomarqueurs de l'état de santé de la culture.

Le meilleur choix de dose sera déduit en fonction des deux paramètres, à savoir état de santé de la plante conjugué au rendement.

Partie I.

Synthèse

Bibliographique

Chapitre I : Le stress oxydatif

Introduction

Radicaux libres, espèces oxygénées réactives (ROS), stress oxydant et antioxydants sont devenus des termes familiers tant dans le monde médical que dans le grand public. Au début des années 2000, ces notions n'étaient généralement évoquées que dans les congrès scientifiques. Mais ces dernières années, l'industrie pharmaceutique, les laboratoires d'analyses médicales et la presse grand public ont massivement diffusé des informations relatives aux antioxydants, sans parfois l'esprit critique nécessaire (Defraigne and Pincemail,2008).

1. Définition

1.1 Stress oxydant

Le stress oxydant se définit par un déséquilibre entre la production d'espèces radicalaires (ou réactives) de l'oxygène et les capacités cellulaires antioxydantes, c'est-à-dire un état physiologique où la perte d'électrons dépasse le gain d'électrons, induisant une fuite électronique avec la formation des ROS et/ou RNS (Nemliche, 2017) (Figure 1).

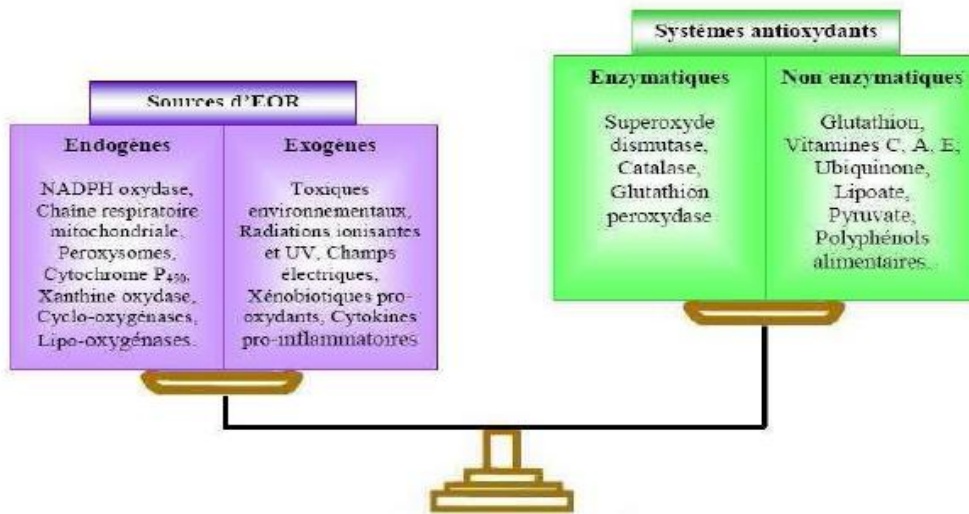


Figure 01: Déséquilibre de la balance pro-oxydant / antioxydant (Nkhili, 2009).

1.2 Radicaux libres :

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) qui possède un ou plusieurs électrons non appariés sur leur orbital externe (Valko et *al.*, 2007). Cet état lui confère une instabilité énergétique et cinétique qui le rend généralement capable de réagir avec d'autres molécules chimiques environnantes.

1.3 Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

L'oxygène est un élément indispensable à l'organisme aérobie et contribue en grande partie à la synthèse de l'énergie stockée sous forme d'ATP par le processus de la phosphorylation oxydative qui se réalise au niveau des mitochondries.

En biologie les radicaux libres sont formés le plus souvent à partir de l'oxygène d'où leurs appellations : les espèces réactives de l'oxygène (EROs) qui désignent à la fois des espèces radicalaires de l'oxygène et des espèces non radicalaires (Migdal and Serres, 2011) (tableau 1 et figure 2).

Tableau 01: Les espèces réactives d'oxygène (Bartosz, 2003).

ERO	Symbole chimique	Propriétés
Anion Superoxyde	$O^{2\cdot-}$	Radical formé par la réduction mono-électronique de l'oxygène, peu réactif mais toxique.
Radical hydroxyle	OH^{\cdot}	L'espèce radicalaire la plus réactive de l'oxygène, à une demi-vie extrêmement courte d'environ 10^{-9} s, capable de réagir très rapidement avec la plupart des biomolécules (ADN, protéines et lipides).
Oxygène singulet	1O_2	La forme excitée de l'oxygène moléculaire est souvent assimilée à un radical libre en raison de sa forte réactivité.
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	C'est une molécule non radicalaire, stable, présente une toxicité importante.

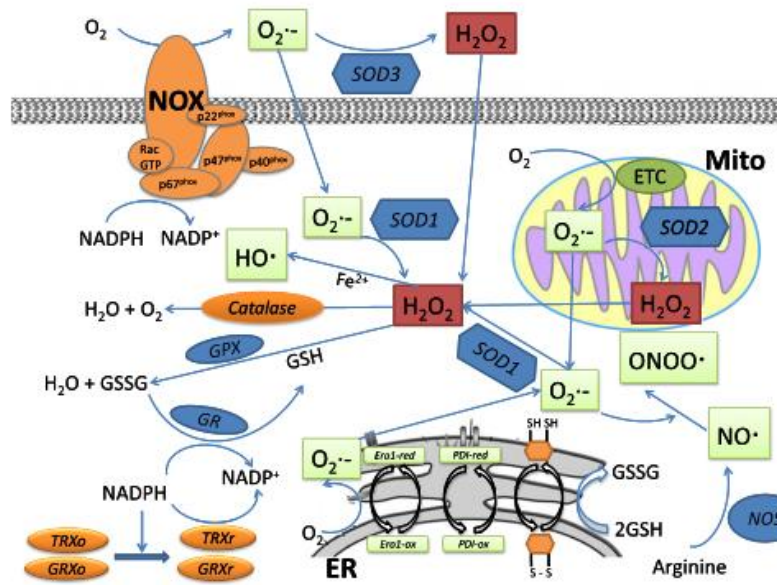


Figure 02 : Les ROS cellulaires radicalaires et non radicalaires (Ye et al., 2015).

1.4 Espèces azotées réactives (RNS)

Comme les ROS, les espèces réactives de l'azote (RNS) sont un autre ensemble de molécules de radicaux libres et non radicaux produites dans des conditions stressantes, qui conduisent à un stress nitrosatif. RNS est dérivé de l'oxyde nitrique qui sert de composant de signalisation clé dans divers mécanismes de tolérance, et certains d'entre eux sont également impliqués dans le cycle de l'azote (Frunghillo et al., 2014). Les principaux RNS dans les plantes sont cités dans le tableau 2.

Tableau 02: Les principales formes réactives de nitrogène (Augusto et al., 2002).

Les espèces réactives de l'azote	
nitricoxide($\cdot\text{NO}$)	nitrate(NO_3^-)
nitrogen dioxide($\cdot\text{NO}_2$)	nitrosonium cation (NO^+)
S-nitrosothiols (RSNO)	dinitrogen trioxide (N_2O_3)
peroxynitrite (ONOO^-)	dinitrogen tetroxide (N_2O_4)
nitroxyl anion (NO^-)	nitrylchloride (NO_2Cl)
nitrous acid (HNO_2)	

Ces dernières années, les espèces d'azote réactif (RNS) ont fait l'objet d'une attention considérable en raison de leur rôle indispensable dans les mécanismes régulant divers processus biologiques de croissance et de développement dans des conditions normales et de stress. Ils jouent un rôle central dans la dormance des graines et germination, croissance et développement des plantes, mouvements stomatiques, reproduction, vieillissement et sénescence, ainsi que dans les réponses des plantes aux stress environnementaux.

1.5 Espèces réactives du soufre (RSS)

Espèces réactives du soufre (RSS) sont des composés soufrés redox-actifs formés dans des conditions de stress oxydatif pouvant être à l'origine de réactions d'oxydation (Brannan, 2010). Les principales RSS sont citées dans le tableau 03.

Quelles sont donc les propriétés physiques et chimiques qui confèrent au soufre la capacité à former des espèces réactives ? Le soufre, comme l'oxygène, est un chalcogène, le nom donné aux éléments du groupe 16 (anciennement groupe VI) du tableau périodique. Les éléments de ce groupe chacun ont six électrons dans la coquille de valence et montrent de nombreuses propriétés chimiques similaires, y compris la possibilité d'exister dans différents états d'oxydation dans diverses molécules. Le soufre peut avoir des états d'oxydation allant de -2 à +6 sous ses différentes formes alors que l'oxygène a généralement une forme d'oxydation allant de -2 à 0 (Gruhlke et *al.*, 2012).

Tableau 03: Les principales formes réactives du soufre (Gruhlke et *al.*, 2012).

Les espèces réactives du soufre
Thiol (RSH) (\cdot NO)
Disulfide (RSSR) (\cdot NO ₂)
Sulfenic acid (RSOH)
Thiosulfinate (disulfide-S-monoxide) (RS(O)SR)
Thiosulfonate (disulfide-S-dioxide) (RS(O) ₂ SR)
Thiyl-Radical (RS \cdot)

2. Les sources d'espèces réactives

2.1 Les sources des ROS

Les sources de ROS sont à la fois extracellulaires (polluants, xénobiotiques, médicaments et radiation) et intracellulaires (Figure3). La majeure partie des ROS (généralement plus de 90%) dans les organismes vivants est produite par les chaînes de transport d'électrons mitochondrial, réticulum endoplasmique, membranes plasmiques et nucléaires, et système photosynthétique (Nemmiche, 2017).

La chaîne respiratoire mitochondriale constitue la source principale de production des radicaux libres, et environ 98 % de l'oxygène parvenant à l'intérieur de la mitochondrie est réduite pour former de l'eau par le cytochrome oxydase, mais une faible proportion de l'oxygène (2 à 5%) subit une réduction mono-électronique conduisant à la formation du radical superoxyde (Turrens, 2003).

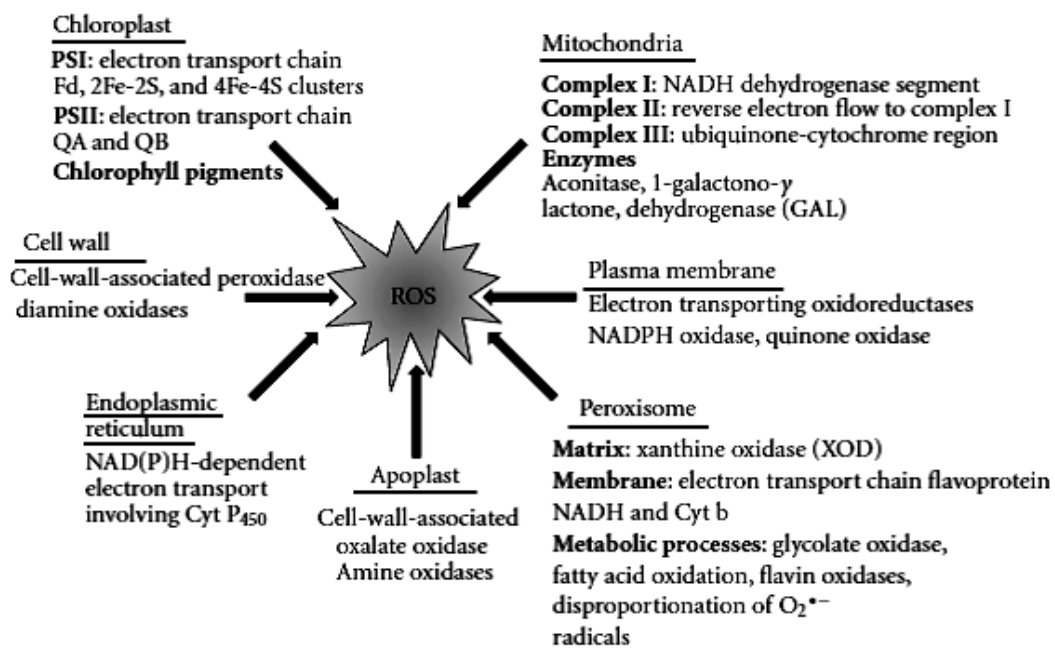


Figure 03 : Sites de production des espèces réactives de l'oxygène chez les plantes (Sharma et al., 2012).

2.2 Les sources des RNS

Chez les plantes, le NO est connu comme une molécule bioactive multifonctionnelle et joue un rôle important en tant que régulateur de la physiologie des plantes, de la résistance aux maladies, et de la tolérance au stress (Nabi et al., 2019).

Sa synthèse a été signalée pour la première fois il y a plusieurs décennies dans les légumineuses, cependant la source enzymatique exacte de NO reste encore à élucider. Plusieurs voies d'oxydation et de réduction découvertes pour la synthèse de NO, la détermination du mécanisme exact de la synthèse du NO et de la manière dont il est régulé dans les plantes est compliquée par l'existence de ces plusieurs mécanismes possibles de synthèse du NO.

Certaines études ont indiqué que la synthèse de NO peut se produire en réponse à un stress d'origine biotique et abiotique causé par la salinité, la sécheresse, le froid et les métaux lourds (Gould et al., 2003 ; Sun et al., 2012 ; Tan et al., 2012). D'autre part, la synthèse de NO chez les animaux a été bien documentée. Le NO est biosynthétisé par l'activité de l'enzyme NO synthase (NOS) (Figure 4), trois isoformes ont été identifiées chez les animaux : endothéliale (eNOS), neuronale (nNOS) et inducible (iNOS) (Alderton et al., 2001).

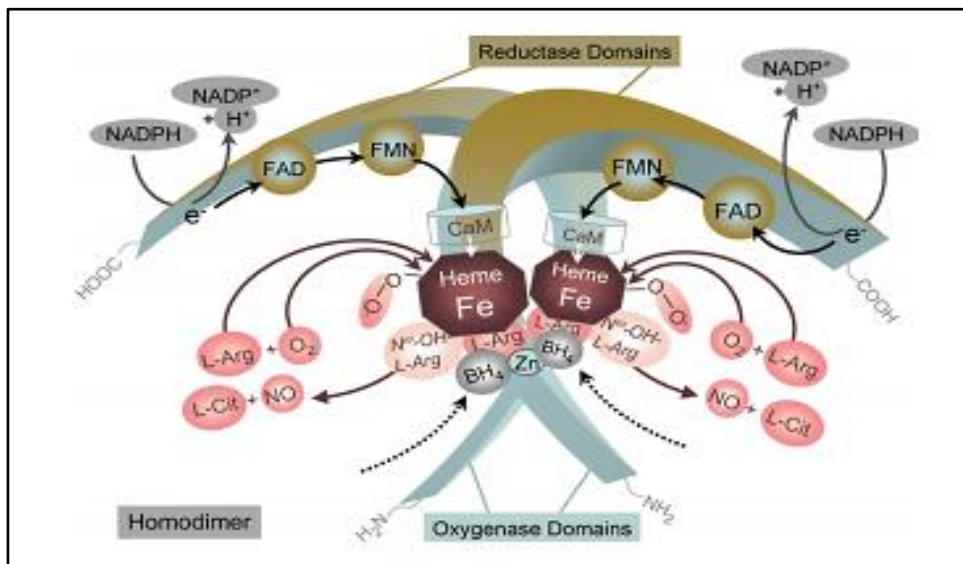


Figure 04 : Représentation schématique d'oxyde nitrique synthase (Forstermann et al., 2006).

2.3 Les sources des RSS

Les espèces réactives du soufre (RSS) sont chimiquement, biochimiquement et physiologiquement similaires aux ROS et peuvent être produites à partir d'oxydations séquentielles à un électron d'hydrogène sulfuré (H₂S) pour former un radical thiyle (HS[•]), de l'hydrogène persulfuré (H₂S₂) et un radical persulfuré (HS₂[•]) avant de terminer en soufre élémentaire (S₂) ; ce dernier se transforme généralement en S₈ (Olson, 2018) (Figure 5).



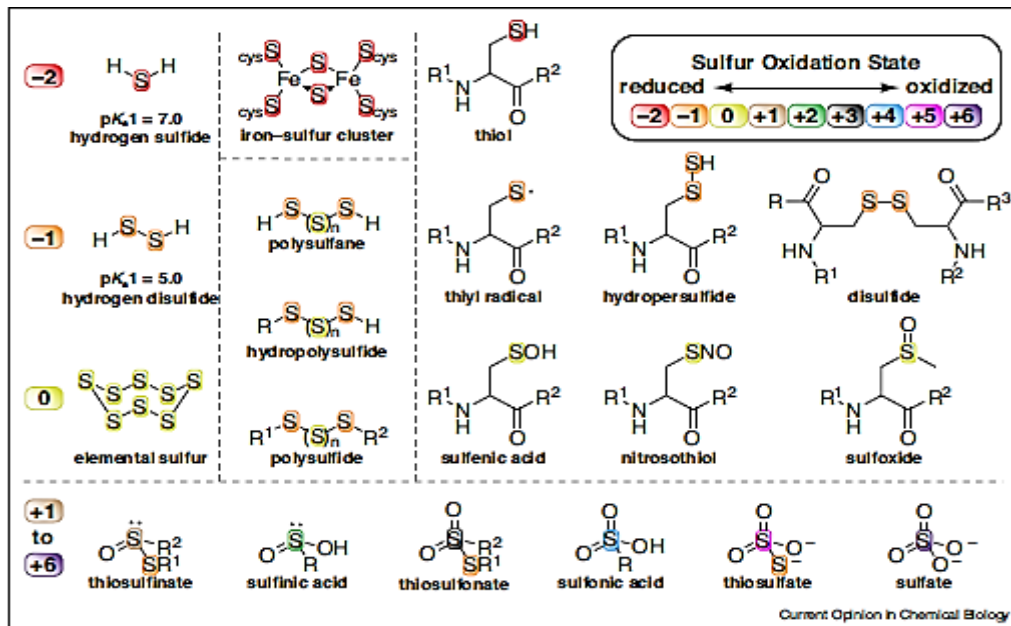


Figure 05 : Les états d'oxydation du sulfure des RSS sélectionnées (Mishanina et al., 2015).

3. L'importance des espèces réactives dans la vie d'une plante

Les ROS sont depuis longtemps reconnues pour leur importance dans la réponse des plantes aux contraintes environnementales. Certains symptômes observés en situation de stress d'origine biotique ou abiotique (par exemple, blanchiment des feuilles, nécroses) sont la conséquence d'une forte accumulation de radicaux libres oxygénés et d'une altération de l'homéostasie cellulaire.

Ces symptômes traduisent à la fois une oxydation de la chlorophylle au niveau des feuilles, mais aussi la mort par nécrose de cellules isolées ou de groupements de cellules dans les différents tissus végétaux (Figure 06). Ainsi, même si les ROS sont formées au cours du métabolisme normal de la plante, l'augmentation de leur concentration intracellulaire est souvent synonyme de stress. La plupart des symptômes liés aux conditions de stress est amplifiée par l'effet des ROS. Par exemple, une forte augmentation du taux de peroxyde d'hydrogène dans les chloroplastes et les peroxysomes est observée en réponse à une exposition à de fortes intensités lumineuses (Parent et al., 2008).

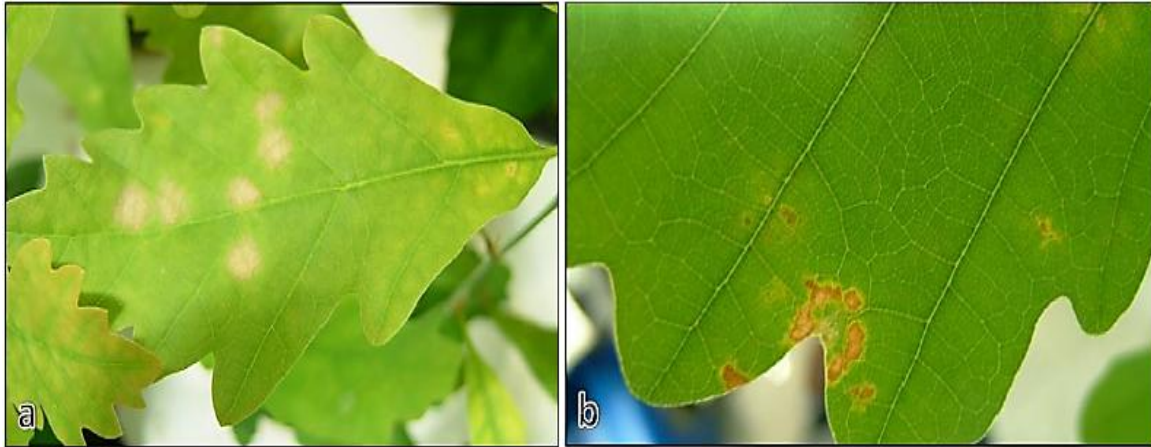


Figure 6 : Feuilles de chêne montrant (a) les symptômes d'oxydation de la chlorophylle et (b) les nécroses liées à la mort de cellules (Parent et *al.*, 2008).

De nombreuses études ont montré que les ROS peuvent aussi intervenir dans les cascades de signalisation responsables de l'induction et de la régulation de nombreux gènes de défenses. Les ROS sont désormais aussi considérées comme agents régulateurs de la mort cellulaire programmée (PCD : programmed cell death) chez les plantes. Ce processus de mort cellulaire, actif et contrôlé génétiquement, se retrouve tout au long de la vie des plantes. En effet, différents types cellulaires ou organes sont éliminés, au moment approprié, au profit de l'organisme et de la population ; ils constituent des modèles de la PCD végétale. Au cours du développement, la PCD est impliquée dans de nombreux phénomènes comme la germination (couche aleurone), la différenciation des vaisseaux conducteurs de la sève brute et élaborée, la croissance (coiffe racinaire), la reproduction (tube pollinique), ou bien encore la sénescence (feuilles). Par ailleurs, les plantes ont aussi recours à cette mort contrôlée pour s'adapter et résister aux conditions adverses de leur environnement, comme durant des déficiences en alimentation minérale ou hydrique, les extrêmes de température, l'hypoxie ou encore l'attaque pathogène (Parent et *al.*, 2008).

4. Les cibles des dérivés actifs de l'oxygène

Les espèces réactives oxygénées induisent des dommages au niveau moléculaire et cellulaire (Figure 7).

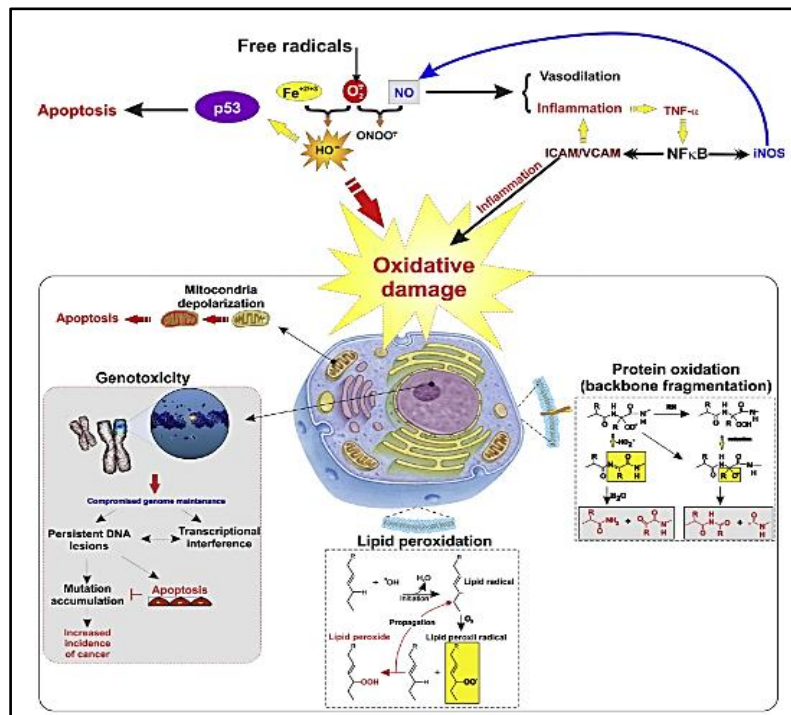


Figure 07 : Stress oxydatif au niveau des biomolécules (Sivandzade et al., 2019).

4.1 Les cibles lipidiques

L’oxydation des lipides ou peroxydation lipidique, correspond à la détérioration oxydative de doubles liaisons d’acides gras insaturés (AGI), dans des esters de glycérol (tissu adipeux), de phospholipides (membranes), ou de cholestérol (Valko et al., 2007) (Figure 8).

Les acides gras polyinsaturés sont les cibles privilégiées des ROS radicalaires en raison de leurs hydrogènes bis-allyliques facilement oxydables. Plus l’acide gras est insaturé et plus il est susceptible d’être peroxydé, c’est à dire dégradé par un processus oxydant non enzymatique.

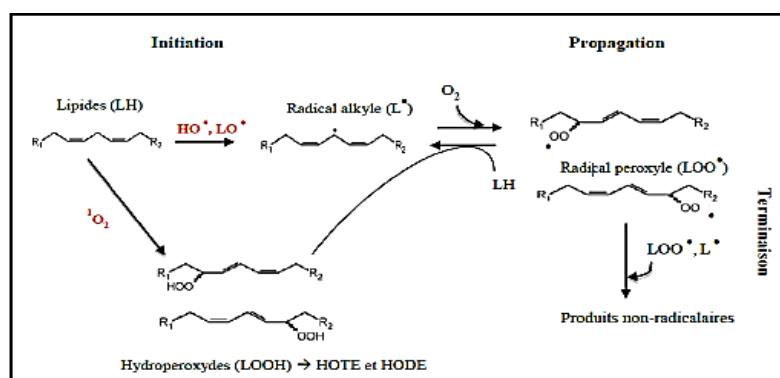


Figure 08 : Processus de la peroxydation des lipides (Loussouarn-Yvon, 2017).

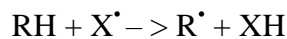
4.1.1 La peroxydation non enzymatique

Elle se définit par un enchaînement de réactions radicalaires se déroulant en trois étapes (Figure 9) :

La 1^{ère} réaction produit un radical libre par rupture homolytique d'une liaison carbone-hydrogène (= l'initiation).

Puis les réactions s'enchaînent pour produire plusieurs radicaux libres (=la propagation), qui se combinent pour former des composés non radicalaires (= la terminaison).

1) Initiation par déshydrogénation :

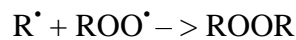
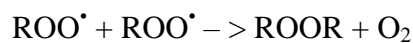
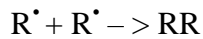


2) Propagation en présence d'O₂ :



3) Terminaison par dimérisation de R° :

Les radicaux formés précédemment réagissent entre eux pour conduire à plusieurs produits qui ne sont plus des radicaux libres :



Nous obtenons donc des peroxydes ROOR à l'étape finale.

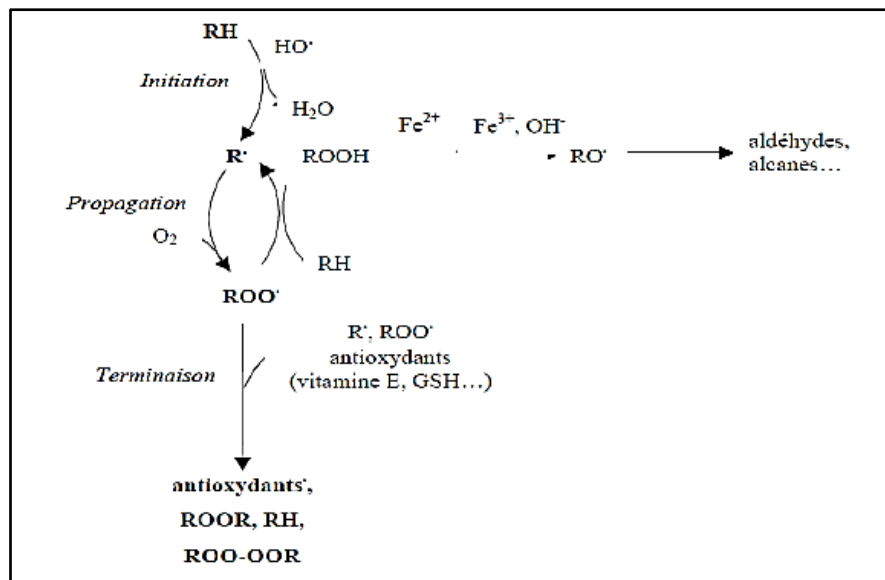


Figure 09 : La peroxydation lipidique non enzymatique (Januel, 2003).

4.1.2 Les conséquences de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique spontanée s'avère toujours néfaste. Dans les conditions physiologiques normales, elle reflète la toxicité de l'oxygène et a plusieurs conséquences (Kuhn *et al.*, 2002) :

- La présence d'un groupement peroxyde perturbe les interactions hydrophobes lipides/lipides et lipides/protéines, ceci conduit à des altérations structurales des membranes et des lipoprotéines ;
- La fluidité des membranes est diminuée et la perméabilité est augmentée, des enzymes et des récepteurs membranaires sont susceptibles d'être inactivés ;
- Les hydroperoxydes lipidiques sont à leur tour la source de radicaux libres qui peuvent induire des modifications secondaires des autres membranes et/ou des constituants des lipoprotéines.

4.2 Les cibles non lipidiques

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Nemmiche, 2017).

4.2.1 L'oxydation des sucres :

Les glucides sont des constituants organiques abondants chez les êtres vivants, on les trouve notamment chez les végétaux. Ils comprennent par exemple la cellulose, qui est le composé organique le plus représenté dans la biosphère, renfermant plus de la moitié du carbone organique. Ils sont attaqués par les ROS (H_2O_2 , $\cdot O_2^-$, $\cdot OH$ ou des radicaux peroxydes d'AG), avec abstraction d'hydrogène au niveau d'une des liaisons CH-OH. Le radical alkyle ($\cdot C-OH$) ainsi formé se combine immédiatement avec de l'oxygène pour former un carbonyle (C=O) et expulser un radical hydroperoxyde ($\cdot OOH$). L'opération se prolonge jusqu'à former un composé dicarbonylé.

Par auto-oxydation (RL), des sucres comme le glucose forment des composés dicarbonylés (contenant deux C=O), dont les plus connus sont les glyoxal et les glycolaldéhydes, qui pourront se lier à des protéines par réaction de Maillard et altérer les propriétés chimiques de celles-ci (Abid and Amarouche, 2016).

4.2.2 L'oxydation des protéines

Étant donné qu'elles sont abondantes, les protéines sont une cible importante pour les ROS. Une modification quelle que soit minime entraîne une perte d'une fonction à médiation protéique.

Il a été estimé que les protéines pouvaient piéger la majorité des ERO générés (50–75%). Leur oxydation affecte la fonction des protéines qui peuvent se fragmenter ou former des agglomérats les rendant susceptibles à la protéolyse, et résulte en la formation de protéines carbonylées (PC) dont l'accumulation peut être dosée comme témoin de l'oxydation (Clarkson et *al.*, 2000).

Suivant leur nature, les acides aminés subiront des attaques radicalaires présentant des successions de réactions différentes. L'oxydation des acides aminés est similaire à celle des sucres et implique une attaque radicalaire ($\text{LOO}^\bullet \rightarrow \text{LOOH}$, ou autre) sur un des groupes méthyle lié à un atome d'azote. Le radical d'acide aminé obtenu réagira avec l'oxygène pour former un composé avec expulsion d'un radical peroxyde d'hydrogène ou d'un peroxyde d'hydrogène, le composé obtenu étant ensuite transformé en un aldéhyde (Spiteller, 2006).

4.2.3 L'oxydation de l'ADN

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par OH^\bullet peuvent être générées. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaux, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines. Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation (Favier, 2003).

L'attaque radicalaire peut être directe et entraîne l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8 oxo guanine, 8 nitro guanine, formamidopyrimidine, 8 oxo adénine, formimido uracile, 5 hydroxy cytosine, 5 hydroxy méthyl uracile, thymine diol, oxazolone (Figure 10).

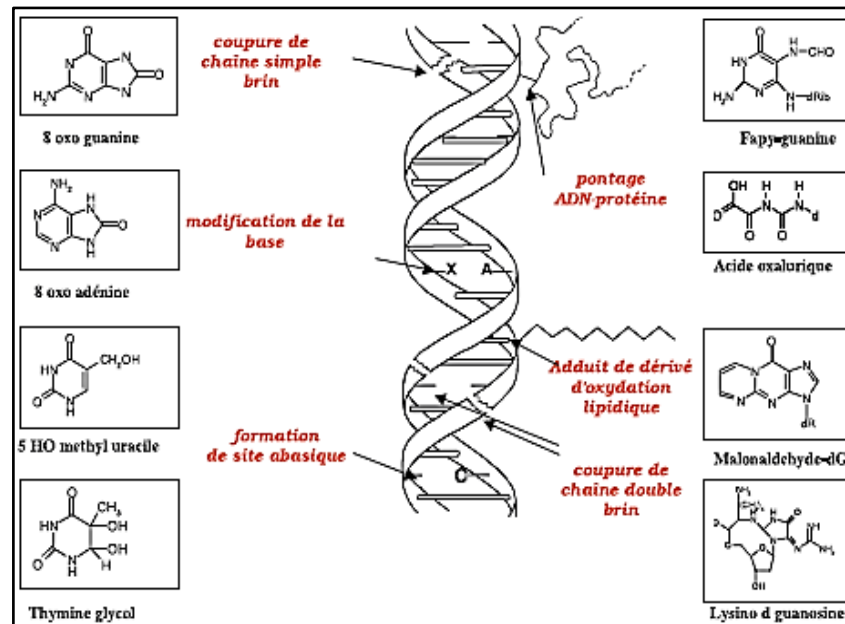


Figure 10 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).

5. Les systèmes de protection

Face aux attaques générées par les ROS, l'organisme doit se protéger et cela à partir de la synthèse des antioxydants. On peut définir un antioxydant comme étant une substance qui présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, aide significativement à retarder ou inhiber l'oxydation de ce substrat.

5.1 Les antioxydants enzymatiques

Les systèmes antioxydants enzymatiques sont largement représentés par les protéines cellulaires dont la principale fonction est de maintenir un environnement réduit à l'intérieur de la cellule en plus de maintenir les niveaux d'antioxydants extracellulaires. Les principales enzymes antioxydantes cellulaires sont représentées par la SOD, la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR) (Figure 11) (Ntimbane, 2009).

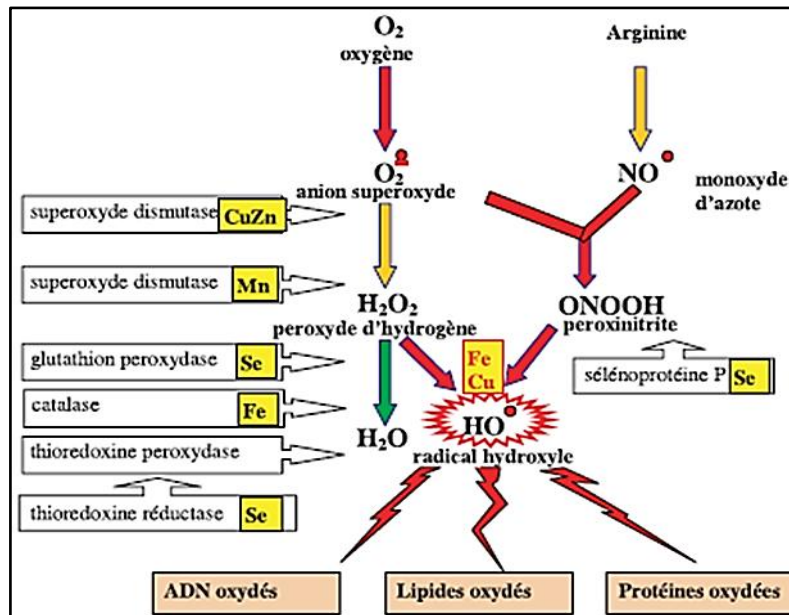


Figure 11 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

5.1.1 Les superoxydes dismutases (SOD)

Les superoxydes dismutases sont capables d'éliminer l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, formant avec deux superoxydes une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène (Favier, 2006).



Les superoxydes dismutases existent sous trois isoformes dont la structure d'ensemble est restée conservée, formant un puits hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse l'anion superoxyde. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature de ce dernier permettra de les distinguer, on y trouve les superoxydes dismutases à :

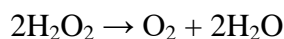
- manganèse (MnSOD)
- cuivre-zinc (Cu-ZnSOD)
- fer (Fe-SOD)

Tableau 04: Les différentes classes des SOD et leurs fonctions (Ganther, 1999).

Les classes de SOD	Fonction
MnSOD	-Protéger la mitochondrie.
cCu-ZnSOD	-Protéger le cytosol.
ecCu-ZnSOD	-Protéger la face externe de la membrane des cellules endothéliales.
pCu-ZnSOD	-Protéger le plasma sanguin.
Fe-SOD	-Principale enzyme capable de détruire le peroxyde d'hydrogène.

5.1.2 Catalase (CAT)

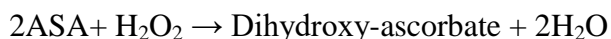
La catalase est une enzyme à hème qui réduit le peroxyde d'hydrogène en libérant l'oxygène et l'eau, elle est localisée surtout dans les peroxysomes et les hématies (Valko et *al.*, 2006). Cette enzyme métabolise l'H₂O₂ résultant de l'action des SOD ou celui généré par l'action des oxydases pour donner de l'eau.



En éliminant l'H₂O₂, la CAT détoxifie indirectement la cellule des O₂^{•-} qui sont transformés en H₂O₂ par les SOD (Ntimbane, 2009).

5.1.3 Ascorbate peroxydase (APX)

L'ascorbate peroxydase (APX) est une peroxydase de classe I qui utilise exclusivement l'ascorbate (AsA) comme donneur d'électrons pour piéger l'H₂O₂ selon la réaction (Gupta et *al.*, 2015) :



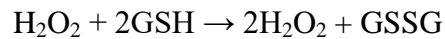
Il existe au moins neuf isoformes différentes d'APX (Mittler et *al.*, 2004). Le chloroplaste contient au moins trois isoformes, qui sont situées dans différentes parties du chloroplaste, comme le lumen (APX4), le stroma (sAPX) et les thylacoïdes (tAPX).

5.1.4 Les enzymes du cycle d'oxydoréduction du glutathion

5.1.4.1 Glutathion peroxydases (GPx)

Les glutathion peroxydases (GPx) sont des enzymes tétramériques à sélénium localisées dans le cytosol ainsi que dans la mitochondrie (Lacolley, 2007). La glutathion

peroxydase (GPx) détruit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit comme donneur de protons, ce qui provoque son oxydation en glutathion oxydé (GSSG) et aide les plantes à lutter contre le stress oxydatif selon la réaction suivante :



5.1.4.2 Glutathion réductases (GR)

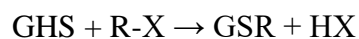
Le maintien de l'activité de la GSH-peroxydase nécessite la régénération du GSH qui est assurée par la GSH-réductase. Cette enzyme est une oxydoréductase de la famille des flavoprotéines. Elle catalyse la réduction du GSH en utilisant le NADPH comme cofacteur. Il s'agit d'une enzyme potentielle du cycle de l'ASH-GSH qui joue un rôle important dans le système de défense contre les ROS en maintenant l'état réduit du GSH (Benhamdi, 2014).

Chez les plantes, la GR est localisée principalement dans les chloroplastes, mais une petite quantité a également été trouvée dans les mitochondries et le cytosol.

5.1.4.3 Glutathion S-Transférases (GST)

Glutathion S-transférase est une famille des enzymes multifactorielles présentes chez tous les organismes. La glutathion-S-transférase (GST) est un système très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes.

L'activité de conjugaison du GSH avec les composés électrophiles est présentée comme suit :



C'est l'enzyme majeure de la détoxification enzymatique des xénobiotiques.

5.2 Les antioxydants non-enzymatiques

5.2.1 L'acide ascorbique (Vitamine C)

L'acide ascorbique ou vitamine C est un antioxydant omniprésent dans les plantes. Contrairement aux cellules animales, sa concentration est très élevée dans les cellules végétales où il y joue un rôle important dans la croissance, la différenciation et le métabolisme cellulaire (Foyer et *al.*, 1994). Néanmoins, il est beaucoup plus connu pour son action d'antioxydant très puissant.

L'ASC se lie avec le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou les radicaux de tocophérol pour donner l'acide mono-dehydroascorbique (MDHA) ou l'acide dehydroascorbique (DHA) (Figure 12).

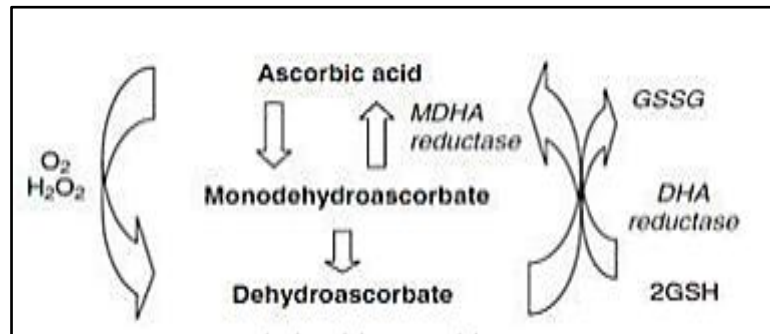


Figure 12 : Synthèse et dégradation de l'acide ascorbique (Lyubenova and Schröder, 2010).

Ces derniers peuvent être recyclés en acide ascorbique.

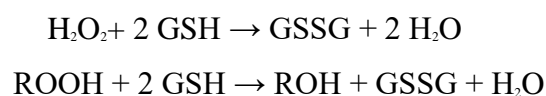
5.2.2 Alpha-tocophérols (Vitamine E)

Le tocophérol est une vitamine lipophile qui se localise dans la membrane des thylakoïdes et des chloroplastes. Ce sont des antioxydants majeurs qui protègent les membranes en piégeant les radicaux libres. Ils existent en quatre isomères dans la plante (α , β , γ , δ) qui se distinguent entre eux par le nombre et la situation des groupements méthyles fixés sur le cycle phénolique. La forme α possède la plus forte activité antioxydante due à la présence de trois groupes méthylés dans sa structure moléculaire.

5.2.3 Glutathion réduit (GSH)

Le glutathion est un tripeptide (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine), il se trouve de façon ubiquitaire chez les animaux et les végétaux où il est localisé dans tous les compartiments cellulaires comme le cytosol, le réticulum endoplasmique, vacuole, mitochondrie, chloroplastes, peroxysomes ainsi que l'apoplaste (Gill and Tuteja, 2010).

Chez les plantes, il joue un rôle important dans la régulation du développement des procédés tels que la division cellulaire (Vernoux et *al.*, 2000). Il est aussi impliqué dans multitude de processus cellulaires y compris la défense contre les ROS, la détoxification des xénobiotiques et la séquestration des métaux lourds (Nemmiche, 2017) selon la réaction suivante (Figure 13) :



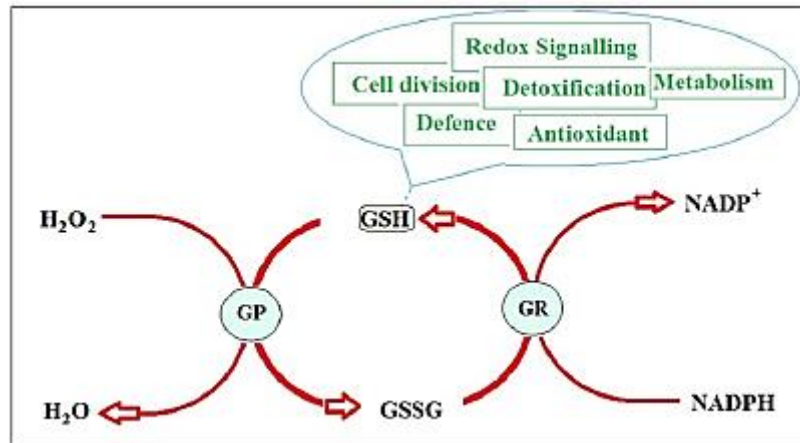


Figure 13 : Cycle redox du glutathion (Salbitani et *al.*, 2017).

5.2.4 Les groupements thiols

Les thiols sont des molécules proches des alcools, mais où l'atome d'oxygène est remplacé par un atome de soufre. Les groupements thiols (au sein des résidus cystéines des protéines ou des petits peptides) dans leur forme réduite peuvent également piéger des radicaux libres (Haleng et *al.*, 2007).

5.2.5 Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments végétaux lipophiles formant une famille de plus de 600 molécules, ils sont regroupés en deux familles : les carotènes et les xanthophylles. L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux ROO^\bullet , HO^\bullet , $O_2^{\bullet-}$, R^\bullet par simple addition électrophile et transfert d'électron. Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet (Valko et *al.*, 2006).

5.2.6 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels très répandus dans le règne végétal (Ghedira, 2005). C'est un des métabolites secondaires les plus réactifs dans les plantes, on le trouve généralement dans les feuilles, les parties florales et les pollens.

Ils assurent plusieurs fonctions telles que la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines, protection contre les rayons UV, défense contre les phytopathogènes. Ils jouent également un rôle dans la fertilité des plantes et la germination du pollen, et agissent comme

des molécules de signal dans les interactions plantes-microbes (Olsen et *al.*, 2010). Ils sont décrits pour leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres.

5.2.7 Proline

La proline est un acide aminé qui joue un rôle dans le métabolisme primaire en tant que constituant des protéines, outre cela elle est l'une des molécules souvent accumulées en réponse à des contraintes environnementales chez les plantes. Son accumulation résulte d'une activation de sa biosynthèse localisée à la fois dans le cytoplasme et dans le chloroplaste et de la répression de son catabolisme dans la mitochondrie (Ben Rejeb et *al.*, 2012).

La proline est considérée comme un antioxydant non enzymatique dont les plantes ont besoin pour agir contre les ROS formées lors d'un stress. Elle joue plusieurs rôles : stabilisateur de protéines et de complexes macromoléculaires, piègeur de radicaux libres, régulateur du potentiel redox cellulaire, et chélateur des métaux (Gill and Tuteja, 2010).

5.2.8 Polyphénols

Les polyphénols sont des antioxydants capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (Delattre et *al.*, 2005).

Chapitre II :

La fertilisation

1. Définition

La fertilisation est le processus consistant à fournir aux milieux de culture (tels que le sol) les minéraux nécessaires à la croissance et au développement des plantes. Son but est de répondre aux besoins des cultures à chaque stade de sa végétation.

La fertilisation doit tenir en compte :

- Le rythme d'absorption des éléments.
- La capacité d'échange du sol.
- La dynamique des éléments nutritifs.

2. Nutrition des plantes

2.1 Les besoins d'une plante

Les plantes, comme chaque être vivant, ont besoin de nourriture pour se développer et se reproduire. L'homme et les animaux consomment de la nourriture sous forme organique, c'est-à-dire dérivés de plantes ou d'animaux, néanmoins les plantes ont une particularité c'est qu'elles peuvent constituer des tissus organiques directement à partir d'éléments minéraux. Pour se développer, les plantes utilisent de l'eau et des substances minérales puisées à partir du sol, de la lumière, du carbone et de l'oxygène (Gherairia and Zerdoudi, 2018). Ces éléments se divisent en :

2.1.1 Les éléments majeurs

On trouve six minéraux essentiels pour le développement d'une plante qu'on appelle des éléments majeurs, on distingue : l'azote (N), le phosphore (P), le potassium (K), le soufre (S), le calcium (Ca) et le magnésium (Mg). Parmi les six éléments cités, les trois premiers, N, P et K sont des éléments cruciaux dont la plante a besoin en plus grandes quantités. Ce sont des éléments qu'on trouve dans la composition de la majorité des engrais chimiques.

2.1.2 Les oligo-éléments

Les oligo-éléments sont des micro-éléments dont la plante a besoin en petites quantités, on y trouve : le fer (Fe), le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le bore (B), le manganèse (Mg), le sélénium (Se), le molybdène (Mo), le sodium (Na), le cobalt (Co) et le chlore (Cl) (Coïc and Coppenet, 1989).

3. Les engrais

Les engrais étant des substances destinées à fournir à la plante les éléments nutritifs dont elle a besoin, il va de soi que les engrais sont principalement composés des éléments dont la plante a le plus besoin, c'est-à-dire l'azote (N), le phosphore (P) et le potassium (K). Et donc, on y trouve des engrais azotés, des engrais phosphatés et des engrais potassiques. On y trouve aussi des engrais soufrés, des fertilisants calciques et magnésiens et des engrais destinés à combler les carences en oligo-éléments (FAO, 2005).

3.1 Les différents types d'engrais

3.1.1 Les engrais simples

Ce sont des corps chimiques qui n'apportent qu'un seul des trois principaux éléments :

- L'azote.
- Le phosphore.
- Le potassium.

3.1.2 Les engrais composés

Ils apportent simultanément deux ou trois des éléments principaux. Ils sont binaires s'ils ne contiennent que deux composés comme le NK (13% N et 46% K_2O), ternaires lorsqu'il y en a trois comme le NPK.

4. Types de fertilisation

4.1 L'azote

4.1.1 La fertilisation azotée

L'azote est l'un des principaux constituants des acides aminés, des protéines et des acides nucléiques constituant les ADN et ARN. Une carence en azote peut avoir un impact sur la synthèse protéique et par conséquent la teneur en chlorophylle. Une application raisonnable d'azote est nécessaire pour un meilleur rendement sur le plan économique et environnemental. Les besoins de la plante dépendent de l'espèce, de la variété et de l'objectif de rendement. Le principe du bilan est la base du raisonnement, pour équilibrer au mieux les besoins de la plante cultivée et les différentes fournitures d'azote dont elle peut bénéficier. La quantité à apporter est calculée par différence entre les besoins totaux de la plante cultivée et les fournitures d'azote par le sol (Unifa, 2005).

4.1.2 L'azote dans le système sol-plante

La principale source d'azote est l'atmosphère où on le rencontre sous sa forme diatomique (N_2) (Figure 14). La fixation biologique, symbiotique ou non, est à l'origine de l'enrichissement du sol en produits organiques azotés. La majorité de l'azote du sol est formée d'azote organique qui ne sera disponible pour les plantes que par minéralisation, processus lié étroitement avec l'activité des microorganismes. Seule une petite fraction se trouve sous des formes inorganiques et est directement disponible pour les plantes. Ainsi, la matière organique constitue la principale réserve d'azote du sol (Henintsoa, 2013).

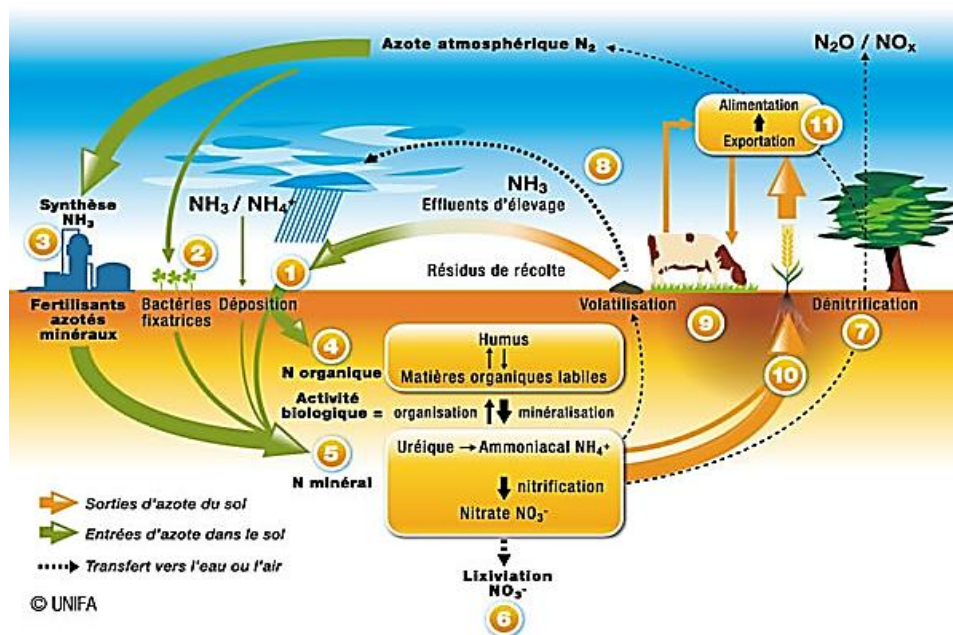


Figure 14 : Cycle de l'azote en agriculture (Unifa, 2005).

4.1.3 Rôles de l'azote

L'azote joue un rôle déterminant sur le rendement et la qualité de la production. Les plantes s'alimentent dans le sol en azote minéral et le transforment en protéines, qui constituent une partie importante de la vie humaine et animale (Unifa, 2005). L'azote rentre en grande majorité dans la constitution des cellules et la photosynthèse (chlorophylle). C'est le principal facteur de croissance des plantes et un facteur de qualité qui influe sur le taux de protéines des végétaux (Gherairia and Zardoudi, 2018).

4.1.4 Les formes d'azote absorbé par les plantes

Dans le sol, on trouve l'azote sous forme organique et inorganique. L'azote organique représente la majorité dans le sol (environ 85 à 95%), alors que l'azote inorganique est

rarement présent, plus de 10% c'est sous la forme de nitrate (NO_3^-) principalement absorbée par les cultures car c'est la forme préférentielle. Il existe des exceptions dans certains cas où la culture est en condition d'anoxie (Henintsoa, 2013).

4.2 La fertilisation phospho-potassique

4.2.1 Le phosphore

Le phosphore tient une place très importante dans la croissance et la reproduction des plantes, il est l'un des 17 éléments essentiels. Le phosphore est prélevé en plus faible quantité par rapport à l'azote et le potassium, par contre il est d'une extrême importance pour la nutrition des plantes et la production de biomasse (Unifa, 2005).

4.2.1.1 La fertilisation phosphatée

La fertilisation phosphatée a pour but de satisfaire les besoins de la plante en phosphore afin de réaliser les objectifs de rendement et de qualité, et donc de compléter l'offre du sol en maintenant son potentiel de production. La stratégie actuelle se fonde en premier lieu sur les besoins des plantes cultivées et ensuite sur la biodisponibilité en phosphore de la parcelle. Les critères principaux à prendre en compte sont : l'exigence en P_2O_5 de la culture, l'analyse de terre, le passé récent de fertilisation et les exportations de la culture (Unifa, 2005).

4.2.1.2 Rôles du phosphore chez les plantes

Le phosphore joue un rôle primordial dans le bon fonctionnement biologique des plantes, il participe à de nombreux processus physico-chimiques, biologiques et enzymatiques (Sanchez *et al.*, 2009). Il joue un rôle dans la multiplication cellulaire dans les méristèmes. Il est l'un des constituants des acides nucléiques, dans la respiration cellulaire et transfert d'énergie et dans la photosynthèse. Le phosphore active la croissance des bourgeons et des racines (Figure 15) et joue aussi le rôle d'activateur dans la mise en réserve des glucides. Le phosphore est mis en réserve dans les grains sous forme de phytate (Lerot, 2006).



Figure 15 : Effet du phosphore sur deux plantations (Unifa, 2005).

4.2.1.3 Formes du phosphore dans le sol

Une fois les réserves de la graine épuisées en phosphore, la plante doit trouver cet élément dans le sol à proximité de ses racines. Dans le sol, le phosphore se présente sous diverses formes, ces formes sont en fonctions de la mobilité et de la dynamique de cet élément. On y trouve :

- Le phosphore soluble : il est sous forme d'ions H_2PO_4^- ou HPO_4^- , il est dissous dans la solution du sol. La concentration de ces deux anions dépend étroitement du pH. Ce sont les seules formes de phosphore assimilables directement par les végétaux (White and Hammond, 2008),
- Le phosphore insoluble : le phosphore est non-labile dans la phase solide du sol. Ce phosphore ne fait pas partie des réserves assimilables de phosphore existant dans le sol car il ne sera disponible pour les végétaux qu'après plusieurs années (Sanchez et *al.*, 1997),
- Le phosphore facilement échangeable : le phosphore est labile dans la phase solide du sol, il est susceptible de passer en solution et d'être absorbé par les végétaux. Ce sont les phosphates adsorbés sur la surface des argiles et des hydroxydes de Fe et d'Al ainsi que sur les carbonates (Cheaïb, 2006).

4.2.2 Le potassium

Le potassium est très important dans la vie d'une plante, il participe directement à la formation et la croissance des cellules. On le trouve principalement sous forme du cation K^+ à l'intérieur des cellules animales et végétales où il participe au maintien de la pression osmotique. Chez les plantes, il circule dans les sèves brutes et élaborées.

4.2.2.1 La fertilisation potassique

Le potassium est l'un des trois éléments qui entre dans la composition des engrais tel que le NPK. Il est d'une importance cruciale, sa carence provoque une restriction et réduction de la taille des feuilles (Nafiu et *al.*, 2011).

4.2.2.2 Source de potassium

Dans le sol, les principales sources de potassium sont des minéraux tels que les feldspaths (en particulier l'orthoclase) et les micas, qui libèrent cet élément au cours de leur altération. Ce processus met le potassium à la disposition des plantes. Les produits de la mer sont eux aussi riches en potassium (Hillel, 2008).

4.2.2.3 Formes du potassium dans le sol

Dans le sol, le potassium apparaît sous trois formes :

- Le potassium des minéraux : intégré à la constitution des minéraux primaires des roches mères comme les micas, les feldspaths et certaines argiles, disponible qu'après une activité biologique longue provoquant l'altération de ces derniers.
- Le potassium rétrogradé : dit quand les ions K^+ passent de la surface externe des argiles pour s'insinuer à l'intérieur des feuillets d'argile.
- Ion échangeable K^+ adsorbé ou libéré des surfaces des particules d'argile.
- Dans la matière organique.

4.2.2.4 Le potassium et la plante

Le potassium se trouve en grande quantité dans la matière sèche des végétaux. Il circule en abondance dans la plante, et contribue dans de multiples rôles (Unifa, 2005).

- Maintien de l'équilibre acido-basique des cellules et la constitution de parois cellulaires résistantes.

- Agit sur la photosynthèse et favorise la formation des glucides dans la feuille.
- Réduit la transpiration des plantes afin de résister à la sécheresse.
- Favorise la circulation de la sève.

5. La biofertilisation

L'insécurité alimentaire mondiale est un problème chronique qui risque de s'aggraver avec le changement climatique, la croissance démographique rapide et la rareté des terres arables. Pour répondre à la demande alimentaire, il a fallu accroître l'application déséquilibrée de produits agrochimiques tels que les engrais et les pesticides pour la production agricole (Godfray et *al.*, 2010 ; Kumar et *al.*, 2017). L'utilisation intensive de ces produits agrochimiques a eu de graves conséquences, notamment la détérioration de la qualité des sols et de l'environnement (Nath et *al.*, 2016 ; Kumar et *al.*, 2017). Beaucoup d'agriculteurs dans le monde notamment ceux des pays développés se dirigent aujourd'hui vers l'agriculture biologique.

Les biofertilisants sont définis comme étant une substance contenant des microorganismes vivants, qui colonise la rhizosphère ou l'intérieur de la plante et favorise la croissance en augmentant l'apport ou la disponibilité des éléments nutritifs primaires à la plante hôte (Figure 16) lorsqu'elle est appliquée sur les semences, les surfaces de la plante ou le sol (Vessey, 2003). En outre, les biofertilisants sont des composants essentiels de l'agriculture biologique et jouent un rôle vital dans le maintien de la fertilité et de la durabilité des sols à long terme. C'est une manière de remplacer une partie des engrais chimiques, réduire leur quantité et le coût tout en empêchant ainsi la pollution de l'environnement due à leur application extensive, ce qui contribue à la durabilité des exploitations agricoles.

Par ailleurs, le biofertilisant devrait contenir des organismes vivants qui augmentent latenteur en éléments nutritifs de la plante hôte à travers leur existence permanente en association avec la plante (Vessey, 2003). De plus, le terme biofertilisant ne doit pas être utilisé de manière interchangeable avec les termes suivants : les engrais verts, fumier, cultures intercalaires ou organiques complétées d'engrais chimiques (Vessey, 2003).

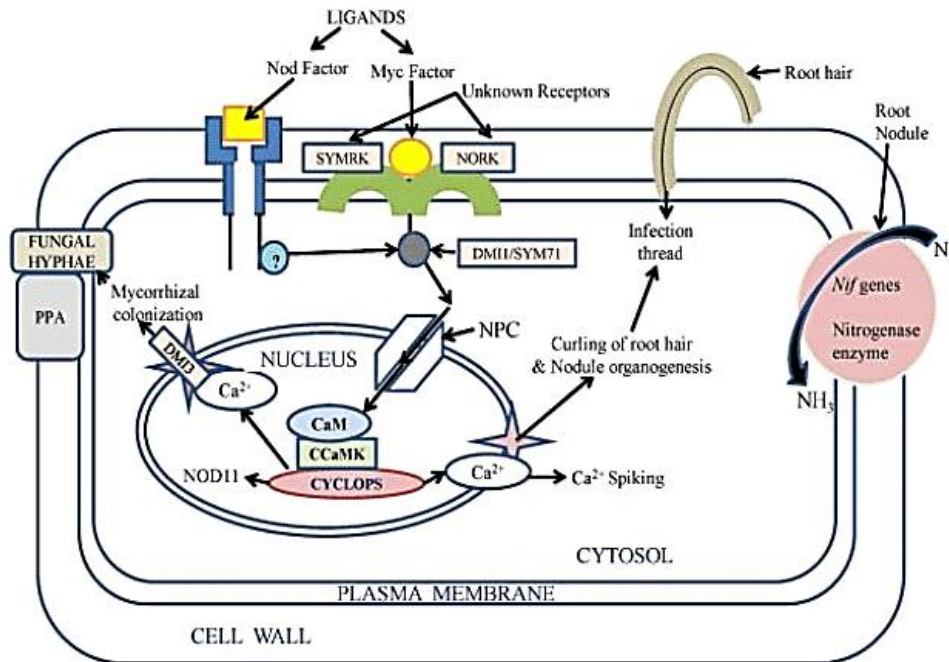


Figure 16 : Mécanisme hypothétique de l'action des fertilisants au niveau des cellules racinaires (Bhardwaj et al., 2014).

5.1 Quelques rhizobactéries utilisées comme biofertilisants

De nombreuses recherches et études sont liées à la gestion du système sol-végétal et micro-organismes, ont été développées dans le cadre de plusieurs projets internationaux. Elles ont permis d'identifier et de sélectionner de différents genres de rhizobactéries, telles que l'*Azospirillum* (Krieg and Döbereiner, 1984), *Raoultella* (Van Elsas et al., 2006) et *Bacillus* (Siddiqui, 2006). L'objectif de ces recherches était de développer un engrais biologique sous forme sèche et d'obtenir la concentration bactérienne nécessaire pour améliorer la croissance des plantes.

Le tableau 05 montre l'effet de l'utilisation des rhizobactéries sur l'augmentation de la croissance et de la protection aux maladies chez les plantes.

Tableau 05 : L'augmentation de la croissance des plantes et la protection aux maladies par les rhizobactéries (Mauricio, 2010).

Rhizobactéries	Culture	Effet	Références
<i>Pseudomonas fluorescence</i>	Betterave	Meilleure résistance aux maladies	Moenne-Loccoz et al., 1999
<i>Bacillus pumilus</i>	Tomate	Meilleure résistance aux maladies	Benhamou et al., 1998
<i>Bacillus pumilus</i>	Riz	Promotion de la croissance des plantes	Vasudevan et al., 2002
<i>Azospirillum brasilense</i>	Blé	Promotion de la croissance des plantes	Kim et al., 2005
<i>Pseudomonas Fluorescence</i>	Blé	Promotion de la croissance des plantes	De Freitas and Germida, 1992

5.2 L'activité microbiologique de la rhizosphère

La rhizosphère est une zone du sol située près des racines, et se caractérise par une activité microbiologique intense (Figure 17). Il s'agit d'un environnement écologique dynamique où les microbes et les plantes interagissent pour extraire des traces et de grandes quantités de nutriments d'une quantité limitée de sol (Gholami et al., 2012). Il s'agit également d'un environnement caractérisé par une grande quantité de matériel racinaire bénéfique pour un grand nombre de populations microbiennes (Miransari, 2011). La population se trouve naturellement dans les grains et le sol environnant (Marschner et al., 2001 ; Miethling et al., 2000). La rhizosphère est divisée en trois parties principales en interaction : la rhizosphère sol, la rhizoplane et les racines (Barea et al., 2005).

L'interaction bénéfique entre les plantes et les micro-organismes dans la rhizosphère est déterminante pour la santé des plantes et la fertilité des sols (Gholami et al., 2009). Il est reconnu que ces interactions dépendent non seulement des racines vivantes ou des matières végétales mortes disponibles, mais aussi de l'agronomie et de l'écologie (Barea et al. 2005). Les micro-organismes du sol sont essentiels au cycle des nutriments et au maintien de la santé et de la qualité du sol (Jeffries et al., 2003). Ils participent à des activités de base qui assurent la stabilité et la productivité des systèmes agricoles et des écosystèmes naturels (Barea et al., 2005).

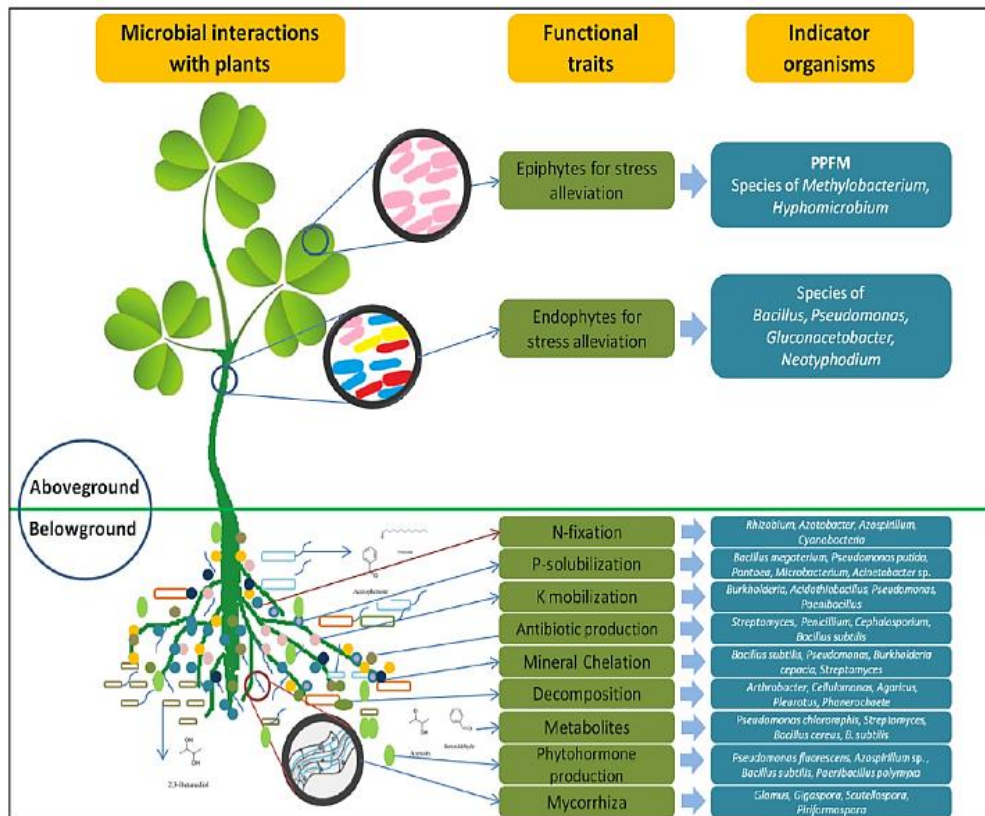


Figure 17 : Les associations microbiennes avec les plantes, sols et leurs attributs fonctionnels (Sahu *et al.*, 2018)

Lorsque des micro-organismes de cette rhizosphère sont ajoutés aux graines, à la surface des végétaux ou au sol, ils peuvent coloniser la plante et favoriser sa croissance en augmentant la disponibilité des nutriments (Vessey, 2003). Par conséquent, ils agissent comme fertilisants biologiques, appelés biofertilisants. Lorsqu'ils proviennent des bactéries et ont un effet positif sur les plantes, elles peuvent aussi être appelées « plant growth promoting bacteria » (PGPB) (Bashan and Holguin, 1998).

5.3 Les PGPB

Ce sont des bactéries du sol, de la rhizosphère, de la rhizoplane, de la phyllosphère ou endophytes qui sont bénéfiques pour les plantes dans certaines conditions (Bashan and de-Bashan, 2005), et sont utilisées pour augmenter le rendement de diverses cultures (Bashan *et al.* 2008). Les PGPB sont divisées en deux groupes qui peuvent stimuler directement et indirectement la croissance des plantes. Le premier groupe affecte directement le métabolisme des plantes en fournissant des substances qui sont généralement en quantités limitées dans le sol. Le deuxième groupe est appelé biocontrôle-PGPB, qui ne stimule pas directement le métabolisme des plantes. Cependant, il affecte de façon indirecte la croissance de celles-ci par

la prévention des effets causés par des phytopathogènes tels que les bactéries, les champignons, les nématodes et les virus (Bashan et *al.*, 2008). Il existe un sous-groupe des PGPB, appelé les PGPR (plant-growth-promoting-rhizobacteria) ou rhizobactéries, ce sont des bactéries bénéfiques les plus utilisées dans la composition des biofertilisants (Zablutowicz et *al.*, 1991).

5.3.1 Les PGPR

Les PGPR ou « Plant Growth-Promoting Rhizobacteria » des bactéries qui se développent dans la rhizosphère, elles ont un effet positif sur les plantes, pour ces effets on les considère comme rhizobactéries promotrices de la croissance végétale (Herman et *al.*, 2008 ; Minorsky, 2007). Ces bactéries sont utilisées en agriculture pour la biofertilisation des sols, en fixant l'azote dans l'atmosphère, puis, ce dernier va être utilisé par les plantes, améliorant leur croissance lorsque l'azote du sol est limitant.

La fixation biologique de l'azote, joue un rôle primordial dans le cycle de l'azote. Les bactéries fixatrices d'azote ont un complexe enzymatique, appelé nitrogénase, qui peut réduire l'azote moléculaire en ammoniacque. Ces bactéries présentent une grande diversité dans leur mode de vie et leur intégration avec les plantes. Elles peuvent induire la croissance des plantes par la promotion directe ou indirecte (Verma et *al.*, 2010).

5.3.1.1 La promotion directe

Ce mécanisme comprend la stimulation bactérienne des phytohormones (auxine ou cytokine). Cela permet aux plantes de développer un système racinaire riche leur permettant de s'installer sur une plus large gamme de sols, et d'améliorer l'état nutritionnel des plantes (Solano et *al.*, 2009).

5.3.1.2 La promotion indirecte

Ce mécanisme est basé sur la capacité des PGPR à atténuer les effets nocifs sur la plante : la dégradation des xénobiotiques dans les sols contaminés par la production des métabolites toxiques aux pathogènes du sol et l'hydrolyse des molécules libérées par des agents pathogènes tels que les *Pseudomonas*, qui ont la capacité de décomposer l'acide fusarique (un composé qui provoque la pourriture des racines causée par les champignons) (Solano et *al.*, 2009).

L'effet phytobénéfique indirect des bactéries PGPR est produit par l'interaction entre PGPR et des pathogènes et/ou parasites de la plante, et au cours de ce processus, les effets

négatifs de ces derniers sont réduits (Rezzonico et *al.*, 2007). Ces interactions correspondent souvent à de la compétition ou de l'antagonisme (Bally and Elmerich, 2007).

5.3.2 Les rôles des PGPR

Certaines souches de PGPR du genre *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospira* et *Rhizobia* ont montré un effet positif direct sur la croissance des plantes et l'augmentation du rendement des cultures (Vessey, 2003). Les PGPR peuvent favoriser la croissance des plantes hôtes par le biais de divers mécanismes (Figure 18).

A. La fixation d'azote (N₂)

Le sol contient de nombreuses espèces de bactéries qui peuvent convertir l'azote atmosphérique en ammoniac. Beaucoup de ces micro-organismes vivent à la surface des racines des plantes et même dans les tissus de certains végétaux. L'ammoniac est rapidement converti en nitrates par les bactéries du sol.

B. La résistance aux pathogènes du sol

Certaines souches de PGPR sont capables d'excréter des métabolites actifs contre différentes bactéries et champignons. Certaines de ces molécules sont des véritables antibiotiques, et jouent un rôle important en inactivant les facteurs de germination des pathogènes ou en dégradant leurs facteurs pathogènes (comme les toxines).

C. La croissance racinaire

Certaines bactéries ont la capacité de produire des substances régulatrices de la croissance des plantes, telles que l'AIA (acide indole 3-acétique), les cytokinines et d'autres. Ces substances peuvent inciter les plantes à développer des systèmes racinaires (augmentant le diamètre et la longueur des racines).

D. L'amélioration de la qualité du sol

Les micro-organismes du sol dégradent les matières organiques solubles et insolubles, puis libèrent les minéraux disponibles pour les plantes.

E. Induction de l'immunité

Certaines PGPR peuvent stimuler le système immunitaire de la plante et la rendre résistante à certains virus, champignons et même bactéries pathogènes. Le phénomène est désigné ISR (Induced Systemic Resistance) ou résistance systémique induite.

F. Augmentation de la biodisponibilité de certains éléments essentiels :

Certaines PGPR produisent des sidérophores permettant la chélation du fer, de sorte que ce dernier sera ensuite absorbé par les plantes ou par des enzymes de type phytase permettant la solubilisation des phosphates.

G. Tolérance au stress

Certaines PGPR produisent de l'ACC désaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylate), qui favorise le développement des plantes en réduisant leur production d'éthylène (hydrocarbure gazeux incolore). Les PGPR produisant cette enzyme peuvent atténuer de nombreux stress causés par l'infection, l'absorption de métaux lourds, une salinité élevée et même la sécheresse des plantes (Benmati, 2014).

Toutes ces activités font des PGPR une alternative biologique et écologique intéressante à considérer par rapport aux différents produits chimiques synthétiques existants.

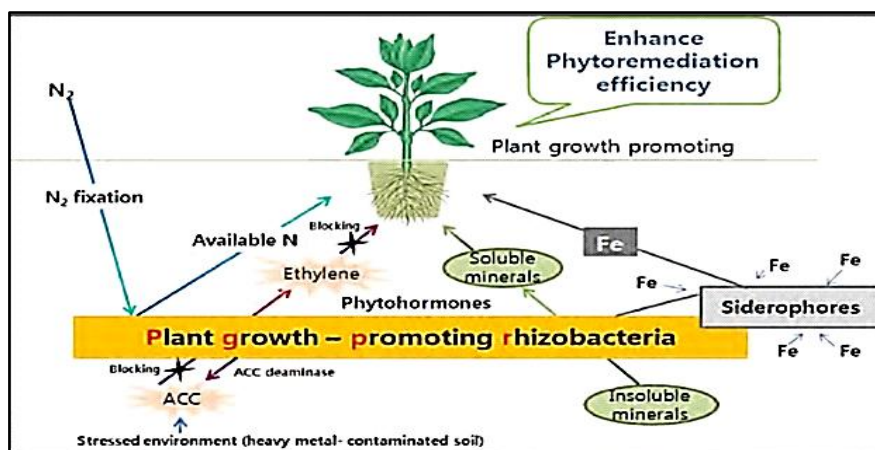


Figure 18 : Les différents rôles de PGPR (Benmati, 2014).

5.3.3 Quelques bactéries PGPR

5.3.3.1 Les bactéries du genre *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* appartiennent au phylum des *Proteobacteria*, classe des *Gamma proteobacteria*, ordre des *Pseudomonales*. Ce sont des bacilles droits et fins, à gram négatif, avec extrémités arrondies et une taille moyenne de 2 sur 0,5 µm (Palleroni, 2015). Ces bactéries sont mobiles grâce à une ciliature polaire monotriche, lophotriche ou multitriche, elles utilisent de nombreux substrats hydrocarbonés comme sources de carbone et d'énergie.

Les *Pseudomonas* se caractérisent par une grande capacité à coloniser la rhizosphère, et les racines des plantes, elles sont capables de former des associations étroites avec leurs

hôtes (Höfteand de Vos, 2006), réduisant ainsi le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (Reyes et *al.*, 2004).

5.3.3.2 Les bactéries du genre *Bacillus*

Les *Bacillus* sont un genre de bactéries à gram positif, et appartient à la famille des bacillacées (*Bacillaceae*), l'ordre des bacillales (*Bacillales*), la classe des bacilles (*Bacilli*). Ces bactéries peuvent produire des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables. Ces bactéries sont les plus abondantes dans la rhizosphère, et l'activité PGPR de certaines de ces souches a été connue depuis longtemps (Probanza et *al.*, 2002). Elles sont utiles comme agents de lutte biologique (Nagórska et *al.*, 2007) et peuvent dissoudre les phosphates pour produire de l'AIA, du sévoflurane et des agents antifongiques (Charest et *al.*, 2005). Ces bactéries se trouvent souvent près des racines des plantes, ou certaines espèces jouent un rôle dans la fixation de l'azote.

5.3.3.3 Les bactéries du genre *Azospirillum*

Azospirillum est une bactérie mobile, à Gram négatif, elle appartient à l'ordre des *Rhodospirillales*, liée avec les racines des monocotylédones, en particulier les cultures importantes telles que le blé, le maïs et le riz. Plusieurs souches d'*Azospirillum* ont montré des effets bénéfiques sur la croissance des plantes et sur le rendement des cultures, en serre ou dans des essais au champ, sous divers sols et diverses conditions climatiques, et sont donc qualifiées de PGPR. L'association entre *Azospirillum* et la plante produit des changements morphologiques et physiologiques dans les racines. Les bactéries produisent de l'hormone de croissance, l'AIA, qui favorise une augmentation de la surface du système racinaire, augmentant ainsi l'absorption de l'eau et des minéraux. De plus cette association peut fixer de manière symbiotique l'azote atmosphérique (jusqu'à 50 kg de N/ha/an) favorisant ainsi la croissance et le rendement des cultures (Bashan et *al.*, 2004).

5.3.4 Mode d'action des PGPR

Plusieurs souches de PGPR ont été utilisées avec succès pour inoculer des cultures, y compris des membres du genre *Azospirillum* (Cassan et *al.*, 2008), *Bacillus* (Jacobsen et *al.*, 2004), *Pseudomonas* (Loper et *al.*, 2007), et *Rhizobium* (Long, 2001).

Les bactéries d'*Azospirillum* ont été identifiées comme des bactéries de la rhizosphère, et leur mécanisme de coloniser la rhizosphère a été étudié par divers chercheurs (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000).

Le lien entre les plantes et les bactéries bénéfiques montre une réponse protectrice dans des conditions environnementales restrictives. L'inoculation peut favoriser l'allongement des racines, le développement des racines latérales et adventives, les poils absorbants et la ramification des poils racinaires (Molina-Favero et *al.*, 2008).

Le développement morphologique de ces racines est déclenché par des phytohormones synthétisées par les bactéries de la rhizosphère. Un nombre croissant de recherches et d'études porte sur la gestion du système sol-végétal et micro-organismes. Ils ont permis notamment l'identification et la sélection de différents genres de rhizobactéries, telles que l'*Azospirillum* (Krieg and Döbereiner, 1984), *Raoultella* (Van Elsas et *al.*, 2007) et *Bacillus* (Siddiqui, 2006).

5.4 L'importance des PGPR dans l'acquisition des plantes d'une tolérance aux stress biotique et abiotique

Les plantes sont touchées de la même manière par le stress abiotique et biotique, qui peut être unique, multiple et/ou combiné (Pandey et *al.*, 2017). Le stress combiné fait référence à un certain degré à un chevauchement complet entre différents stress. La cooccurrence de la sécheresse et du stress thermique pendant l'été est un exemple de stress combiné. D'autres exemples de stress combinés pourraient être le stress de salinité et de chaleur (chez les plantes qui poussent dans des conditions arides et semi-arides), et le stress de froid et de lumière intense (chez les plantes qui poussent en Méditerranée).

Les souches de *P. aeruginosa*, seules ou en combinaison avec *Trichoderma viride* ont fait preuve d'un biocontrôle significatif contre les nématodes infectant les racines de gombo (nœuds racinaires) et contre *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* et *Meloidogyne javanica*, ce qui a eu un impact positif sur la croissance de la plante en améliorant sa hauteur, le poids des pousses fraîches et la longueur des racines (Afzal et *al.*, 2013).

Partie II :
Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Le but de l'étude

Notre travail a été réalisé au sein de l'Université de Mostaganem. L'objectif de cette recherche est de déterminer l'effet des différentes doses agricoles de l'engrais chimique NPK sur la culture de tomate, sur les composés phénoliques ainsi que le métabolisme oxydatif de la plante comme biomarqueurs de l'état de santé de la culture.

Pour cela, notre étude est réalisée comme suite :

- Préparation des extraits à partir de matériel végétal utilisé.
- Dosages des polyphénols totaux et flavonoïdes.
- Estimation des pigments chlorophylliens et caroténoïdes.
- Détermination des marqueurs du stress oxydatif.
- Mesure de l'activité antioxydante.
- Détermination de l'activité antioxydante non enzymatique.

2. Matériel végétal

2.1 Description botanique de l'espèce

La tomate (*Solanum lycopersicum* L.) est une plante climactérique, diploïde (Judd et *al.*, 2002), qui appartient à l'ordre des solanales et à la famille des *Solanaceae* et genre *Lycopersicon* (Atherton and Rudich, 1986). Ses feuilles sont alternées, simples, et sans stipules. Les fleurs sont actinomorphes, autogames, de couleur jaune et réunie en inflorescences pentamères. L'ovaire supère est formé d'au moins deux carpelles soudés, et comprend de très nombreux ovules en placentation axile (Judd et *al.*, 2002). Le fruit est une baie plus ou moins grosse, de forme variable (sphérique, oblongue, allongée), et de couleurs variées (blanche, rose, rouge, jaune, orange, verte, noire) selon les variétés (Renaud, 2003). Les graines sont réparties dans des loges remplies de gel. La paroi de l'ovaire évolue en péricarpe charnu et délimite des loges.

2.2 La classification

- Règne : Plantae
- Sous-règne : Tracheobionta
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Asteridae

- Ordre : Solanales
- Famille : *Solanaceae*
- Genre : *Solanum*

2.3 Conditions de culture optimales

2.3.1 Le climat et le sol

2.3.1.1 La température et la lumière

La tomate demande un climat relativement frais et sec pour fournir une récolte abondante et de qualité. Cependant, la plante s'est adaptée à une grande diversité de conditions climatiques, allant du climat tempéré vers le climat tropical chaud et humide.

La température optimale pour la plupart des variétés se situe entre 21 et 24°C. Les plantes peuvent surmonter un certain intervalle de températures, mais en dessous de 10°C et au-dessus de 38°C les tissus des plantes seront endommagés. La tomate réagit aux variations de température qui ont lieu pendant le cycle de croissance (Tableau 6). Si les périodes de froid ou de chaleur continuent pendant la floraison, la production de pollen diminuera. Cela affectera la formation des fruits. Le gel tue la tige de tomate. Pour éviter les dommages dus au gel, il est recommandé d'attendre la fin de l'hiver avant de planter. Si vous plantez des graines à l'intérieur, cela peut être fait plus tôt (dans des pots de fleurs ou des caissettes). L'intensité lumineuse affecte la couleur des feuilles, la mise à fruits et la couleur des fruits (Shankara et *al.*, 2005).

Tableau 06 : Températures requises pour les différentes phases de développement d'un pied de tomate (Shankara et *al.*, 2005).

Phases	Température (° C)		
	Min	Intervalle optimale	Max
Germination des graines	11	16-29	34
Croissance des semis	18	21-24	32
Mise à fruits	18	20-24	30
Développement de la couleur rouge	10	20-24	30

2.3.1.2 L'eau et l'humidité

Le stress causé par le manque d'eau et la sécheresse prolongée provoque la chute des bourgeons et des fleurs. En revanche, lorsque l'averse est très intense et que l'humidité est élevée, la croissance de moisissure et de pourriture des fruits deviendra plus importante (Shankara et *al.*, 2005).

2.3.1.3 Le sol

Les tomates poussent bien sur la plupart des sols minéraux avec une bonne rétention d'eau, une bonne aération et en absence du sel. Elles préfèrent les terres limoneuses profondes et bien drainées. La couche superficielle du terrain doit être perméable. La profondeur du sol de 15 à 20 cm est bonne pour la croissance saine de cultures saines. Dans un sol argileux épais, un labourage profond permettra aux racines de mieux pénétrer. Les tomates ont une tolérance au pH modérée, mais poussent mieux dans des sols avec un pH entre 5,5 et 6,8 et où l'approvisionnement en éléments nutritifs est suffisant. Généralement, l'ajout de substances organiques favorise une bonne croissance. Les sols contenant de grandes quantités de matière organique, tels que les sols tourbeux, sont moins appropriés en raison de leur grande capacité de rétention d'eau et de leur nutrition insuffisante (Shankara et *al.*, 2005).

2.4 Les maladies de la tomate

Les tomates sont sensibles aux bactéries, aux virus et aux moisissures qui peuvent inévitablement causer des maladies dans les feuilles, les fruits et les racines. Les infections virales provoquent souvent des retards de croissance et une diminution de la production. Les dommages causés par les maladies peuvent entraîner une réduction significative de la récolte. Les principales maladies sont :

- Le flétrissement bactérien (*Ralstonia solanacearum*) :

Les bactéries qui causent cette maladie se trouvent le plus souvent dans les basses-terres des pays tropicaux relativement chauds. C'est une maladie transmise par le biais du sol. Les symptômes initiaux des plantes infectées sont un flétrissement des feuilles terminales, suivi après 2 à 3 jours d'un flétrissement soudain et permanent sans jaunissement.

➤ Le mildiou (*Phytophthora infestans*) :

Cette moisissure peut être trouvée dans toutes les régions du monde, mais elle se trouve le plus souvent dans les régions montagneuses ou les basses terres dont les conditions climatiques sont fraîches et humides.

➤ L'alternariose (*Alternaria solani*) :

On trouve cette moisissure partout, et en particulier au cours des périodes humides et les climats chauds. Elle se propage par le biais des graines, du vent, de la pluie et des restes de culture infectés.

➤ Le virus de la mosaïque du concombre « *Cucumber mosaicvirus* » ou CMV :

Le CMV entraîne le rabougrissement des pieds de tomates. Les feuilles peuvent montrer de légères marbrures vertes ou des symptômes de filiformisme plus poussé où les limbes sont considérablement réduits. Les fruits sont de taille réduite (Shankara et al., 2005).

3. Extraction et dosage des polyphénols

3.1 Extraction

Une quantité de 400 mg du matériel végétal (feuilles) est broyée dans 10 ml d'éthanol à 80 %, et chauffée pendant 10 minutes à 60°C. Les solutions sont centrifugées à 6000 tr/min pendant 10 minutes, en utilisant une centrifugeuse Hettich – Rotofix 32A.

3.2 Dosage des polyphénols totaux

L'estimation de la teneur en polyphénols totaux contenue dans les extraits (feuilles) est réalisée par dosage au spectrophotomètre, selon la méthode d'Ouerghemmi et al (2017). Cette méthode repose sur l'utilisation du réactif de Folin-ciocalteu.

➤ **Principe**

Cette méthode est basée sur les réactions d'oxydoréduction, le réactif de Folin-Ciocalteu, acide de couleur jaune, est utilisé comme oxydant, il est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$).

Lors de l'oxydation des polyphénols, le folin est réduit en un mélange bleu d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) en présence de carbonate de sodium. L'intensité

de la coloration est proportionnelle aux taux des polyphénols présents dans les extraits (Ribéreau-Gayon, 1968).

➤ Mode opératoire

Un volume de 125 μL pour chaque extrait est introduit dans des tubes à essai, le mélange (500 μL de H_2O et 125 μL de réactif de Folin-Ciocalteu) est additionné. Les tubes sont agités et incubés à la température ambiante pendant 4 minutes. Après l'addition de 1250 μL de bicarbonate de sodium Na_2CO_3 (7%) au mélange, le volume total est complété à 3ml par l'eau distillée, et les polyphénols totaux sont déterminés après 1 heure et 30 minutes d'incubation à la température ambiante. L'absorbance de la couleur bleue a été mesurée au $\lambda_{\text{max}} = 760 \text{ nm}$ avec un spectrophotomètre Rayleigh VIS -7220G UV/VIS. La courbe standard est réalisée par l'acide gallique. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide gallique (EAG) par gramme de matière fraîche.

3.3 Dosage des flavonoïdes

➤ Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (Ribereau and Gayon, 1968).

➤ Mode opératoire

Le contenu flavonoïque a été déterminé selon la méthode décrite par Zhishen et *al.* (1999). Un mélange réactionnel composé de 250 μL de surnageant et 75 μL de nitrate de sodium NaNO_2 à 5 % est incubé pendant 5 minutes, puis, on ajoute au mélange 150 μL de trichlorure d'aluminium AlCl_3 à 10 % (m/v), suivie par une 2^{ème} incubation de 6 min à température ambiante. Par la suite 500 μL d'hydroxyde de sodium NaOH (1M) est ajouté, le volume total est complété à 1525 μL d'eau distillée. Après agitation, la lecture se fait à 510 nm contre le tube blanc en utilisant un spectrophotomètre Rayleigh VIS -7220G UV/VIS. Une gamme étalon est réalisée par la quercétine dans les mêmes conditions opératoires.

4. Quantification des pigments chlorophylliens et caroténoïdes

La chlorophylle est le principal pigment assimilateur des végétaux photosynthétiques, elle est située dans les chloroplastes des cellules végétales, intervient dans la photosynthèse, processus de conversion de l'énergie solaire en énergie chimique.

Il existe 2 principales structures chimiques de la chlorophylle : chlorophylle a et b, et 3 autres formes sont moins communes : la chlorophylle c, d, et f.

➤ Mode opératoire

Les chlorophylles et les caroténoïdes ont été déterminés suivant la méthode décrite par Lichtenthaler (2001). 100g de feuilles sont placées dans un mortier, broyé avec 4 ml d'éthanol à 95 %. L'extraction se fait dans l'obscurité pour éviter toute sorte d'oxydation de la chlorophylle. Après 24h, les teneurs en caroténoïdes et en chlorophylles (a et b) sont déterminées respectivement par la mesure de l'absorbance à 470 nm, 670 nm, et 645 nm à l'aide d'un spectrophotomètre JENWAY 6715 UV/VIS.

Les teneurs en pigments ont été calculées comme suit :

$$\text{Chlorophylle a: Ca } (\mu\text{g/ml}) = 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{645.8}$$

$$\text{Chlorophylle b : Cb } (\mu\text{g/ml}) = 12.25 A_{645.8} - 2.79 A_{663.2}$$

$$\text{Caroténoïdes : C (x+c) } (\mu\text{g/ml}) = (1000 A_{470} - 1.82 \text{ Ca} - 85.02 \text{ Cb})/198$$

5. Les marqueurs du stress oxydatif

5.1 Dosage de malondialdéhyde

➤ Principe

Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à 532 nm (Yagi, 1976).

➤ Mode opératoire

La peroxydation des lipides est estimée par l'évolution de la teneur en malondialdéhyde (MDA) déterminée selon la méthode décrite par Heath and Packer (1968). Elle consiste en une homogénéisation du tissu végétal (100 mg) dans 5 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 0,1 %, suivie d'une centrifugation à 12000×g pendant 10 min.

Ensuite, 4 ml de TCA à 20% contenant 0,5% (p / v) du TBA est ajouté à 1 ml de surnageant, Le mélange est chauffé dans un bain-marie à 95°C pendant 30 min, puis refroidi dans un bain de glace afin d'arrêter la réaction. Après une centrifugation à 10 000×g pendant 15 min, le surnageant est récupéré, et l'absorbance se fait à deux longueurs d'ondes : 532 nm et 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre JENWAY 6715 UV/Vis. La concentration de MDA est calculée en utilisant son coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et suivant cette formule :

$$C \text{ (nmol MDA/ g MF)} = [(A_{532} - A_{600}) * V] / 155 * 1000$$

5.2 Dosage du peroxyde d'hydrogène

➤ Mode opératoire

La teneur en H_2O_2 a été déterminée par spectrophotométrie d'après la méthode de Velikova et *al.* (2000). Des feuilles fraîches (100 mg) sont homogénéisées dans 5 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 0,1%, l'extrait est ensuite centrifugé à 12000×g pendant 15 minutes. Un volume de 0,5 ml de surnageant est ajouté à un mélange réactionnel contenant 0,5 ml de tampon phosphate de potassium 10 mM (pH 7) et 1 ml de KI (1M). L'absorption est lue à 390 nm en utilisant un spectrophotomètre JENWAY 6715 UV/Vis.

La concentration de H_2O_2 est calculée en utilisant son coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 0,28 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, et les valeurs sont exprimées en nanomoles par gramme de matière fraîche.

6. Mesure de l'activité antioxydante

6.1 Evaluation de l'activité anti radicalaire DPPH

➤ Principe

La molécule de DPPH (2,2-diphinol-1-picrylhydrazyl) est définie comme un radical libre stable qui réagit avec des groupements amine, les phénols et les acides. Quand la solution de DPPH est mélangée à celle d'une substance qui peut donner un atome d'hydrogène ou un électron, alors ceci provoque la forme réduite (DPPH_2) avec la perte de la couleur violette et l'apparition d'une couleur jaune pâle due à la présence de groupement picryl et l'absorbance est lue à 517 nm.

➤ Mode opératoire

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la méthode décrite par Tadolini et *al.* (2000).

L'extrait est mélangé avec une solution de DPPH (20 mg/l dans le méthanol) suivi d'une homogénéisation. Après 5 min d'incubation à l'obscurité, et à la température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Rayleigh VIS -7220G UV/VIS. Le pourcentage de réduction du DPPH est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Activité scavenger du DPPH (\%)} = (1 - (A_{\text{échantillon}} - A_{\text{blanc}})) \times 100$$

6.2 Réduction du fer par la méthode FRAP

➤ Principe

Cette méthode est utilisée pour évaluer la puissance réductrice des antioxydants des extraits via la réduction du fer ferrique (Fe^{+3}) en fer ferreux (Fe^{+2}). Le test FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power) est basé sur la réduction d'un complexe ferrique tri-pyridyl-triazine ferrique (TPTZ- Fe^{3+}) en sa forme ferreux (TPTZ- Fe^{2+}) par un antioxydant à faible pH. La solution de TPTZ a une couleur bleue intense dont le maximum d'absorbance est de 593 nm.

➤ Mode opératoire

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par Benzie et *al.* (1996). 100 μL de surnageant sont ajoutés à 3ml de réactif de FRAP (75 ml tampon acétate de sodium 300 mM et 7,5 ml de TPTZ 10mM, 10 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20mM), L'absorbance est lue à 593 nm contre le blanc (éthanol) en utilisant un spectrophotomètre Rayleigh VIS -7220G UV/VIS.

7. Détermination de l'activité antioxydante non enzymatique

7.1 Dosage de la proline

➤ Principe

La ninhydrine ou hydrate de tricéto-hydrindène réagit avec les acides aminés en donnant un chromophore acides aminés-ninhydrine. Cependant pour la proline la fonction imine fournit une teinte rouge rosé qui présente un maximum d'absorption à 520 nm.

Le chromophore proline-ninhydrine est préalablement extrait par du toluène. La quantité de proline présente est conforme à la loi de Beer-Lambert.

➤ Mode opératoire

La méthode utilisée est celle de Bates et *al.* (1973). Environ 0,5 g de feuilles a été homogénéisé dans 10 ml d'acide sulfosalicylique aqueux à 3 %, l'ensemble est centrifugé à 9000xg pendant 15 min et à température ambiante. Après filtration, 1 ml d'acide acétique glacial et 1 ml de réactif à la ninhydrine (1,25g de ninhydrine + 30ml acide acétique glacial + 20ml H₃PO₄ (6M)), sont ajoutés à 1 ml du surnageant. Après agitation du mélange au vortex, l'échantillon est incubé à 100°C. Après refroidissement des tubes, 2 ml de toluène sont ajoutés. Le mélange est agité au vortex pendant 15 à 20 secs. Deux phases apparaissent ; la phase organique supérieure (toluène) renferme la proline.

La teneur en proline est déterminée par spectrophotométrie. La densité optique est mesurée à $\lambda = 515$ nm. La concentration de proline a été déterminée à partir d'une courbe standard et calculée sur la base du poids frais comme suit :

$$(\mu\text{g proline/ml} \times \text{ml de toluène}) / 115,5 \mu\text{g}/\mu\text{mole} / [(\text{échantillon g}) / 5] = \text{moles proline/g de produit frais.}$$

7.2 Dosage de la vitamine C (acide ascorbique)

➤ Principe

Dans les feuilles, l'ascorbate a été mesuré à une concentration plus élevée que la chlorophylle. Au pH physiologique, l'anion ascorbate (AA) est la forme prédominante. L'anion perd un électron de son groupe ène-diol pour former le radical mono-déshydro-ascorbate (MDHA). La poursuite de l'oxydation du MDHA forme le déshydro-ascorbate à molécule non chargée (DHA). Cette réaction d'oxydation de base explique le rôle biologique important de l'ascorbate en tant que métabolite antioxydant.

➤ Mode opératoire

Le protocole d'extraction a été réalisé selon la méthode de Gillespie et *al.* (2007), par broyage de 40 mg de feuilles dans 2 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 5 %, puis centrifugation à 12 000xg pendant 15 min à 4 °C.

L'ascorbate a été déterminé dans un mélange réactionnel de 2ml contenant : 400µl de tampon phosphate de potassium 0,2 M (pH 7,4), 500 µL d'acide trichloracétique (TCA) à 10 %, 400 µL d'acide phosphorique H₃PO₄ à 42 %, 400 µl 2,2-dipyridyl à 4 %, et 200 µl de

chlorure de fer (III) FeCl_3 . Après agitation et incubation pendant 20 min à 42°C, l'absorbance a été mesurée à 525 nm.

8. Etude statistique

Les données obtenues ont été analysées statistiquement par le logiciel SPSS (version 24.0). Elle comprend une analyse de variance ANOVA et test Tukey. Une différence significative est jugé à $p < 0.05$. Les données ont été représentées sous forme de moyenne \pm écart-type.

Résultats et discussion

1. Dosage des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont d'importants constituants végétaux dotés de propriétés redox responsables de l'activité antioxydante. Les groupes hydroxyles des extraits de plantes facilitent le piégeage des radicaux libres. Ces extraits préparés ont été analysés quantitativement par la spectrophotométrie UV-visible, pour leurs contenus en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

1.1 Polyphénols totaux

L'estimation des teneurs en polyphénols totaux a été effectuée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus ont été déterminés en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique ($y = 0.0014x - 0.0332$, $R^2 = 0,9889$) et exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière fraîche (mg EAG/g MF).

Les résultats des taux de polyphénols (Figure 19) montrent un effet non significatif ($P=0,164$) des différentes doses de NPK. On distingue une augmentation de la teneur en polyphénols totaux pour le traitement T1 (5.85 ± 2.13 mg EAG/g MF) suivi par le traitement T0 (4.33 ± 0.71 mg EAG/g MF) et T2 (4.23 ± 0.90 mg EAG/g MF).

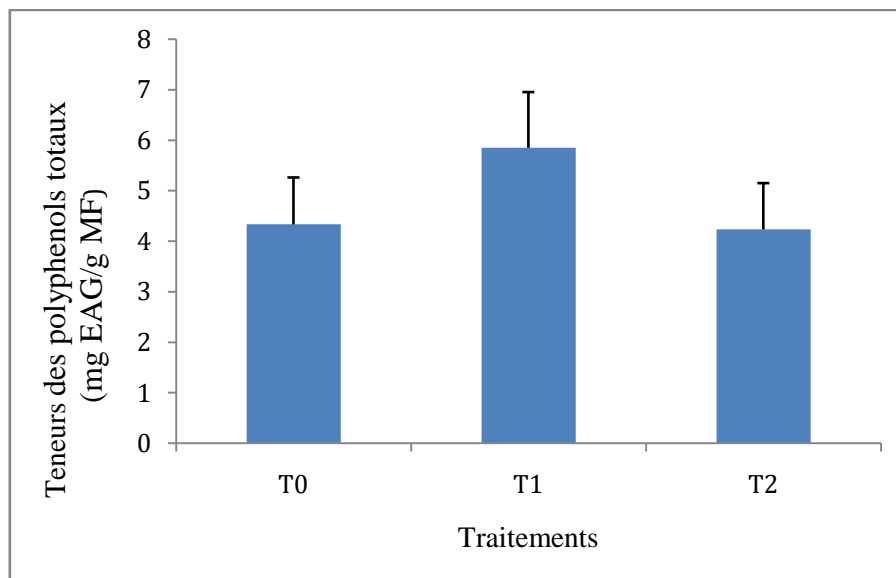


Figure 19 : Effet des différentes doses du NPK sur la teneur des polyphénols totaux.

1.2 Flavonoïdes

L'estimation des teneurs en flavonoïdes a été effectuée en utilisant la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3). Les résultats obtenus ont été déterminés par l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de la quercétine ($y = 0,034 x + 0,002$) et exprimés en μg équivalent quercétine par gramme de matière fraîche ($\mu\text{g EQ/g MF}$).

Les résultats obtenus des flavonoïdes (Figure 20) montrent un effet non significatif ($P=0.205$) entre les différents traitements NPK. Néanmoins, on remarque une augmentation de la teneur en flavonoïdes pour le traitement T1 ($91.91 \pm 15.63 \mu\text{g EQ/g MF}$) suivi par le traitement T0 ($69.11 \pm 11.39 \mu\text{g EQ/g MF}$) et T2 ($64.70 \pm 31.21 \mu\text{g EQ/g MF}$).

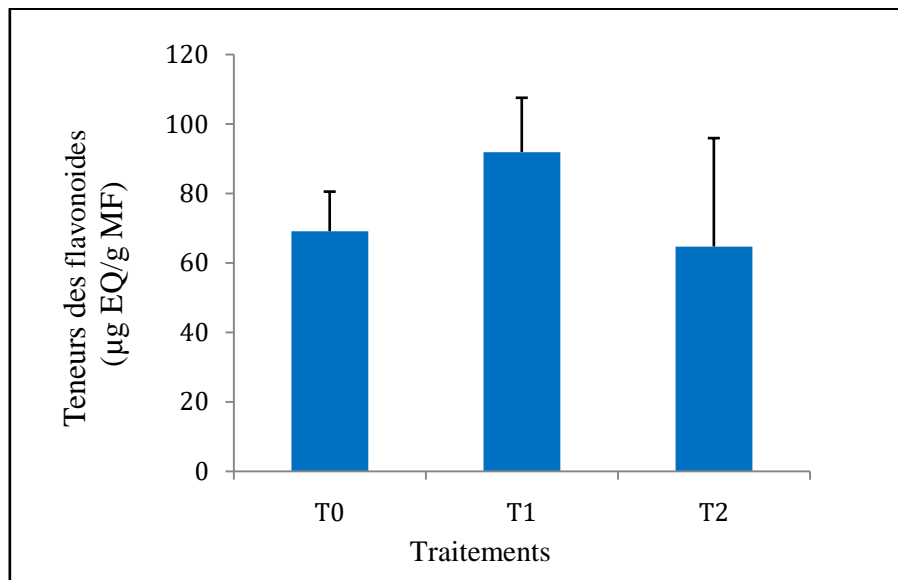


Figure 20 : Effets des différentes doses du NPK sur la teneur des flavonoïdes.

2. Les marqueurs de stress oxydatif

2.1 Effet du NPK sur le niveau du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 21. Une accumulation significative du peroxyde d'hydrogène a été observée entre les traitements T1/T2 ($P < 0.05$) et T0/T2 ($P < 0.017$). Le traitement T2 a donné la valeur la plus élevée ($1.721 \pm 0.302 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 / \text{g MF}$) suivie par T1 ($1.303 \pm 0.337 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 / \text{g MF}$) et T0 ($1.166 \pm 0.207 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 / \text{g MF}$). Ces taux augmentent d'une manière dose-dépendante. Une accumulation du H_2O_2 peut être responsable du stress oxydatif. Ceci est dû à la décomposition rapide de H_2O_2 et la génération subséquente du radical hydroxyle (HO^\cdot) qui initie la peroxydation des lipides et la détérioration des composants cellulaires.

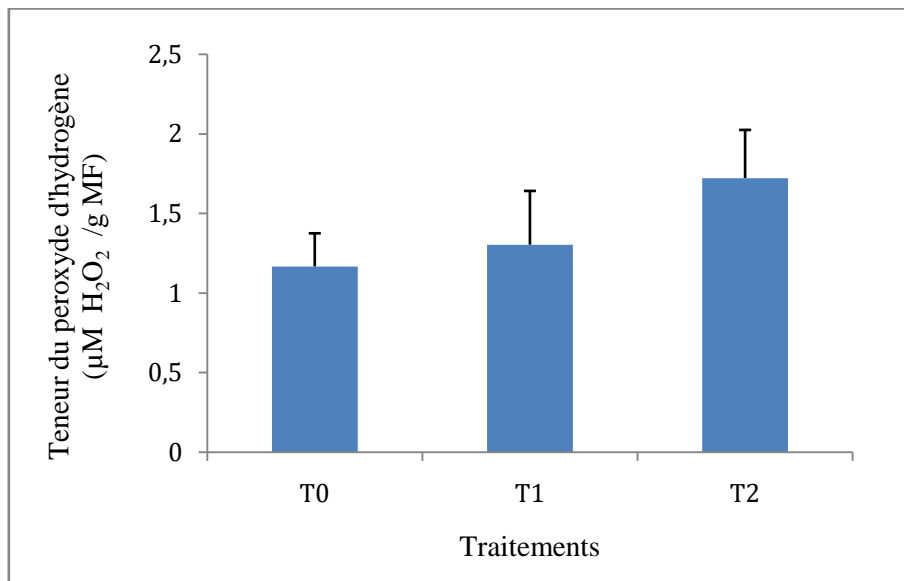


Figure 21 : L'effet du NPK sur l'accumulation du peroxyde d'hydrogène dans les feuilles de la tomate.

2.2 Effet du NPK sur la teneur du malondialdéhyde (MDA)

La mesure de la teneur en MDA en tant que paramètre du stress oxydatif a montré que les différentes doses du NPK ont induit un effet non significatif ($P=0.257$) sur la teneur en MDA chez la tomate (Figure22). La teneur la plus élevée a été obtenue en T2 ensuite T1 et finalement T0 ($0.112\pm 0.027\mu\text{M/g MF}$, $0.110\pm 0.0116\mu\text{M/g MF}$ et $0.098\pm 0.011\mu\text{M/g MF}$, respectivement).

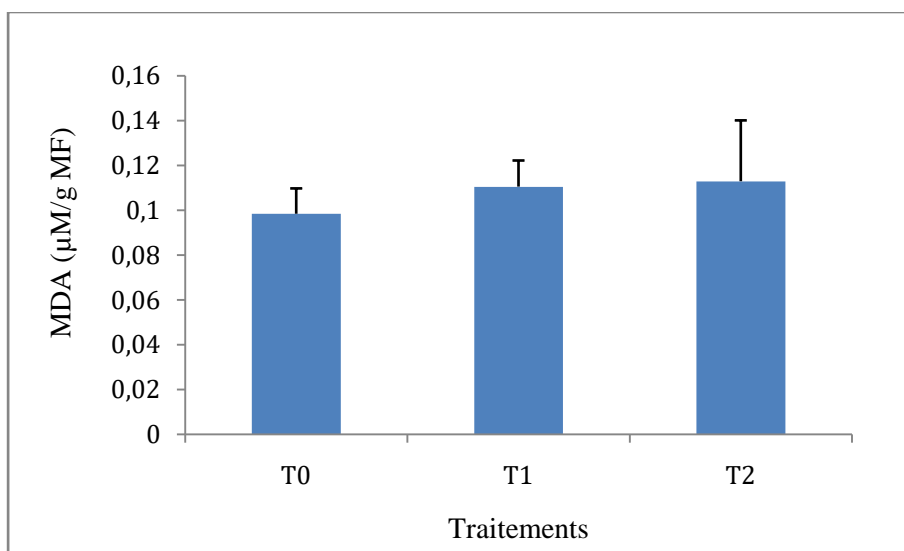


Figure 22 : Effet du NPK sur la teneur en malondialdéhyde (MDA).

3. Estimation des pigments

3.1 Quantification de la teneur en chlorophylles et caroténoïdes

La teneur en chlorophylles est souvent utilisée pour évaluer l'impact de nombreux stress environnemental. L'application de l'engrais chimique NPK entraine un effet non significatif sur les teneurs des pigments photosynthétiques « la chlorophylle a, b, totale et caroténoïdes ». Cet effet analysé au niveau des feuilles est représenté dans la figure 23.

Nos analyses comparatives ont montré qu'il n'existe pas de différence significative au niveau de la chlorophylle a ($P=0.109$), néanmoins nous constatons qu'un taux plus élevé a été enregistré pour le traitement T0 ($171.5 \pm 31.4 \mu\text{g/g MF}$) suivie par T1 ($159.1 \pm 31.2 \mu\text{g/g MF}$) et en tout dernier T2 ($137.1 \pm 17.1 \mu\text{g/g MF}$).

Au niveau de la chlorophylle b, nous avons enregistré une différence significative observée entre les doses T1/T2 ($P<0.007$). Le traitement T1 a donné la valeur la plus élevée ($142.9 \pm 40.2 \mu\text{g/g MF}$) suivie par T0 ($111.3 \pm 25.1 \mu\text{g/g MF}$) et T2 ($88.5 \pm 9.55 \mu\text{g/g MF}$).

Concernant les teneurs moyennes en chlorophylle totale, nous avons enregistré une différence significative entre les doses T1/T2 ($P<0,025$). La valeur la plus élevée a été aperçue lors de l'application du traitement T1 ($309.7 \pm 69.3 \mu\text{g/g MF}$) puis T0 ($282.3 \pm 53. \mu\text{g/g MF}$) et finalement T2 ($225.2 \pm 24.9 \mu\text{g/g MF}$).

Dans le cas des caroténoïdes, aucune différence significative n'a été enregistrée. Le traitement T0 détient la teneur en caroténoïde la plus élevée suivie par T2 et T1.

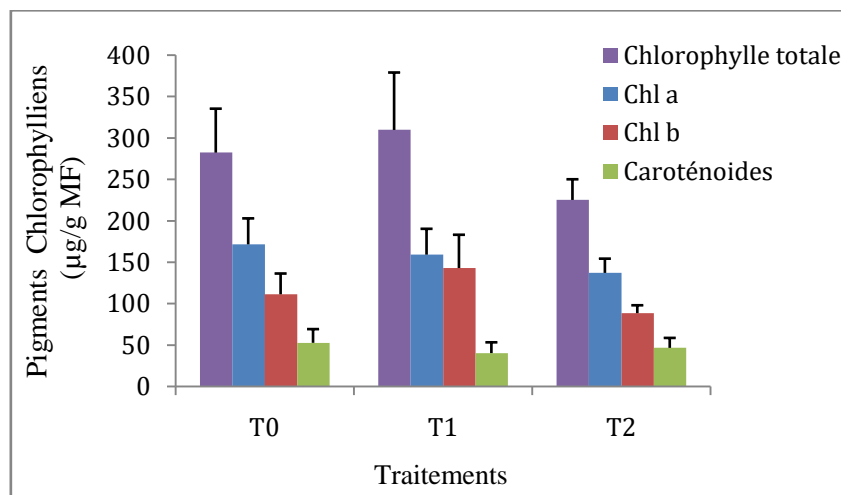


Figure 23 : Variations des teneurs en chlorophylles (a, b et totale) et caroténoïdes dans les feuilles sous l'effet de différents apports de NPK.

4. Effet du NPK sur l'activité anti radicalaire DPPH

Le radical DPPH• est généralement l'un des composés les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'effet scavenger du radical DPPH en fonction des différentes doses de l'engrais NPK ajouté.

Les variations du pourcentage de l'effet scavenger du radical DPPH en présence des différents traitements NPK sur la tomate montrent un effet non significatif ($P=0,099$) (Figure 24). L'analyse des résultats obtenus, nous permet de constater que la différence de l'effet scavenger du radical DPPH en pourcentage dépend de la dose du traitement appliqué. En effet, nous notons une augmentation de 6,4% de l'effet scavenger pour le traitement T1 ($18,68 \pm 4,53\%$) par rapport au traitement T0 ($12,28 \pm 5,69\%$). Alors qu'une baisse est observée à partir du traitement T2 ($12,50 \pm 7,20\%$), néanmoins elle reste légèrement supérieure à celle observée chez les feuilles soumises au traitement T0.

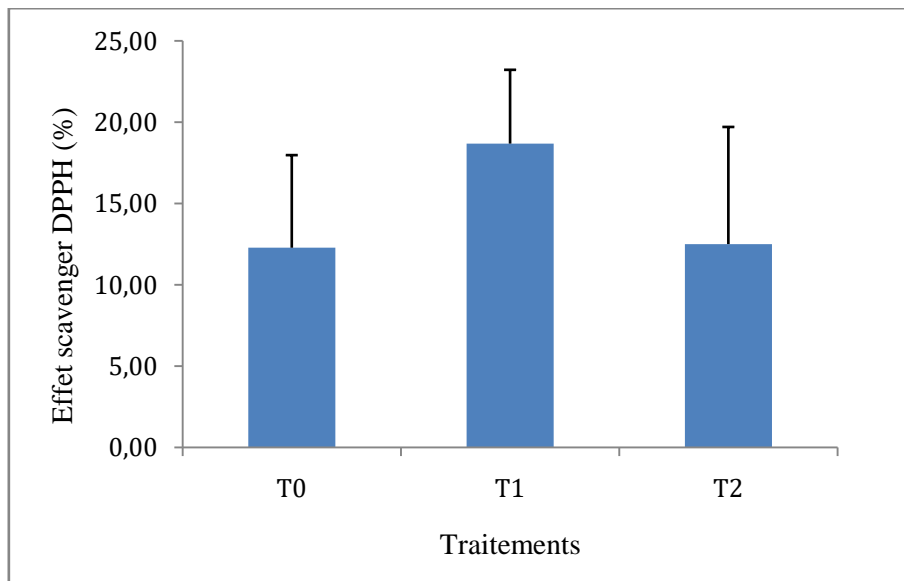


Figure 24 : Evaluation de l'effet scavenger du radical DPPH en fonction des différentes doses de l'engrais NPK.

5. Effet du NPK sur l'activité FRAP

C'est une méthode de mesure de la puissance antioxydante de nos extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). C'est une technique rapide, facile et reproductible. Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir anti-radicalaire.

Les résultats obtenus ont été déterminés en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée par sulfate de fer(II) ($Y=0,0006X+0,0231$), et l'activité

FRAP a été calculée en μM équivalent Fe(II) . L'effet des différents traitements NPK sur l'activité FRAP montre un effet non significatif ($p=0,838$) (Figure 25). Les résultats de l'évaluation de la capacité de réduction ferrique montre que les extraits indiquent des valeurs proches et ceci pour les trois traitements appliqués : T0 ($41,71\pm 20,27\mu\text{M}$ d'équivalent Fe(II)), T1 ($46,87\pm 12,56\mu\text{M}$ équivalent Fe(II)), T2 ($45,25\pm 17,64\mu\text{M}$ équivalent Fe(II)), mais la valeur FRAP la plus élevée a été obtenue en T1.

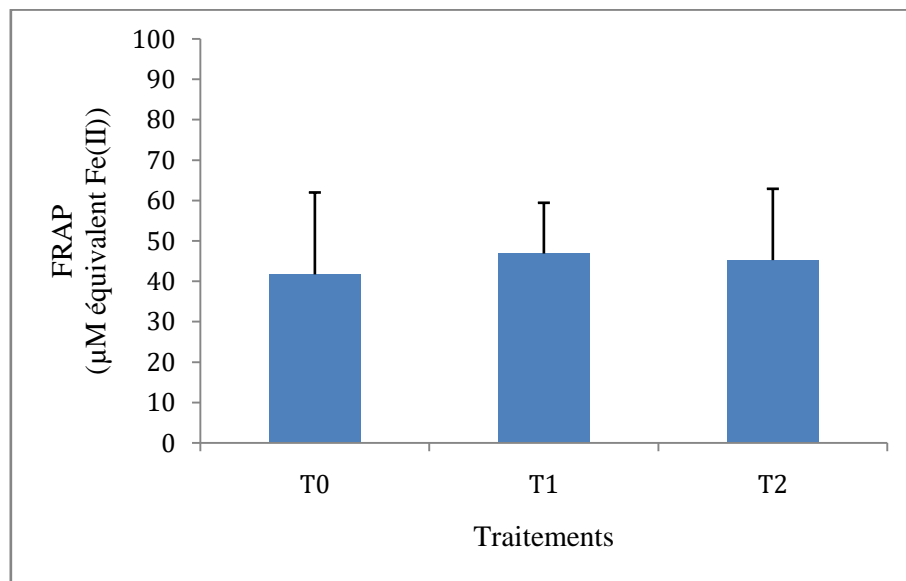


Figure 25 : L'effet des différentes doses de NPK sur l'activité FRAP.

6. Impact de l'engrais NPK sur la teneur en proline

La proline a un rôle dans le renforcement du système antioxydant et de lutte contre les dommages du stress. Elle peut avoir aussi un rôle dans la détoxification des ROS. L'accumulation de la proline constitue aussi un véritable mécanisme de tolérance au stress.

La figure 26 illustre les effets des différents traitements NPK sur les teneurs en proline, qui montre une différence significative du facteur traitement sur le paramètre utilisé ($p=0,002$). Une différence significative en proline a été enregistrée entre les traitements T0/T1 ($P<0,002$) et T0/T2 ($P<0,018$). On remarque que la teneur la plus élevée en proline a été enregistrée suite à l'application du traitement T1 ($6,65\pm 1,19$ moles proline/g MF). Le traitement T2 a provoqué également une teneur élevée en proline ($5,49\pm 0,64$ moles proline/g MF) par rapport au traitement T0 ($3,69\pm 0,74$ moles proline/g MF), mais ceux-ci restent toujours inférieurs à T1.

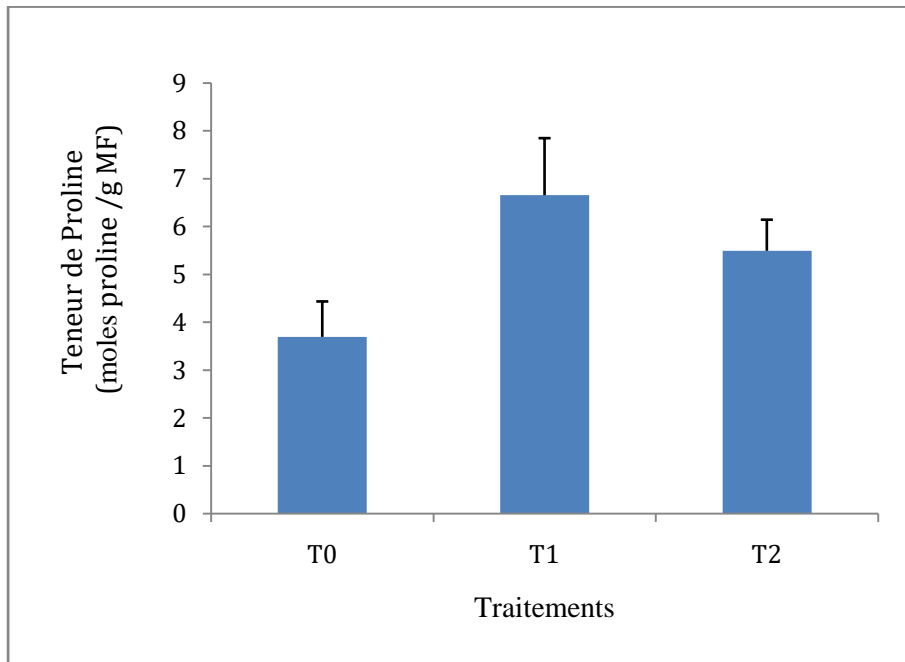


Figure 26 : Effet des différentes doses de NPK sur la teneur en proline.

7. L'effet du NPK sur la teneur en ascorbate

L'ascorbate est un antioxydant puissant des plantes qui nécessite un recyclage rapide et efficace des formes oxydées (mono-déshydroascorbate et déhydroascorbate). La figure 27 met en évidence les variations de la teneur en acide ascorbique chez la tomate en présence de différentes doses de l'engrais NPK. Nos résultats montrent un effet non significatif sur la teneur en ascorbate ($P=0,824$). Nous avons observé que les plantes de tomate soumises aux traitements T0 et T1 présentent des teneurs élevés très proches en acide ascorbique ($T0=16,05\pm 2,42 \mu\text{mol /g MF}$; $T1=16,08\pm 1,78 \mu\text{mol /g MF}$, respectivement), au moment où le traitement T2 a enregistré une valeur inférieure à ceux-ci ($15,25\pm 1,71 \mu\text{mol /g MF}$).

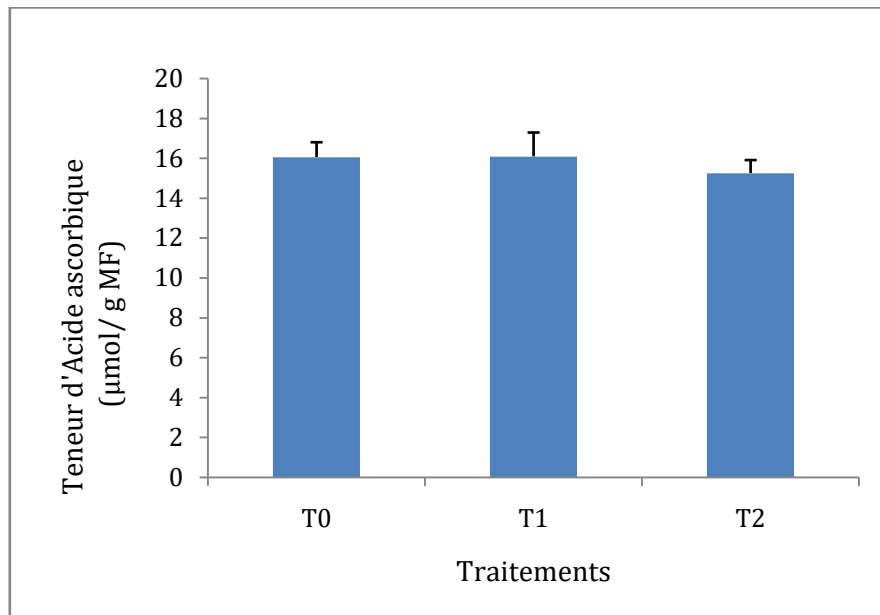


Figure 27 : L'effet de l'engrais NPK sur la teneur en acide ascorbique.

8. Discussion

8.1 Effet des différents traitements NPK sur la teneur en composés phénoliques

Les composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes) obtenus avec le traitement T1 (20 kg NPK/ha) étaient les plus élevés ainsi que l'activité antioxydante des composants phénoliques antioxydants. Une augmentation de la dose de NPK au cours du traitement T2 (25 kg NPK/ha) a entraîné une sur-fertilisation et, par conséquent, une diminution de l'activité antioxydante et des composants phénoliques antioxydants.

L'étude menée par Juan et *al.* (2008) sur les effets de l'azote (N) et du soufre (S) sur les composés phénoliques totaux et l'activité antioxydante des feuilles de moutarde montrent que l'augmentation de l'apport en N diminuait considérablement les concentrations phénoliques totales. Nos résultats concordent aussi avec ceux d'Oloyede (2012) où la dose moyenne donnée à des feuilles de citrouille a démontré la plus grande activité antioxydante. Skwarylo-Bednarz and Krzepilko (2009) ont rapporté que l'utilisation d'engrais minéraux, en particulier l'azote, augmente la teneur en vitamine C qui est un indicateur fréquemment utilisé des propriétés antioxydantes des fruits et légumes.

8.2 Effet des différents traitements NPK sur la teneur du malondialdéhyde (MDA) et en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Nos résultats ont indiqué une augmentation de la teneur en MDA et H₂O₂ biomarqueurs du stress oxydatif. Debona (2012) a démontré que l'augmentation de la concentration en O²⁻ et H₂O₂ dans le blé infecté correspond à la plus forte concentration de MDA. L'ampleur des dommages cellulaires causés par le stress oxydatif lié à la réponse de la plante à l'infection pathogène peut être estimée à partir des produits de la peroxydation lipidique. Ces résultats concordent avec nos recherches, à savoir que les niveaux de peroxydation des lipides augmentent avec des doses plus élevées d'engrais NPK.

8.3 Effet des différents traitements NPK sur les teneurs en chlorophylles et caroténoïdes

Nos résultats ont mis en évidence une augmentation de la teneur moyenne en chlorophylle a, b et par conséquent a+b ainsi que les caroténoïdes pour la dose agricole utilisée et en même temps recommandée en Algérie (T1 : 20Kg/ha). Ces résultats concordent avec les travaux de Zhang *et al.* (1997) qui ont démontré que la fertilisation azotée stimule la synthèse de la chlorophylle mais non la photosynthèse. La chlorophylle étant une substance azotée, sa synthèse à l'intérieur des cellules végétales est stimulée par un apport d'azote, ce qui entraîne la pigmentation verte des végétaux (Soltner, 2003). Cependant, un apport très riche ou très pauvre entraîne une réduction de cette dernière, ce qui était le cas des deux traitements T0 (15 Kg/ha) et T2 (20 Kg/ha).

8.4 Effet des différents traitements NPK sur l'activité anti radicalaire DPPH et la réduction du fer par la méthode FRAP

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Il existe plusieurs méthodes pour évaluer l'activité antioxydante par piégeage des radicaux libres. Pour la méthode DPPH, l'évaluation de l'activité antioxydante a montré que l'effet scavenger du radical DPPH le plus élevé a été enregistré après application du traitement T1 (20 kg NPK/ha). Dans le cas du traitement T2 (25kg/ha), une sur-fertilisation a entraîné une diminution assez importante de l'effet scavenger. Cette augmentation pourrait s'expliquer par la capacité des antioxydants existants dans les extraits à convertir le DPPH (1,1-Diphényle-2-

picrylhydrazyl de couleur violette) en sa forme réduite (diphényle picryl-hydrazine : de couleur jaune).

Dans la méthode FRAP, nous avons remarqué une augmentation de la réduction du fer après l'application du traitement T1 (20 kg NPK/ha), comme nous avons également remarqué une diminution de ce paramètre lorsque les plantes de tomate ont reçu une dose de 25kg/ha de l'engrais chimique NPK (T2). Cette augmentation indique la présence des réducteurs dans nos extraits qui ont provoqué la réduction du fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . En d'autres termes, le système $FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semi-quantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction redox (Amarowicz et *al.*, 2004). Certains auteurs comme Siddhuraju and Becker (2007) ont démontré que le pouvoir réducteur est probablement dû à la présence du groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants. Le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Kumaran and Karunakaran, 2007).

8.5 Effet des différents traitements NPK sur la teneur en proline

Dans ce travail, nous avons également étudié la teneur en proline en présence de différentes doses d'engrais chimique NPK. Par conséquent, nous avons mis en exergue une forte croissance de ce paramètre, qui est connu comme un biomarqueur de stress dans le traitement T1 (20 Kg /ha), couramment utilisé comme dose agricole en Algérie.

Selon Singh et *al.* (2006), ces quantités accumulées pourraient être liées au niveau de tolérance au stress. Cette accumulation n'est qu'un signe de perturbation. D'autres résultats indiquent que la proline peut également intervenir dans la régulation du pH cytoplasmique, ou autant que réserve de carbone et d'azote que les plantes utiliseront après une période de stress (Verslues and Sharma, 2010).

8.6 Effet des différents traitements NPK sur la teneur de l'ascorbate

À une dose de 20 kg NPK/ha (T1), nous avons remarqué que la teneur en acide ascorbique était la plus élevée, suivi d'une diminution due à une fertilisation excessive (T2). Notre travail est en parfait accord avec les travaux de Dumas et *al.* (2003) qui ont montré que les taux élevés d'engrais azotés ont tendance à diminuer la teneur en vitamine C de la tomate.

Une forte accumulation de l'acide ascorbique dans nos extraits confirme les résultats de Horemans et *al.* (2000) indiquant que la concentration en ascorbate est très élevée dans les cellules végétales (plusieurs milli molaires), ce qui le rend comme composant incontournable chez les plantes.

L'ascorbate est connu pour ses propriétés antioxydantes. En fait, il réagit rapidement avec l'anion superoxyde et l'oxygène singulet ou avec le peroxyde d'hydrogène, mais cette dernière réaction est catalysée par l'ascorbate peroxydase (APX). D'un autre côté, l'acide ascorbique est essentiel pour réduire la capacité d'autres antioxydants oxydés tels que la vitamine E ou les caroténoïdes.

Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons observé un effet bénéfique d'une diminution modérée : T1 (20 Kg/ha) de l'apport en engrais fertilisant (NPK). Ce dernier a montré le meilleur contenu en polyphénols, mais une augmentation excessive du NPK dans le cas du traitement T2 (25 Kg/ha) induit une élévation des biomarqueurs du stress oxydatif, et par conséquent une diminution de l'activité antioxydante et des composants antioxydants phénoliques. On peut conclure que le traitement T1 est probablement la dose la plus appropriée et la plus adéquate sur le plan agronomique et économique.

Un autre aspect important mis en évidence par ce travail est que les plantes réagissent différemment aux différentes quantités d'engrais appliquées. Afin d'obtenir un rendement maximal, il est évidemment essentiel d'appliquer la dose appropriée, en particulier lorsque les plantes ne présentent aucun symptôme de carence.

Références bibliographiques

Abid Anna, Amarouche Amal, (2016). Nanotoxicité de Fe₃O₄ (NPs) sur les paramètres du stress oxydatif d'un modèle cellulaire alternatif *Paramecium* sp. Mémoire de Master. Université de Tébessa.

Afzal, S.A.I.M.A., Tariq, S., Sultana, V., Ara, J., Ehteshamul-Haque, S. (2013). Managing the root diseases of okra with endo-root plant growth promoting *Pseudomonas* and *Trichoderma viride* associated with healthy okra roots. *Pakistan Journal of Botany*, 45(4): 1455–1460. <http://www.academia.edu/36440524>.

Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G. (2001). Nitric Oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357(3), 593–615. doi : 10.1042/bj3570593.

Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84(4), 551–562. doi:10.1016/s0308-8146(03)00278-4.

Augusto, O., Bonini, M.G., Amanso, A.M., Linares, E., Santos, C.C. De Menezes, S.L., (2002). Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radical Biology and Medicine*. 32(9), 841-859. doi : 10.1016/s0891-5849(02)00786-4.

Bally, R., & Elmerich, C. (2007). Biocontrol of Plant Diseases by Associative and Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria. *Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress*, 171–190. doi:10.1007/1-4020-3546-2_8.

Barea, IM., Pozo, M. J., Azcon, R., et Azcon-Aguilar, C. (2005). Microbial cooperation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 56 (417): 17611778.

Bartosz, G. (2003). Generation of Reactive Oxygen Species in Biological Systems. *Comments on Toxicology*, 9(1), 5–21. doi : 10.1080/08865140302420.

Bashan, Y., Holguin, G., & de-Bashan, L. E. (2004). Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50(8), 521–577. doi:10.1139/w04-035.

Bashan, Y., De-Bashan, L.E. (2005). Plant growth-promoting. In D. Hillel (dir.), *Encyclopedia of Soils in the Environment* (vol 1, p. 103-115). Elsevier, Oxford, U.K.

Bashan, Y, Puente, M. E., de Bashan, L.E., Hemandez, J.P. (2008). Environmental use of plant growth-promoting bacteria. In A.E. Barka et C.Clément. Plant-Microbe interactions (p. 69-93).

Bashan, Y., Holguin, G. (1998). Proposai for the divison of plant growth promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGP B (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*30:1225-1228.

Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205–207. Doi: 10.1007/bf00018060.

Ben Rejeb, K., Abdelly, C., Savouré, A. (2012). La proline, un acide aminé multifonctionnel impliqué dans l’adaptation des plantes aux contraintes environnementales. *Biologie Aujourd’hui*, 206(4), 291–299. doi:10.1051/jbio/2012030.

Bhardwaj, D., Ansari, M., 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(1), 66. doi:10.1186/1475-2859-13-66.

Benhamdi A., 2014. Etude des enzymes de stress oxydatif chez *Hedysarum pallidum* Desf. Et *Lygeum spartum* L. en réponse à la pollution du sol par l’antimoine. Thèse de doctorat, Université de Constantine 1, 146p.

Benhamou, N., Kloepper, J. W., Tuzun, S. (1998). Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta*, 204(2), 153–168. doi:10.1007/s004250050242.

Benmati M. (2014). PGPR, paranodules, stimulation de la croissance et tolérance au déficit hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) : Aspects moléculaires et génétiques, thèse de doctorat , université des science de la nature et de la vie.

Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. doi:10.1006/abio.1996.0292.

Brannan, R. G., (2010). Reactive Sulfur Species Act as Prooxidants in Liposomal and Skeletal Muscle Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6). doi: 10.1021/jf903587n.

Cassán, F., Maiale, S., Masciarelli, O., Vidal, A., Luna, V., Ruiz, O. (2009). Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 12–19. doi:10.1016/j.ejsobi.2008.08.003.

Charest, M.H., Beauchamp, C J, Antoun, H. (2005). Effects of the humic substances of de-inking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum*. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(2), 219–227. doi:10.1016/j.femsec.2004.11.017.

CheaiB, A. (2006). Effets de la limitation croisée en phosphore et en lumière sur la croissance et la morphogénèse aérienne et racinaire de jeunes plants de pin maritime. Thèse de Doctorat. Spécialité : Biogéochimie de l'Environnement, Université Bordeaux 1. 177p.

Clarkson, P. M., Thompson, H. S. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *The American Journal of Clinical Nutrition* 72(2), 637S–646S. doi:10.1093/ajcn/72.2.637s.

Coïc, Y., Coppenet, M. (1989). Les oligo-éléments en agriculture et élevage. Incidences sur la nutrition humaine. Paris, FRA : INRA Editions, 114 p.

Debona, D., Rodrigues, F. Á., Rios, J. A., & Nascimento, K. J. T., (2012). Biochemical Changes in the Leaves of Wheat Plants Infected by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, 102(12), 1121–1129. doi:10.1094/phyto-06-12-0125-r.

De Freitas, J. R., & Germida, J. J. (1992). Growth promotion of winter wheat by fluorescent pseudomonads under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(11), 1127–1135. doi:10.1016/0038-0717(92)90063-4.

Defraigne JO, Pincemail J.(2008). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Rev Med Liège*, 63 : 10-11.

Delattre J, Théron P, Bonnefont-Rousselot D. (2005). Espèces réactives de l'oxygène, antioxydants et vieillissement. In : Delattre JB, Bonnefont-Rousselot D, eds. Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques. Paris : Lavoisier : 281-309.

Dey, R., Pal, K. K., Bhatt, D. M., & Chauhan, S. M. (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 159(4), 371–394. doi:10.1016/j.micres.2004.08.004.

Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G., & Grolier, P. (2003). Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(5), 369–382. doi:10.1002/jsfa.1370.

FAO (2005). Utilisation des engrais par culture en Algérie. Première édition, publiée par la FAO, Rome. Disponible sur : <http://www.fao.org/3/a-y5953f.pdf>.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

Favier, A., (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64(6), 390–396. doi:10.1016/s0003-4509(06)75334-2.

Forstermann, U. (2006). Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: From Marvel to Menace. *Circulation*, 113(13), 1708–1714. doi:10.1161/circulationaha.105.602532.

Foyer, C. H., Lelandais, M., Kunert, K. J. (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 92(4), 696–717. doi:10.1111/j.1399-3054.1994.tb03042.x.

Fruntillo, L., Skelly, M. J., Loake, G. J., Spoel, S. H., Salgado, I. (2014). S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nature Communications*, 5(1). doi:10.1038/ncomms6401.

Ganther, H. E. (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*, 20(9), 1657–1666. doi:10.1093/carcin/20.9.1657.

Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapy* 3, 162–169. doi:10.1007/s10298-005-0096-8.

Gherairia Ibtissem, Zardoudi Fadia (2018). Effet de la fertilisation sur la culture de blé dur (*Triticum durum Desf.*) dans la région de Guelma. Mémoire master 2. Université de Guelma, 84p.

Gholami, A., Shamsavani, S., Nezarat, S. (2009). The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *International Journal of Biological and Life Sciences*.5: 35-40.

Gill Sarvajeet Singh, Tuteja Narendra (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(12), 909-930. doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016.

Gillespie, K. M., Chae, J. M., Ainsworth, E. A. (2007). Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants. *Nature Protocols*, 2(4), 867–870. doi:10.1038/nprot.2007.100.

Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(2), 109–117. Doi: 10.1139/m95-015.

Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Toulmin, C. (2010). Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*, 327(5967), 812–818. doi:10.1126/science.1185383.

Gould, K. S., Lamotte, O., Klinguer, A., Pugin, A., Wendehenne, D.(2003). Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant, Cell and Environment*, 26(11), 1851–1862. doi:10.1046/j.1365-3040.2003.01101.x.

Gruhlke, M. C. H., and Slusarenko, A. J., (2012). The biology of reactive sulfur species (RSS). *Plant Physiology and Biochemistry*, 59, 98–107. doi:10.1016/j.plaphy.2012.03.016.

Gupta, D. K., Palma, J. M., Corpas, F. J. (Eds.), (2015). *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants under Stress*. Springer International Publishing, Switzerland, 373:57-82.doi:10.1007/978-3-319-20421-5.

Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., et al. (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liège*, 62(10): 628-638.

Heath, R. L., Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189–198. doi: 10.1016/0003-9861(68)90654-1.

Henintsoa M. (2013). Disponibilité et dynamique du carbone, de l'azote et du phosphore sous association culturale Riz-Haricot soumise à différents types de fertilisation phosphatée apportée à dose croissante. Cas de l'expérimentation agronomique de La zaina sur sol ferrallitique de « tanety ». Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'études approfondies. Département des eaux et forêts, Université D'Antananarivo, Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, 71p.

Herman, M. A. B., Nault, B. A., Smart, C. D. (2008). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. *Crop Protection*, 27(6), 996–1002. doi:10.1016/j.cropro.2007.12.004.

Hillel, D.,(2008). 40 Years of Drip Irrigation: Reviewing the past, prospects for the future. *CSA. News*. Vol. 53, No. 9, pp. 3–7.

Hoft, M., Vos, P. (2006). Plant pathogenic *Pseudomonas* species, Plant Association Bacterian, Springer, Pays-Bas. 712p.

Horemans, N., Foyer, C. H., & Asard, H. (2000). Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in Plant Science*, 5(6), 263–267. doi:10.1016/s1360-1385(00)01649-6.

Jacobsen, B. J., Zidack, N. K., Larson, B. J. (2004). The Role of Bacillus-Based Biological Control Agents in Integrated Pest Management Systems: Plant Diseases. *Phytopathology*, 94(11), 1272–1275. doi:10.1094/phyto.2004.94.11.1272.

Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., Barea, J.M. (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soil*. 37: 1-16. DOI 10.1007/s00374-002-0546-5.

Januel C. (2003). Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabete etude du glutathion et de la glutathion peroxydase 4, thèse de doctorat, Université de Lyon I, France.

Juan Li., Zhu, Z., Gerendás, J. (2008). Effects of Nitrogen and Sulfur on Total Phenolics and Antioxidant Activity in Two Genotypes of Leaf Mustard. *Journal of Plant Nutrition*, 31(9), 1642–1655. doi:10.1080/01904160802244860.

Kim, C., Keckés, M. L., Deaker, R. J., Gilchrist, K., New, P. B., Kennedy, I. R., Sa, T. (2005). Wheat root colonization and nitrogenase activity by *Azospirillum* isolates from crop plants in Korea. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(11), 948–956. doi:10.1139/w05-052.

Krieg, N.R., Döbereiner, J. (1984). Genus *Azospirillum*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology* ed. Krieg, N.R.a.J.G.H. 94–104. Baltimore, Md, Williams and Wilkins.

Kühn, H., Borchert, A. (2002). Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(2), 154–172. doi:10.1016/s0891-5849(02)00855-9.

Kumaran, A., & Joel Karunakaran, R. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT - Food Science and Technology*, 40(2), 344–352. doi:10.1016/j.lwt.2005.09.011.

Kumar S., Machiwal D., Dayal D., Mishra A.K. (2017). Enhanced quality fodder production through grass-legume intercropping under arid eco-system of Kachchh, Gujarat. *Legume Research-An International Journal*, (40):896-900. doi:10.18805/lr.v0i0.7596.

Lacolley, P. (2007). *Biologie Et Pathologie Du Coeur Et Des Vaisseaux*. Ed. John Libbey Eurotext, Paris. 677p.

Lerot B. (2006). Les éléments minéraux, disponible sur https://www.doc-developpement-durable.org/file/Fertilisation-des-Terres-et-des-Sols/Chimie-des_sols/ElementsMineraux.pdf. Consulté le 20/04/2020.

Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2001). Extraction of Photosynthetic Tissues: Chlorophylls and Carotenoids. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1(1), F4.2.1–F4.2.6. doi:10.1002/0471142913.faf0402s01.

Long, S. R. (2001). Genes and Signals in the Rhizobium-Legume Symbiosis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 125(1), 69–72. doi:10.1104/pp.125.1.69.

Loper, J. E., Gross, H. (2007). Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research*, 265–278. doi:10.1007/978-1-4020-6776-1_4.

Loussouarn-Yvon M. (2017). L'acide carnosique et le carnosol, deux super-antioxydants du romarin (*Rosmarinus officinalis*) rôles, mécanismes, physiologie et applications. Thèse de Doctorat. Université de l'aix-marseille (France), 180p.

Lyubenova, L., Schröder, P. (2010). Uptake and effect of heavy metals on the plant detoxification cascade in the presence and absence of organic pollutants, in: *Soil Heavy Metals*. Springer, pp. 65-85. doi :10.1007/978-3-642-02436-8_4.

Marschner, P., Yang, C.-H., Lieberei, R., & Crowley, D. . (2001). Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(11), 1437–1445. doi:10.1016/s0038-0717(01)00052-9.

Mauricio, I (2010). Étude de l'encapsulation de rhizobactéries pour la biofertilisation du blé. Thèse de Doctorat. Université de NANTES UFR sciences et techniques. <https://fr.scribd.com/doc/79980683/These-doctorat-Mauricio-Schoebitz>.

Miethling, R., Wieland, G., Backhaus, H., Tebbe, C. C. (2000). Variation of Microbial Rhizosphere Communities in Response to Crop Species, Soil Origin, and Inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microbial Ecology*, 40(1), 43–56. doi:10.1007/s002480000021

Migdal, Camille ; Serres, Mireille, (2001). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant, *Med Sci (Paris)*, Vol. 27, N° 4 ; p. 405-412. doi : 10.1051/medsci/2011274017.

Minorsky, P. V. (2007). On the Inside. *PLANT PHYSIOLOGY*, 146(2), 323–324. doi:10.1104/pp.104.900246.

Miransari, M. (2011). Soil microbes and plant fertilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(5), 875–885. doi:10.1007/s00253-011-3521-y.

Mishanina, T. V., Libiad, M., Banerjee, R. (2015). Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nature Chemical Biology*, 11(7), 457–464. doi:10.1038/nchembio.1834.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Science*, 9(10), 490–498. doi:10.1016/j.tplants.2004.08.009.

Moenne-Loccoz, Y., Naughton, M., Higgins, P., Powell, J., O'Connor, B., O'Gara, F. (1999). Effect of inoculum preparation and formulation on survival and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Applied Microbiology*, 86(1), 108–116. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00640.x.

Molina-Favero, C., Creus, C. M., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L. (2008). Aerobic Nitric Oxide Production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and Its Influence on Root Architecture in Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(7), 1001–1009. doi:10.1094/mpmi-21-7-1001.

Nabi, R. B. S., Tayade, R., Hussain, A., Kulkarni, K. P., et al, (2019). Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*. doi:10.1016/j.envexpbot.2019.02.003.

Nafiu, K.A., Adewale Kehinde, Togun, A., O., Abiodun, Moses., Chude, V., (2011). Effects of NPK fertilizer on growth, drymatter production and yield of eggplant in southwestern Nigeria. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2(7): 1117-1125. doi: 10.5251/abjna.2011.2.7.1117.1125.

Nath, C. P., Das, T. K., Rana, K. S., Bhattacharyya, R., et al. (2017). Weed and Nitrogen Management Effects on Weed Infestation and Crop Productivity of Wheat–Mungbean Sequence in Conventional and Conservation Tillage Practices. *Agricultural Research*, 6(1), 33–46. doi:10.1007/s40003-017-0246-x.

Nagorska, K, Bikowski, M, Obuchowski, M. (2007). Multicellular behavior and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrôle agent. *Acta Biochimica Polonica*, 54: 495-508.

Nemmiche, S. (2017). Oxidative Signaling Response to Cadmium Exposure. *Toxicological Sciences* 156(1), 4-10. doi:10.1093/toxsci/kfw222.

Nkhili E, (2009). Polyphénols de l'alimentation : extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. Thèse de doctorat. Université Cadi Ayyad – Marrakech.

Ntimbane thierry, (2009). Importance du stress oxydant dans le diabète secondaire à la fibrose kystique. Thèse de doctorat. Université de Montréal, 402p.

Oloyede, F. M., Agbaje, G. O., Obuotor, E. M., Obisesan, I. O., (2012). Nutritional and antioxidant profiles of pumpkin (*Cucurbita pepo* Linn.) immature and mature fruits as influenced by NPK fertilizer. *Food Chemistry*, 135(2), 460–463. doi:10.1016/j.foodchem.2012.04.124.

Olsen, K. M., Hehn, A., Jugdé, H., Sliemstad, R., Larbat, R., Bourgaud, F., Lillo, C. (2010). Identification and characterisation of CYP75A31, a new flavonoid 3'5'-hydroxylase, isolated from *Solanum lycopersicum*. *BMC Plant Biology*, 10(1), 21. doi:10.1186/1471-2229-10-21.

Olson, K. R., Gao, Y., Arif, F., Arora, K., et al. (2018). Metabolism of hydrogen sulfide (H₂S) and Production of Reactive Sulfur Species (RSS) by superoxide dismutase. *Redox Biology*, 15, 74–85. doi:10.1016/j.redox.2017.11.009.

Ouerghemmi, I., Bettaieb Rebey, I., Rahali, F. Z., Bourgou, S., Pistelli, L., Ksouri, R., Saidani Tounsi, M. (2017). Antioxidant and antimicrobial phenolic compounds from extracts of cultivated and wild-grown Tunisian *Ruta chalepensis*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(2), 350–359. doi:10.1016/j.jfda.2016.04.001.

Palleroni, N. J. (2015). *Pseudomonas*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–1. doi:10.1002/9781118960608.gbm01210.

Pandey, P., Irulappan, V., Bagavathiannan, M.V., Senthil-Kumar, M. (2017). Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. *Front. Plant Sci.* 8, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00537>.

Parent Claire, Capelli Nicolas, Dat James, (2008). Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *C. R. Biologies* 331, 255-261. doi:10.1016/j.crv.2008.02.001.

Probanza, A., Lucas García, J. A., Ruiz Palomino, M., Ramos, B., Gutiérrez Mañero, F. J. (2002). *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). *Applied Soil Ecology*, 20(2), 75–84. doi: 10.1016/s0929-1393(02)00007-0.

Ramette, A., Yvan Moe'ne-Loccoz., Défago, G. (2006). Genetic diversity and biocontrol potential of fluorescent pseudomonads producing phloroglucinols and hydrogen cyanide from Swiss soils naturally suppressive or conducive to *Thielaviopsis basicola*-mediated black root rot of tobacco. *FEMS Microbiology Ecology*, 55(3), 369–381. doi:10.1111/j.1574-6941.2005.00052.x.

Reyes, M. E. Q., Rohrbach, K. G., Paull, R. E. (2004). Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 33(2), 193–203. doi:10.1016/j.postharvbio.2004.02.003.

Rezzonico, F., Zala, M., Keel, C., Duffy, B., Moëne-Loccoz, Y., Défago, G. (2006). Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2,4-

diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection? *New Phytologist*, 173(4), 861–872. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01955.x

Ribéreau-Gayon, G. (1968). Etude des mecanismes de synthèse et de transformation de l'acide malique, de l'acide tartrique et de l'acide citrique chez *Vitis vinifera* L. *Phytochemistry*, 7(9), 1471–1482. doi: 10.1016/s0031-9422(00)88592-1.

Sahu, P. K., Singh, D. P., Prabha, R., Meena, K. K., Abhilash, P. C. (2018). Connecting microbial capabilities with the soil and plant health: Options for agricultural sustainability. *Ecological Indicators*. doi:10.1016/j.ecolind.2018.05.084.

Salbitani Giovanna, Simona Carfagna, Claudia Bottone,(2017). Determination of Reduced and Total Glutathione Content in Extremophilic Microalga *Galdieria phlegrea*. *Bio-Protocol*, 7: 1-6. doi: 10.21769/BioProtoc.2372.

Sánchez Chávez E., Muñoz E., Anchondo Á., Ruiz J.M., Romero L., 2009. Nitrogen impact on nutritional status of Phosphorus and its main bioindicator: response in the roots and leaves of green bean plants. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15(2):177-182. doi: 10.5154/r.rchsh.2009.15.024

Sanchez P.A., Shepherd K.D., Soule M.J., Place F.M., et al, 1997. Soil Fertility replenishment in Africa: An Investment in Natural Resource Capital. In: Buresh, R.J., Sanchez, P.A., Calhoun, F. (Eds.), *Replenishing soil fertility in Africa*. SSSA Special Publication. pp.1-46.

Sharma, P., A. B. Jha, R. S. Dubey and M. Pessarakli., (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of botany*, 1-26, 2012. Doi: 10.1155/2012/217037.

Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*, 101(1), 10–19. doi:10.1016/j.foodchem.2006.01.004.

Siddiqui, Z. (2006). *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Dordrecht, The Netherlands, 324p.

Singh, B. K., Sharma, R. K., & Garg, B. S. (2006). Kinetics and molecular modeling of biologically active glutathione complexes with lead(II) ions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 84(3), 593–600. doi:10.1007/s10973-005-7156-z.

Sivandzade, F., Prasad, S., Bhalerao, A., Cucullo, L. (2019). NRF2 and NF- κ B interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: Molecular mechanisms and possible therapeutic approaches. *Redox Biology* 21, 101059. doi:10.1016/j.redox.2018.11.017.

Skwarylo-Bednarz B, Krzepilko, 2009. Effect of various NPK fertilizer doses on total antioxidant capacity of soil and amaranth leaves (*Amaranthus cruetus* L.). *International Agrophysics*, 23: 61-65.

Solano, B. R., Maicas, J. B., Mañero, J. G. (2009). Biotechnology of the Rhizosphere. *Recent Advances in Plant Biotechnology*, 137–162. doi:10.1007/978-1-4419-0194-1_8.

Soltner D., 2003. Les bases de la production végétale. Tome I. Le sol et son amélioration. Collection Sciences et Techniques Agricoles. 23^{ème}. Ed. Paris. 472p.

Spiteller, G. (2006). Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(3), 362–387. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.03.013.

Steenhoudt, O., Vanderleyden, J. (2000). Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 487–506. doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x .

Sun, A., Nie, S., Xing, D. (2012). Nitric Oxide-Mediated Maintenance of Redox Homeostasis Contributes to NPR1-Dependent Plant Innate Immunity Triggered by Lipopolysaccharides. *PLANT PHYSIOLOGY*, 160(2), 1081–1096. doi:10.1104/pp.112.201798.

Tadolini, B., Juliano, C., Piu, L., Franconi, F., Cabrini, L.(2000). Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. *Free Radical Research*, 33(1), 105–114. Doi: 10.1080/10715760000300661.

Tan, J., Zhuo, C., Guo, Z. (2012). Nitric oxide mediates cold- and dehydration-induced expression of a novel MfHyPRP that confers tolerance to abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, n/a–n/a. doi:10.1111/ppl.12032.

Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(2), 335–344. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478.

Unifa,(2005).Le rôle des éléments nutritifs, sur <https://fertilisation-edu.fr/nutrition-des-plantes/le-role-des-elements-nutritifs.html>. Consulté le 30/05/2020.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.

Valko, M., Rhodes, C.J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radical, metals and antioxidants in oxidative stress-induced Cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160(1):1-40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009.

Van Elsas, J.D., Jansson, J.K., Trevors, J.T. (2006). *Modern soil microbiology*. 2nd edition, Boca Raton, FL, USA,646p.

Vasudevan, S., Peltz, S. W., Wilusz, C. J. (2002). Non-stop decay-a new mRNA surveillance pathway. *BioEssays*, 24(9), 785–788. doi:10.1002/bies.10153.

Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Science*, 151(1), 59–66. doi: 10.1016/s0168-9452(99)00197-1.

Verma, J.P., J. Yadav, K.N. Tiwari, (2010). Application of *Rhizobium* sp. BHURC01 and plant growth promoting rhizobacteria on nodulation, plant biomass and yields of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Agric. Res.*, 5: 148-156.doi:10.3923/ijar.2010.148.156.

Vernoux, T., Robert C.W., Kevin A.S., Jean-Philippe R., et al.(2000). The root meristemless1/cadmium sensitive2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *The Plant Cell* 12(1), 97–110. doi:10.1105/tpc.12.1.97.

Verslues, P. E., & Sharma, S. (2010). Proline Metabolism and Its Implications for Plant-Environment Interaction. *The Arabidopsis Book*, 8, e0140. DOI:10.1199/tab.0140.

Vessey J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* .255:571- 586. doi:10.1023/a:1026037216893.

White PJ, Hammond JP. (2008). Phosphorus nutrition of terrestrial plants. *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 51–81.doi:10.1007/978-1-4020-8435-5_4.

Yagi, K. (1976). A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochemical Medicine*, 15(2), 212–216. doi: 10.1016/0006-2944(76)90049-1.

Ye, Z.-W., Zhang, J., Townsend, D. M., Tew, K. D. (2015). Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(8), 1607–1621. doi:10.1016/j.bbagen.2014.11.010.

Zablotowicz, R. M., Tipping, E. M., Lifshitz, R., Kloepper, J. W. (1991). Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. *The Rhizosphere and Plant Growth*, 315–326. doi:10.1007/978-94-011-3336-4_70.

Zhang, C., Peng, S., Peng, X., Chavez, A. Q., Bennett, J. (1997). Response of glutamine synthetase isoforms to nitrogen sources in rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Plant Science*, 125(2), 163–170. doi:10.1016/s0168-9452(97)00075-7.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559. doi: 10.1016/s0308-8146(98)00102-2.