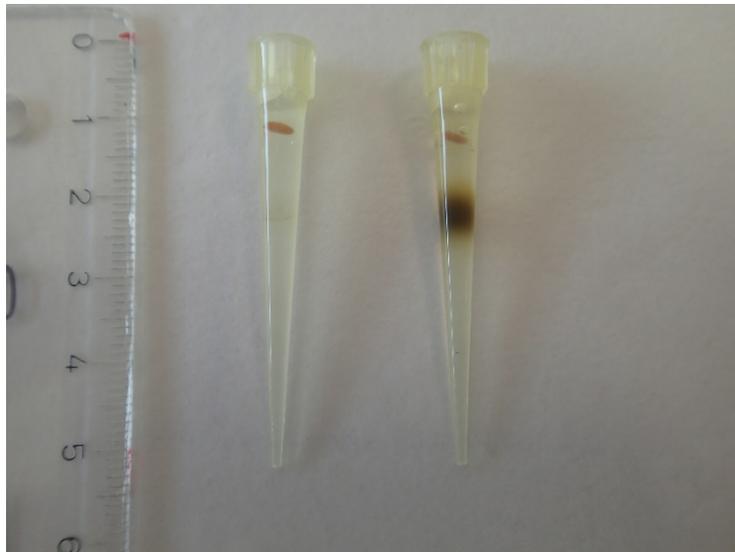


# Compte-rendu détaillé des biotests effectués dans le cadre du projet NOGLYPHOS.



# 1. Procédures d'extractions

## Mémo – Noglyphos 01

Date: 18 Octobre 2019  
À: A qui de droit  
De: Habiba Davet, HES-SO valais  
Concerne: Préparation des extraits bruts des parties aériennes de *Medicago lupulina* L. et de *Clinopodium vulgare* L.

But: Préparer d'extraits bruts de *Medicago lupulina* L. et de *Clinopodium vulgare* L. par extractions solide-liquide à haute pression consécutives avec des solvants de polarité croissante.

Matériel: Broyeur centrifuge: ZM100, Retsch, tamis Ø 0.1mm ; Extracteur à haute pression: ASE 350, Dionex ; Solvants d'extraction: Heptane ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich), Acétonitrile (ChromAR HPLC, Macron), Ethanol (Absolu, Cochimy), Eau (0.055 [ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ], Milli-Q) ; Concentreur centrifuge sous vide: Speed vac., AAPPTEC ; Balance analytique : AE 240, Mettler ; Echantillons: les parties aériennes de *Medicago lupulina* L., les parties aériennes de *Clinopodium vulgare* L. (Récolté le 10.07.2018 à Bernex GE).

Méthodes: Préparation des échantillons: Broyage des échantillons à 1.00 mm de diamètre à 14'000 rpm (21'732 x g, rotor Ø 99 mm) ; Paramètres de l'ASE: 100 bar, 40°C, 10 min (extraction statique), 60% de la cellule (rinçage), 60 sec (purge à l'azote), 1 cycle ; Extractions: Un mélange homogène de 3 g de broyat d'échantillon avec 6 g de terre de diatomée est placé dans une cellule. Les cellules sont chacune extraite consécutivement avec de l'heptane, de l'acétonitrile suivis d'éthanol à 30%. Ces extraits sont définis comme respectivement yEB1, yEB2 et yEB3. Afin de discerner les deux échantillons différents, l'abréviation M sera utilisée à la place du « y » pour *Medicago lupulina* L., et C pour *Clinopodium vulgare* L. ; Dosage de la matière sèche: Evaporation au speed vac. de 1.000 ml d'extraits suivis de la pesée de la matière sèche restante.

Résultats:

| Extrait | Solvant      | Matière sèche | Masse volumique |
|---------|--------------|---------------|-----------------|
| CEB1    | Heptane      | 1.6 mg/ml     | 683.2 mg/ml     |
| CEB2    | Acétonitrile | 1.2 mg/ml     | 733.9 mg/ml     |
| CEB3    | Ethanol 30%  | 19.8 mg/ml    | 894.7 mg/ml     |
| MEB1    | Heptane      | 2.0 mg/ml     | 692.2 mg/ml     |
| MEB2    | Acétonitrile | 1.6 mg/ml     | 777.4 mg/ml     |
| MEB3    | Ethanol 30%  | 22.8 mg/ml    | 890.8 mg/ml     |

Perspectives: 5 mg de chaque extrait sec sont envoyés à l'HEPIA, où un micro-biotest (embouts) sandwich est effectué sur chaque extrait. (Novembre 2018)

## Mémo – Noglyphos 02

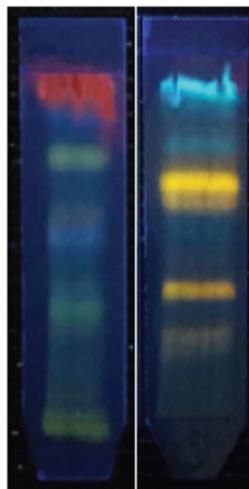
Date: 29 Janvier 2019  
À: A qui de droit  
De: Habiba Davet, HES-SO valais  
Concerne: Conditions d'élution pour le raffinage des extraits d'intérêts biologiques, MEB3 et CEB3, par chromatographie sur couche mince.

But: Déterminer par chromatographie sur couche mince, les meilleures conditions afin de raffiner les extraits ayant le plus grand effet sur la croissance de graine de cresson, MEB3 et CEB3.

Matériel: Plaque de chromatographie sur couche mince (CCM): Macherey-Nagel, POLYGRAM SIL G/UV<sub>254</sub>, 4x8 cm ; Lampe: UV 254nm ou 366nm ; Produits: acid-b-ethylamino ester de diphenylborique (NP), polyéthylène glycol 4000 (PEG) ; Solvants: Acétate d'éthyle, Acide formique, Ethanol, Eau ; Echantillons: MEB3 et CEB3.

Méthodes: Préparation de la plaque: 8µL (dépôt en ligne), 8cm (migration) ; Révélateur : Spray de NP/PEG 1:0.8 ; Mesure : 366nm

Résultats:



Les paramètres d'élutions obtenus après optimisation sont :

- MEB3 : Acétate d'éthyle/Acide formique 50% (7:3)
- CEB3 : Acétate d'éthyle/Ethanol 30%/Acide formique (7:2.6:0.4)

La Figure 1 illustre la séparation sur CCM des extraits à raffiner.

Figure 1 – CCM obtenue après optimisation des paramètres d'élutions :  
Extrait MEB3 (gauche) ;  
Extrait CEB3 (droite).

Perspectives: Une chromatographie flash de 1cm de diamètre sera effectuée à l'aide de ces conditions d'élution.

former les différents extraits est faite par comparaison des couches minces obtenues. Le XX présente la sélection effectuée et la relation faite avec l'essai préliminaire.

Tableau 2 – Concentrations en matière sèche obtenues à l'issus du Raffinage de l'extrait CEB3

| Extraits | Fractions | Fractions relatives | Concentration en matière sèche |
|----------|-----------|---------------------|--------------------------------|
| CER1     | 1 à 6     | CER1*               | 6.64 mg/ml                     |
| CER2     | 7 à 13    |                     | 8.38 mg/ml                     |
| CER3     | 14 à 19   | CER2*               | 2.94 mg/ml                     |
| CER4     | 20 à 26   | CER3*               | 4.28 mg/ml                     |
| CER5     | 27 à 40   | CER4*               | 6.96 mg/ml                     |
| CER6     | 41 à 50   |                     | 3.28 mg/ml                     |
| CER7     | 51 à 63   |                     | 34.26 mg/ml                    |

\*Formées lors de l'essai préliminaire

Un micro-biotest (embout) sandwich est effectué<sup>2</sup> sur les CER1, CER5, CER6 et CER7 secs et standardisés à 2 mg de matière sèche.

Perspectives: Transmettre l'extrait CER2 pour effectuer le microbiotest (embout) sandwich à l'Hépi. Cette extrait peut être plus actif que le CER1 et a été omis.

Démarrer l'analytique sur CER1, CER2, CER5, CER6 et CER7.

<sup>2</sup> Rapport essai : biotest NG 13 (05.04.19 – 08.04.19), Nicolas Delabays, Hépi, 08.04.2019

## Mémo – Noglyphos 03

Date: 26 Février 2019  
À: A qui de droit  
De: Habiba Davet, HES-SO valais  
Concerne: Raffinage de l'extrait CEB3 par chromatographie flash.

But: Obtenir par chromatographie flash des extraits raffinés de CEB3.

Matériel: Colonnes chromatographiques rodées : Ø 1cm, Ø 5cm; Pompe ; Rotavapor, Buchi ;  
Plaque de chromatographie sur couche mince (CCM): Macherey-Nagel, POLYGRAM  
SIL G/UV<sub>254</sub>, 4x8 cm ; Lampe: UV 366nm ; Produits: acid-b-ethylamino ester de  
diphénylborique (NP), polyéthylène glycol 4000 (PEG) ; Solvants: Acétate d'éthyle,  
Acide formique, Ethanol, Eau ; Echantillon: CEB3.

Méthodes: **Essai préliminaire à petite échelle (Ø 1cm):** Préparation de la colonne: 15cm (hauteur  
silice), 6g (silice), dépôt liquide (éluant) ; Préparation de CEB3: 79.8mg (sec) ;  
Conditions d'éluion: Acétate d'éthyle/Ethanol 30%/Acide formique (7:2.6:0.4), 1ml  
(volume de fraction) ; **Raffinage à grande échelle (Ø 5cm):** Préparation de la colonne:  
15cm (hauteur silice), 129g silice, 2.04g silice (dépôt solide) ; Préparation de CEB3:  
1.12g (sec) ; Conditions d'éluion: Acétate d'éthyle/Ethanol 30%/Acide formique  
(7:2.6:0.4), 50ml (volume de fraction) ; Préparation de la plaque: 5µL (dépôt), 8cm  
(migration) ; Révélateur : Spray de NP/PEG 1:0.8 ; Mesure : 366nm.

Résultats: L'essai préliminaire a permis de vérifier les conditions d'éluion à petite échelle et prése  
rendement de 58%. Une éluion de chaque fraction sur chromatographie sur couche min  
séparation effectuée. La Figure 1 présente cette couche mince. Celle-ci permet de former  
raffinés présentés dans le

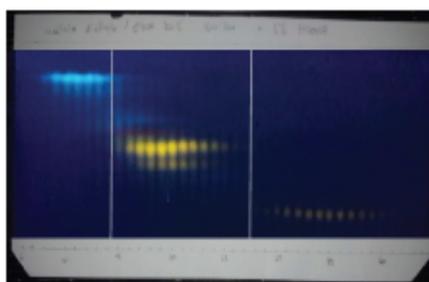


Figure 0 – Chromatographie sur couche mince  
des fractions (6 à 50) issues de l'essai  
préliminaire à petite échelle.

Tableau 1 – Quantité de matière  
présente dans les extraits raffinés  
issues de fraction.

<sup>1</sup> Rapport essai : biotest NG10 (19.02.2019 – 22.02.2019), Nicolas Delabays, Hépia, 22.02.2019

## Mémo – Noglyphos 04

Date: 20 Mars 2019  
 À: A qui de droit  
 De: Habiba Davet, HES-SO valais  
 Concerne: Raffinage de l'extrait MEB3 par chromatographie flash.

**But:** Obtenir par chromatographie flash des extraits raffinés de CEB3.

**Matériel:** Colonnes chromatographiques rodées : Ø 1cm, Ø 5cm; Pompe ; Rotavapor, Buchi ; Plaque de chromatographie sur couche mince (CCM): Macherey-Nagel, POLYGRAM SIL G/UV<sub>254</sub>, 4x8 cm ; Lampe: UV 366nm ; Produits: acid-b-ethylamino ester de diphénylborique (NP), polyéthylène glycol 4000 (PEG) ; Solvants: Acétate d'éthyle, Acide formique, Eau ; Echantillon: MEB3.

**Méthodes:** **Essai préliminaire à petite échelle (Ø 1cm):** Préparation de la colonne: 15cm (hauteur silice), 5g (silice), dépôt liquide (éluant) ; Préparation de CEB3: 41.8mg (sec) ; Conditions d'éluion: Acétate d'éthyle/Acide formique 50% (7:3), 1ml (volume de fraction) ; **Raffinage à grande échelle (Ø 5cm):** Préparation de la colonne: 15cm (hauteur silice), 234g silice, 2.5g silice (dépôt solide) ; Préparation de CEB3: 1.2g (sec) ; Conditions d'éluion: Acétate d'éthyle/Acide formique 50% (7:3), 50ml (volume de fraction) ; Préparation de la plaque: 5µL (dépôt), 8cm (migration) ; Révélateur : Spray de NP/PEG 1:0.8 ; Mesure : 366nm.

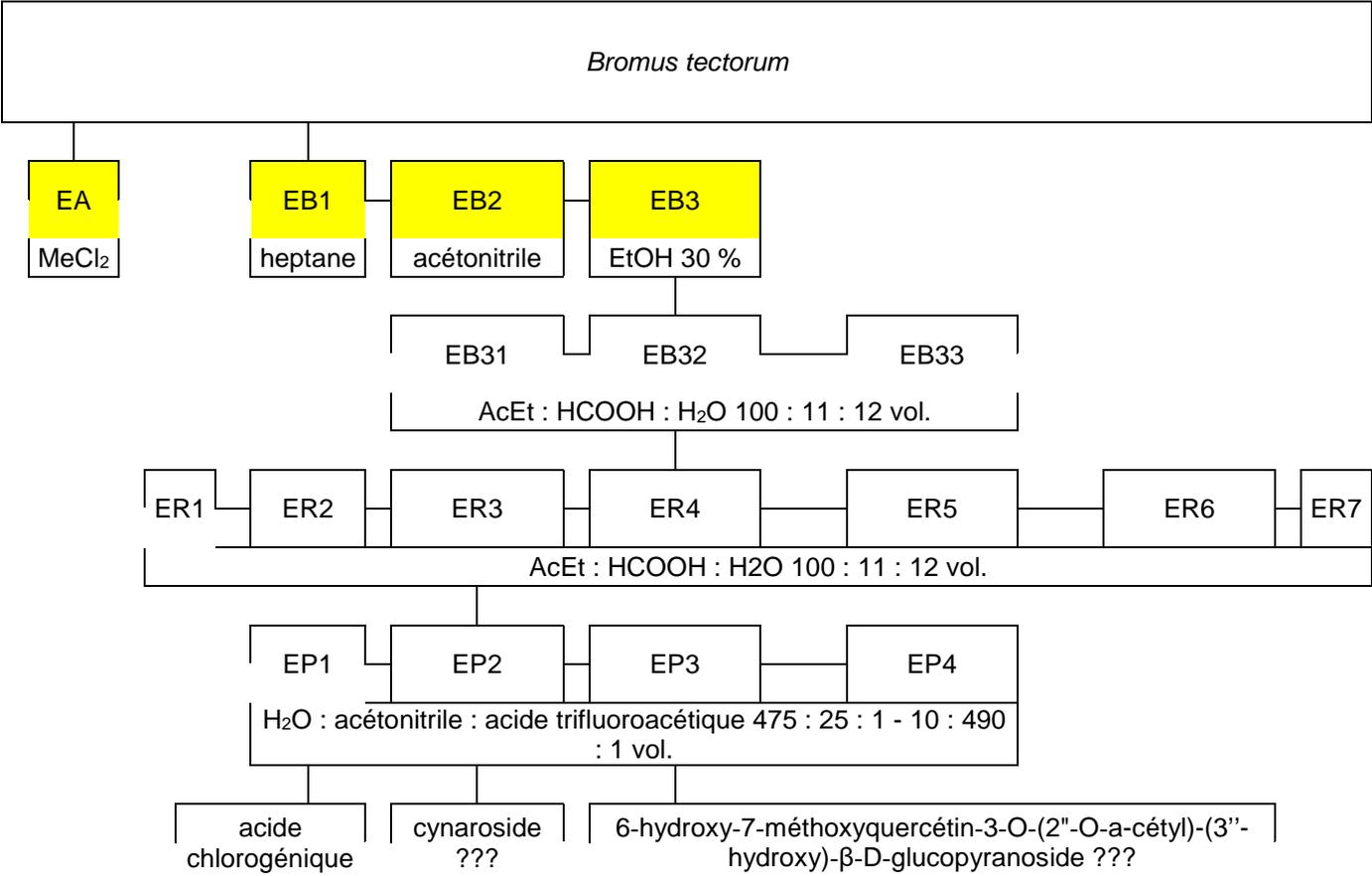
**Résultats:** L'essai préliminaire a permis de vérifier les conditions d'éluion à petite échelle. Une éluion de chaque fraction sur chromatographie sur couche mince montre la séparation effectuée. Celle-ci permet de former les extraits raffinés présentés dans le

Tableau 1 – Quantité de matière présente dans les extraits raffinés issues de fraction.

| Extraits | Fraction(s) | Masses sèches |
|----------|-------------|---------------|
| MER1*    | 1 à 2       | 7.0 mg        |
| MER2*    | 3 à 5       | 2.2 mg        |
| MER3*    | 6           | 1.0 mg        |
| MER4*    | 7           | 1.3 mg        |
| MER5*    | 8 à 10      | 5.7 mg        |
| MER6*    | 11 à 15     | 3.8 mg        |
| MER7*    | 20 à 28     | 7.0 mg        |
| MER8*    | 29 à 36     | 2.6 mg        |
| MER9*    | 37 à 45     | 13.1 mg       |
| MER10*   | 46 à 71     | 11.5 mg       |
| MER11*   | 72 à 96     | 4.6 mg        |

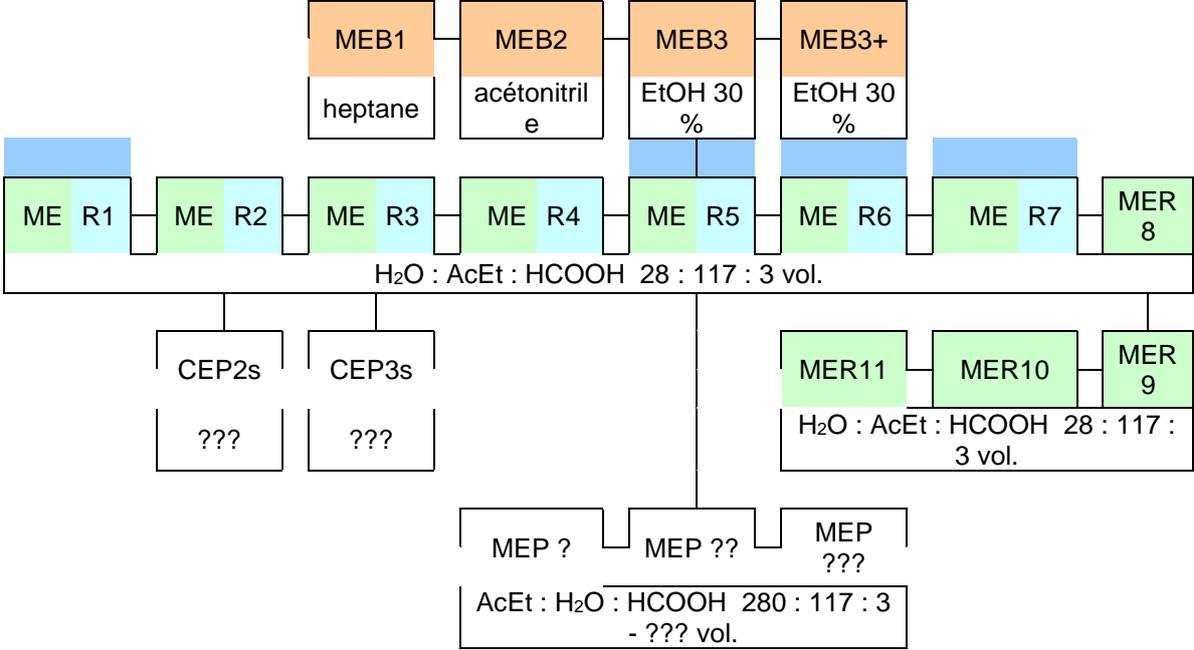
Après validation de leur activité<sup>1</sup>, une chromatographie flash à plus grande échelle est menée à bien dans les mêmes conditions d'éluion. La sélection des fractions

<sup>1</sup> Rapport essai : biotest NG12 (05.03.2019 – 10.03.2019), Nicolas Delabays, Hépia, 11.03.2019



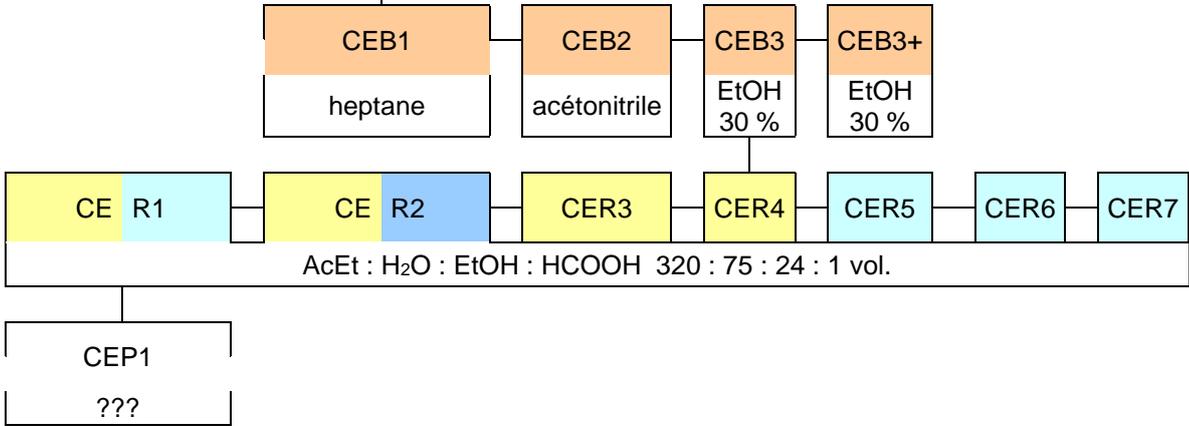
NG06 4.09.18

*Medicago lupulina*



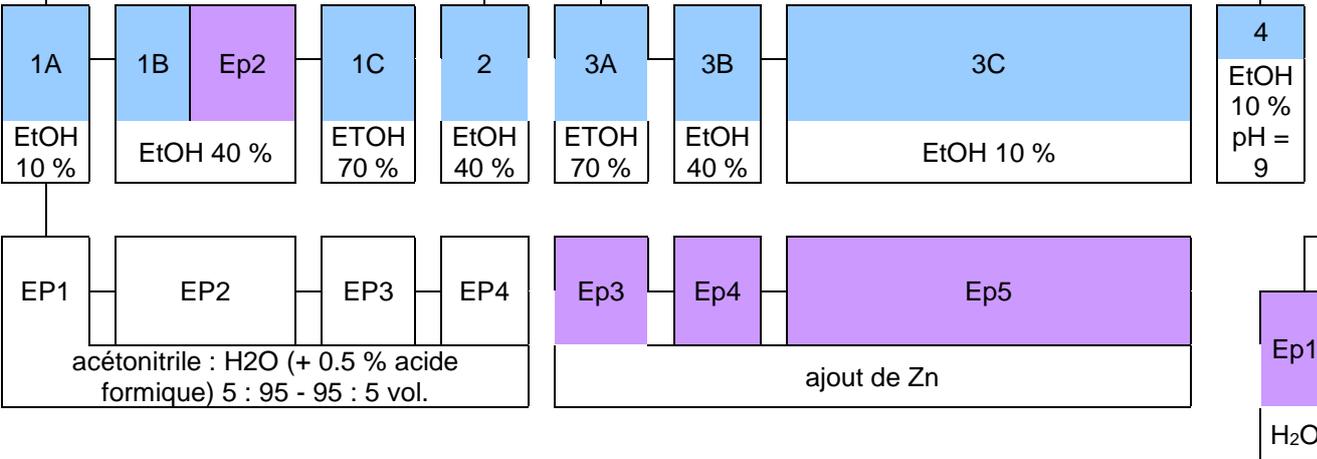
- NG08  
19.11.18
- NG12  
5.04.19
- NG13  
5.04.19
- NG15  
2.07.19

*Clinopodium vulgare*



- NG08  
19.11.18
- NG10  
19.02.19
- NG13  
5.04.19
- NG15  
2.07.19

*Medicago lupulina*



- NG15 2.07.19
- NG16 27.07.19

## 2. Rapports biotests

Rapport essai: biotest NG 1 (29 juin 2018 - 2 juillet 2018)

**Micro-biotest (embouts) sandwich, échantillons Habiba Davet du 21 juin 2017 (remise)**

Extraits testés :  
FD-1-5  
FD-6-8  
FD-9-13  
FD-14-16  
FD-17-19  
FD20-23  
FD-24-30

### Protocole

Protocole J.-P. de Joffrey, légèrement adapté.

29 juin :

Echantillons : reprise des extraits (4 mg, impurs) dans 200 ul H<sub>2</sub>O, puis 200 ul agar à 2 %

Préparation des embouts (12 répétitions): 100 ul agar 1% + 25 ul échantillons + 75 ml agsar 1% + dépôt 1 graine de cresson alenois + 20 ul agar 1 % (stabilisation).

2 juillet:

Mesure des racines et des hypocotyles (prise en compte à partir de 1 mm de développement)

### Résultats

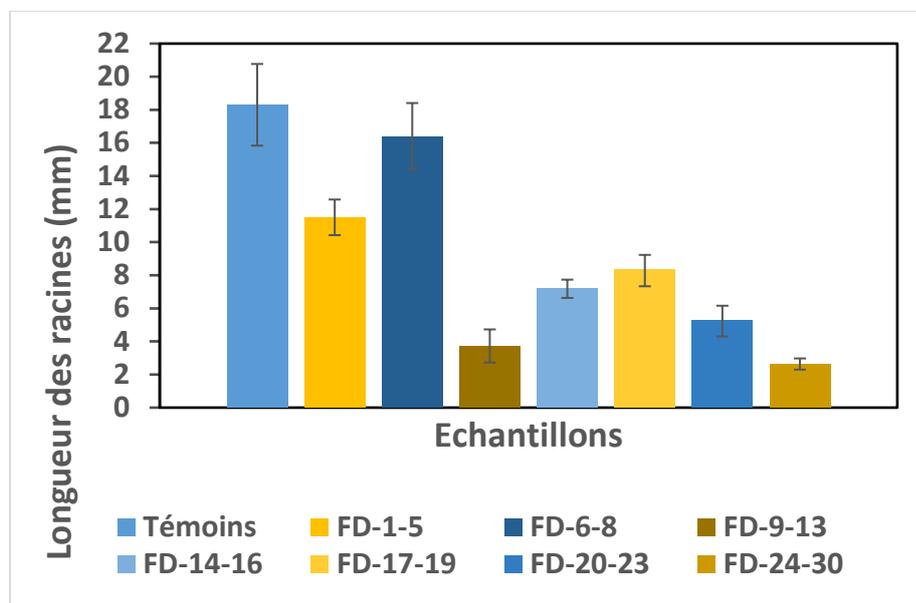


Figure 1 : Effets, sur la croissance de racines de cresson alenois, de différents extraits (échantillons) de brome des toits (*Bromus tectorum*). Moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne, n entre 9 et 11.

Nicolas Delabays, 2 juillet 2018

## Micro-biotest (embouts) sandwich, échantillons Habiba Davet du 21 juin 2018 (remise)

Extraits testés : FD-9-13 F1  
FD-9-13 F2  
FD-9-13 F3  
FD-9-13 F4 (FD-17-19 F4 ?)

### Protocole

Protocole J.-P. de Joffrey, légèrement adapté.

4 juillet juin :

Echantillons : reprise des extraits (2.1 mg) dans 150 ul H<sub>2</sub>O, puis 150 ul agar à 2 %

Préparation des embouts (12 répétitions): 100 ul agar 1% + 20 ul échantillons + 80 ml agar 1% + dépôt 1 graine de cresson alenois (préalablement imbibée dans H<sub>2</sub>O pendant 2 heures) + 20 ul agar 1 % (stabilisation).

7 juillet:

Mesure des racines (prise en compte à partir de 1 mm de développement)

### Résultats

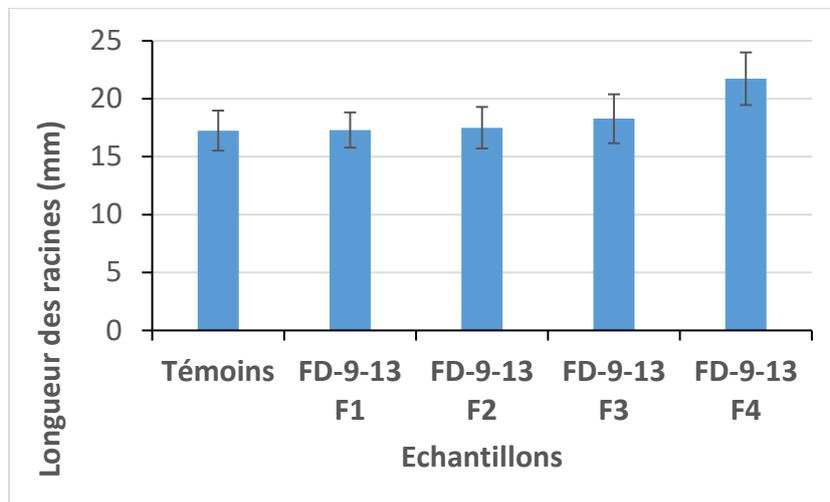


Figure 1 : Effets, sur la croissance de racines de cresson alenois, de différents extraits (échantillons) de brome des toits (*Bromus tectorum*). Moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne, n entre 10 et 12.

Nicolas Delabays, 10 juillet 2018

## Test multi-puits sandwich, diverses espèces et 2 milieux de culture

Plantes testées : *Bromus tectorum* (Lullier, 14.03.18)  
*Medicago lupulina* (Lullier, 17.05.18)  
*Origanum vulgare* (La Tuillière, 07.05.18)

### Protocole

23 août :

Matériel végétal : feuilles sèches grossièrement broyées (manuellement)

Test sandwich:

- dépôt de 50 mg de feuilles sèches de chacune des 3 espèces dans respectivement 2 (BROTE) et 1 (MEDLU et ORIVU) puit d'une plaque multi-puits (5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> puits = témoins sans matériel végétal)
- coulage de 3 ml d'agar à 1%, respectivement de Gerlit à 0,8 %, laisser refroidir
- coulage de 4 ml d'agar à 1 %, respectivement de Gerlit à 0,8 %, laisser refroidir
- dépôt de 5 graines (par puit) de cresson alénois
- dépôt de 1 ml d'agar à 1 %, respectivement de Gerlit à 0,8 %

Préparation de 4 plaques (= 4 répétitions): = essai en blocs randomisés à 4 répétitions

Plaques placées en conditions ambiantes (laboratoire)

27 août:

Mesure de la longueur des racines (prise en compte à partir de l'ouverture de la graine)

### Résultats

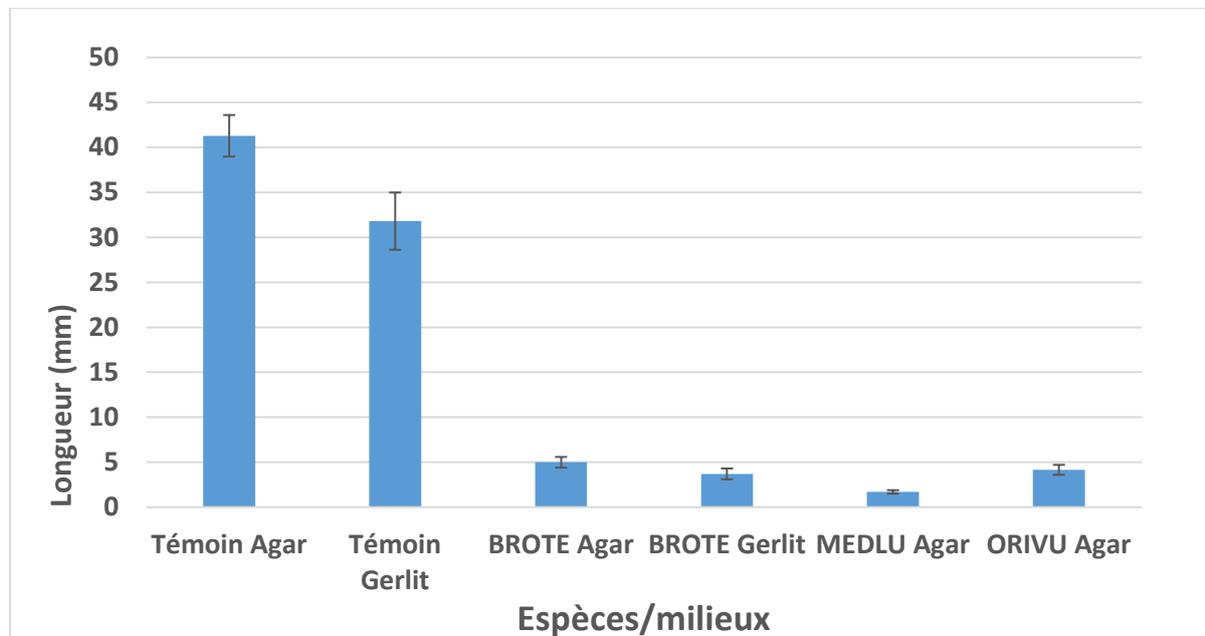


Figure 1 : Biotest sandwich: effet, sur la longueur des racines de cresson, des feuilles sèches de 3 espèces du "mélange lémanique" (Moyenne + SEM; n = 4) (BROTE: *Bromus tectorum*; MEDLU: *Medicago lupulina*; ORIVU: *Origanum vulgare*). Comparaison de 2 milieux de culture : Agar et Gerlit.

Mesure un peu tardive, contamination (bactérie) d'un puit (agar) avec MEDLU.

Témoin : Développement correct des racines; meilleur développement dans le milieu agar. Retrait de la plantule, et donc réalisation de la mesure, plus aisés dans le milieu agar

BROTE : Forte inhibition de la croissance des racines, ces dernières souvent brunes, parfois nécrosées. Hypocotyles présents

MEDLU: Forte inhibition de la croissance des racines, ces dernières parfois nécrosées. Hypocotyles présents.

ORIVU : Forte inhibition de la croissance des racines. Racines courtes, épaisses, très blanches (aucune nécrose). Pas de développement des hypocotyles.

Nicolas Delabays, 20 septembre 2018

## Test multi-puits sandwich, diverses espèces

**Plantes testées :** *Achillae millefolium* (Anet bas, 10. 07.18)  
*Clinopodium vulgare* (Anet bas, 10.07.18)  
*Medicago lupulina* (Lullier, 17.05.18)  
*Prunella vulgaris* (Lullier, 15.07.18)  
*Sanguisorba minor* (Anet bas, 10.07.18)

### Protocole

29 août :

Matériel végétal : feuilles sèches réduites en poudre grossière (polytron)

Test sandwich:

- dépôt de 30 mg de poudre de feuilles sèches de chacune des 5 espèces dans un puit d'une plaques multi-puits (6<sup>ème</sup> puit = témoin sans matériel végétal)
- coulage de 3 ml d'agar à 1%, laisser refroidir
- coulage de 4 ml d'agar à 1 %,laisser refroidir
- dépôt de 5 graines (par puit) de cresson alénois (préalablement imbibées dans H<sub>2</sub>O pendant 2 heures)
- dépôt de 1 ml d'agar à 1 %

Préparation de 4 plaques (= 4 répétitions): = essai en blocs randomisés à 4 répétitions

Plaques placées en conditions ambiantes (laboratoire)

3 septembre:

Mesure de la longueur des racines (prise en compte à partir de l'ouverture de la grain

### Résultats

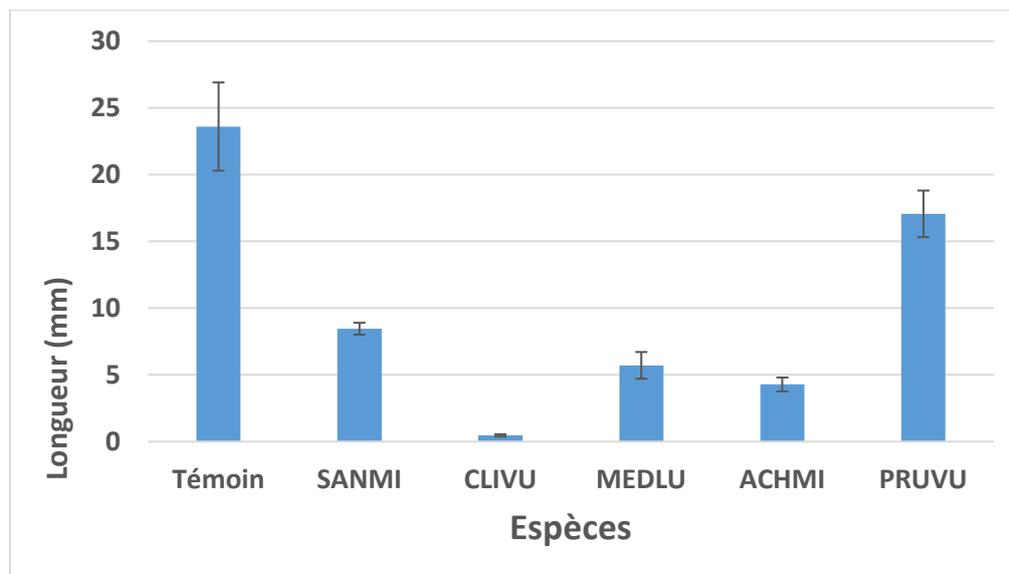


Figure 1 : Biotest sandwich: effet, sur la longueur des racines de cresson, des feuilles sèches de 5 espèces du "mélange lémanique" (Moyenne  $\pm$  ETM; n = 4) (SANMI: *Sanguisorba minor*; CLIVU: *Clinopodium vulgare*; MEDLU: *Medicago lupulina*; ACHMI: *Achillea millefolium*; PRUVU : *Prunella vulgaris*)

Témoin : Développement correct des racines: fines et longues

SANMI : inhibition moyenne de la croissance des racines, ces dernières souvent brunes.

CLIVU: Développement très fortement inhibé (max. 1 mm) des racines. Racines par ailleurs très blanche. Hypocotyles non sortis, ou alors courts, épais et recourbés.

ACHMI : inhibition de la croissance des racines. Ces dernières très blanches et épaisses. Hypocotyles souvent non sortis, cotylédons chlorotiques.

MEDLU : inhibition de la croissance des racines, ces dernières parfois un peu brunâtres. Hypocotyles souvent non sortis, cotylédons chlorotiques.

PRUVU : faible inhibition, racines d'allure comparable au témoin (fines, longues et blanche).



Nicolas Delabays, 20 septembre 2018

## Test multi-puits sandwich, divers « écotypes » de MEDLU

**Plantes testées :** « morphotypes » de *Medicago lupulina* issus de populations (accessions) de diverses origines (Quarta, 2018)

- Ecotype F\*, type 1 : F1
- Ecotype H\*, type 1 : H1
- Ecotype E\*, type 2: E2
- Ecotype A, type 3 : A3
- Ecotype I, Type 2 : I 2

### Protocole

29 août :

Matériel végétal : feuilles sèches réduites en poudre grossière (polytron)

Test sandwich:

- dépôt de 30 mg de poudre de feuilles sèches de chacun des 5 écotypes dans un puit d'une plaques multi-puits (6ème puit = témoin sans matériel végétal)
- coulage de 3 ml d'agar à 1%, laisser refroidir
- coulage de 4 ml d'agar à 1 %,laisser refroidir
- dépôt de 5 graines (par puit) de cresson alénois (préalablement imbibées dans H2O pendant 2 heures)
- dépôt de 1 ml d'agar à 1 %

Préparation de 4 plaques (= 4 répétitions): = essai en vblocs randomisés à 4 répétitions

Plaques placées en conditions ambiantes (laboratoire)

3 septembre:

Mesure de la longueur des racines (prise en compte à partir de l'ouverture de la graine).

### Résultats

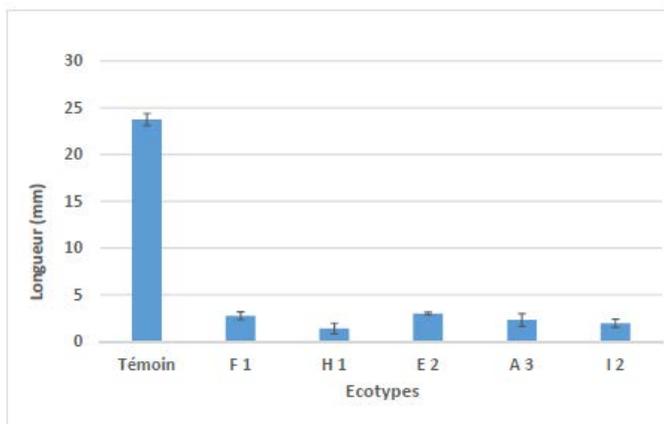


Figure 1: Biotest sandwich: effet, sur la longueur des racines de cresson, des feuilles sèches de 5 écotypes de *Medicago lupulina* (Moyenne + ETM; n = 4)

Témoin : Développement correct, et particulièrement homogène dans ce biotest, des racines: fines et longues

Inhibition importante, et similaire, de la croissance des racines avec les 5 écotypes testés.

Remarques : essai particulièrement homogène (faible variation entre répétitions). Inhibition plus prononcée qu'avec le lot de MEDLU du biotest NG4 (= même protocole, mais avec des plantes récoltées en extérieur et à un stade plus précoce).

Nicolas Delabays, 20 septembre 2018

## Rapport essai: biotest NG 7 (1 novembre 2018 - 5 novembre 2018)

### Test multi-puits sandwich sur silice, diverses espèces

**Plantes testées :** *Bromus tectorum*, stade végétatif (Lullier, 14.03.18),  
*Bromus tectorum*, stade épais (Lullier, 30.05.18)  
*Clinopodium vulgare* (Anet bas, 10.07.18)  
*Medicago lupulina* (Lullier, 17.05.18)  
*Sanguisorba minor* (Anet bas, 10.07.18)

### Protocole

#### 1<sup>er</sup> novembre:

Matériel végétal : feuilles (feuilles et tiges pour BROTE) sèches finement émiettées.

Test sandwich sur silice:

- Mélange de 400 mg de matériel végétal de chacun des 5 lots avec 40 g de sable siliceux ( $\geq 0.6$  mm)

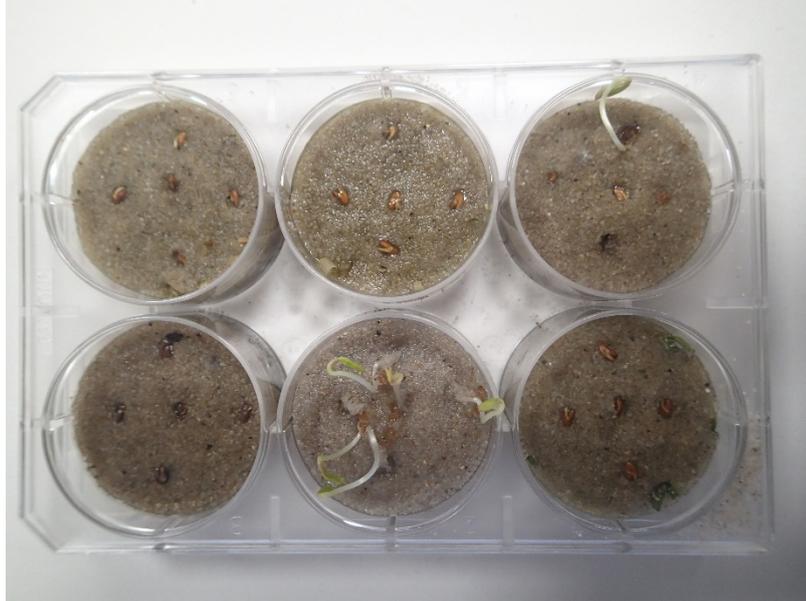


- Répartition des mélanges entre 4 plaques multi-puits (= 4 blocs), 1 puit par plaque et par espèce (6<sup>ème</sup> puit = témoin sans matériel végétal)
- Ajout de 5g de de sable siliceux ( $\geq 0.6$  mm) dans chacun des 24 puits
- Ajout de 4.5 ml d'H<sub>2</sub>O dans chacun des 24 puits
- dépôt de 5 graines (par puit) de cresson alénois (préalablement imbibées dans H<sub>2</sub>O pendant 2 heures)

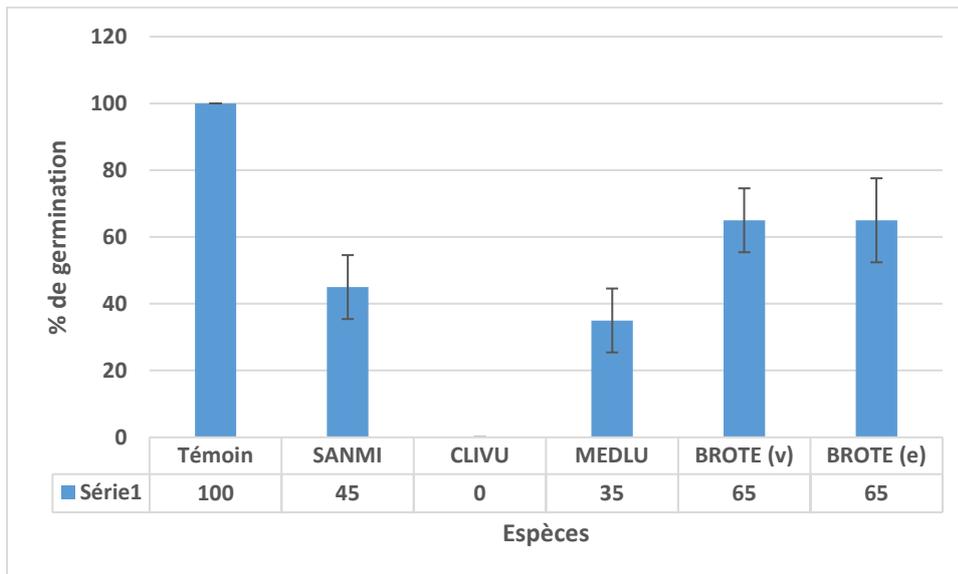
Plaques placées en conditions ambiantes (laboratoire)

5 novembre:

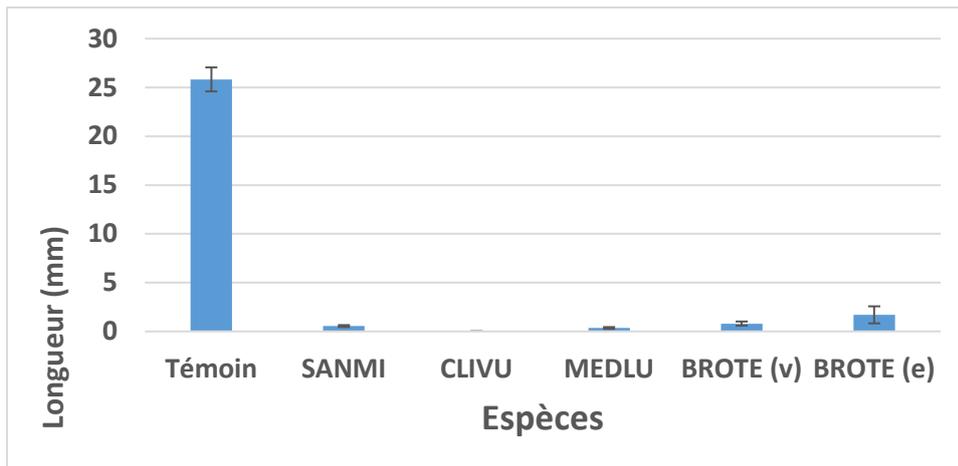
Mesure de la longueur des racines (prise en compte à partir de l'ouverture de la graine) et des hypocotyles.



### Résultats (germination et croissance des racines)



**Fig 1 : Biotest substrat silice: effet, sur la germination de graines de cresson, des feuilles sèches de 5 espèces du "mélange lémanique" (Moyenne + SEM; n = 4) (SANMI: *Sanguisorba minor*; CLIVU: *Clinopodium vulgare*; MEDLU: *Medicago lupulina*; BROTE: *Bromus tectorum*, (v): stade végétatif, (e): stade épiaison)**

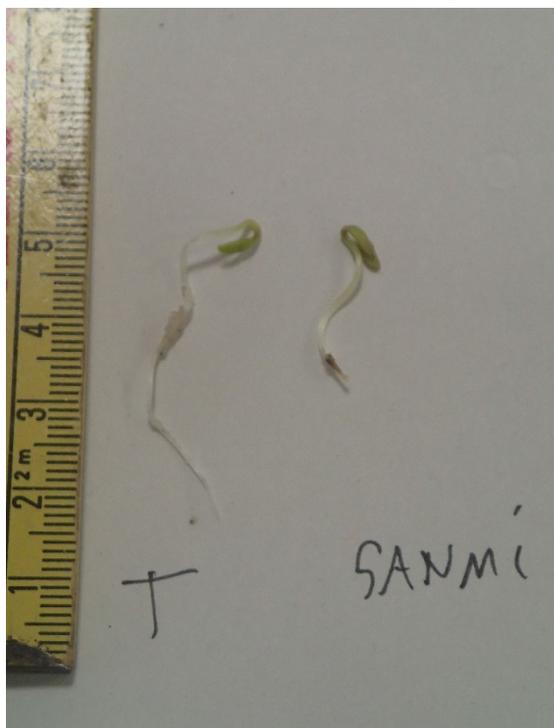


**Fig 2: Biotest substrat silice: effet, sur la longueur des racines de cresson, des feuilles sèches de 5 espèces du "mélange lémanique" (Moyenne + SEM; n = 4) (SANMI: *Sanguisorba minor*; CLIVU: *Clinopodium vulgare*; MEDLU: *Medicago lupulina*; BROTE: *Bromus tectorum*, (v): stade végétatif, (a): stade épiaison)**

Témoin : bonne germination (100 %) et développement correct et relativement homogène des racines: fines et longues

CLIVU : inhibition totale de la germination

Autres espèces : inhibition partielle de la germination et de la croissance des racines



## Micro-biotest (embouts) sandwich, échantillons Habiba Davet du 6 novembre 2018 (remise)

**Extraits testés :** *Clinopodium vulgare* (CEB1, CEB2, CEB3, CEB3+) et *Medicago lupulina* (MEB1, MEB2, MEB3, MEB3+)

### Protocole

11 novembre :

Echantillons: reprise des extraits dans 300 ul H<sub>2</sub>O, dispersion aux ultrasons, puis ajout de 300 ul agar à 2 %

Préparation des embouts (18 répétitions): 100 ul agar 1% + 25 ul échantillons + 75 ml agar 1% + dépôt 1 graine de cresson alenois (préalablement imbibée dans H<sub>2</sub>O pendant 2 heures) + 20 ul agar 1 % (stabilisation).

19 novembre:

Mesure des racines (prise en compte si ouverture de la graine)

### Résultats

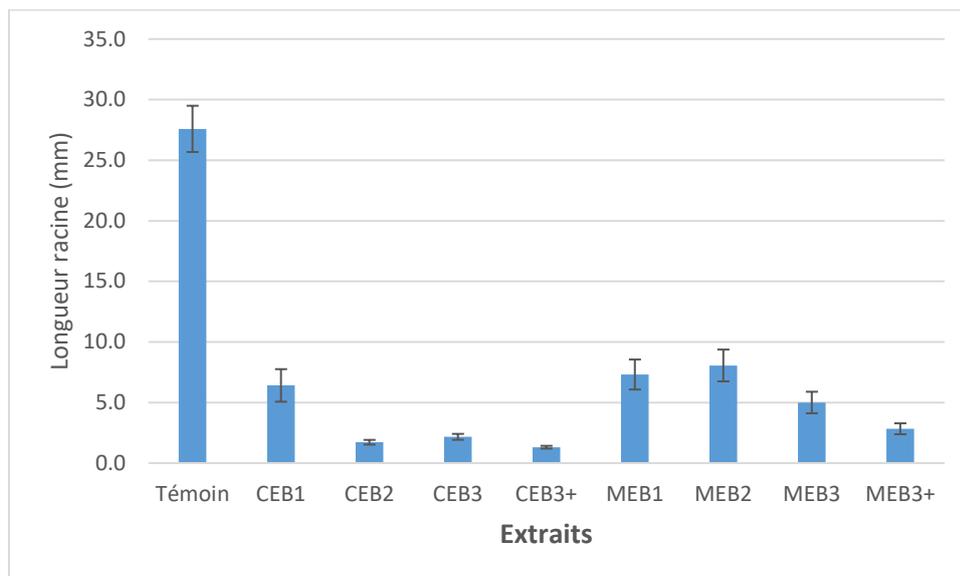
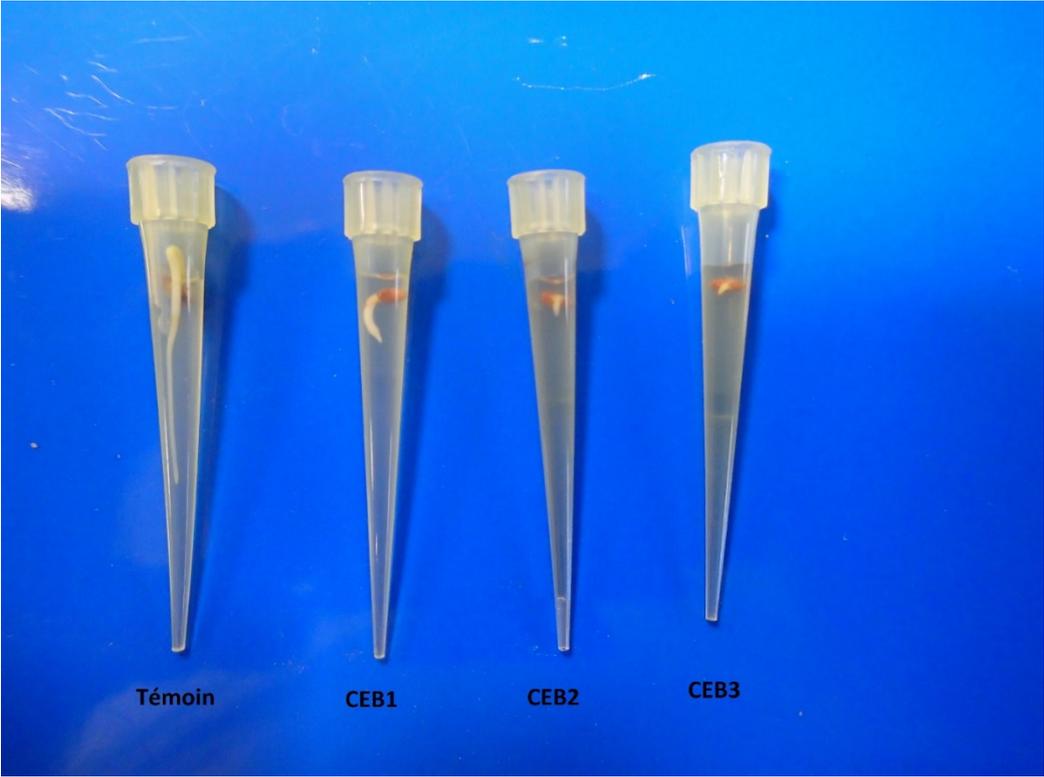


Figure 1: Effets, sur la croissance de racines de cresson alenois, de différents extraits (échantillons) de *Clinopodium vulgare* (CEB) et de *Medicago lupulina* (MEB). ( Moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne, n entre 16 et 18).

Remarques :

Difficulté de « dissolution » des extraits 1 et 2 lors de la préparation des échantillons, notamment pour *Clinopodium vulgare*.

Nicolas Delabays, 19 novembre 2018



## Test multi-puits sandwich sur silice, diverses espèces

**Plantes testées :** *Artemisia annua* (var. artemis), riche en artémisinine ( $\pm 1.17\%$  w/w)<sup>1</sup>, (= ARTAN (r))  
*Artemisia annua* (var. Göttingen), pauvre en artémisinine ( $\pm 0.05\%$  w/w), (= ARTAN (p))  
*Bromus tectorum*, stade végétatif (Lullier, 14.03.18), (= BROTE (v))  
*Clinopodium vulgare* (Anet bas, 10.07.18) (= CLIVU)  
*Medicago lupulina* (Lullier, 17.05.18) (= MEDLU)

### Protocole

#### 22 novembre:

Matériel végétal : feuilles (feuilles et tiges pour BROTE) sèches finement émietées.

Test sandwich sur silice:

- Mélange de 200 mg<sup>2</sup> de matériel végétal de chacun des 5 lots avec 40 g de sable silicieux ( $\geq 0.6$  mm)
- Répartition des mélanges entre 4 plaques multi-puits (= 4 blocs), 1 puit par plaque et par espèce (6<sup>ème</sup> puit = témoin sans matériel végétal)
- Ajout de 5g de de sable silicieux ( $\geq 0.6$  mm) dans chacun des 24 puits
- Ajout de 4.5 ml d'H<sub>2</sub>O dans chacun des 24 puits
- dépôt de 5 graines (par puit) de cresson alénois (préalablement imbibées dans H<sub>2</sub>O pendant 2 heures)

Plaques placées en conditions ambiantes (laboratoire)

#### 26 novembre:

Mesure de la longueur des racines (prise en compte à partir du dépassement du diamètre de la graine) et des hypocotyles.

---

<sup>1</sup> Les teneurs en artémisinine rapportées ici (1.17 % et 0.05 %) ont été déterminées en 2008 (Delabays *et al.*, 2008) sur le même matériel utilisé aujourd'hui. Selon des expériences antérieures (De Joffrey, comm. pers.), la teneur en artémisinine de matériel végétal correctement stocké est relativement stable, avec des pertes annuelles de l'ordre de 1 % seulement.

<sup>2</sup> Ce qui correspond à 2 fois moins de matériel végétal que pour l'essai NG7

## Résultats (germination et croissance des racines)

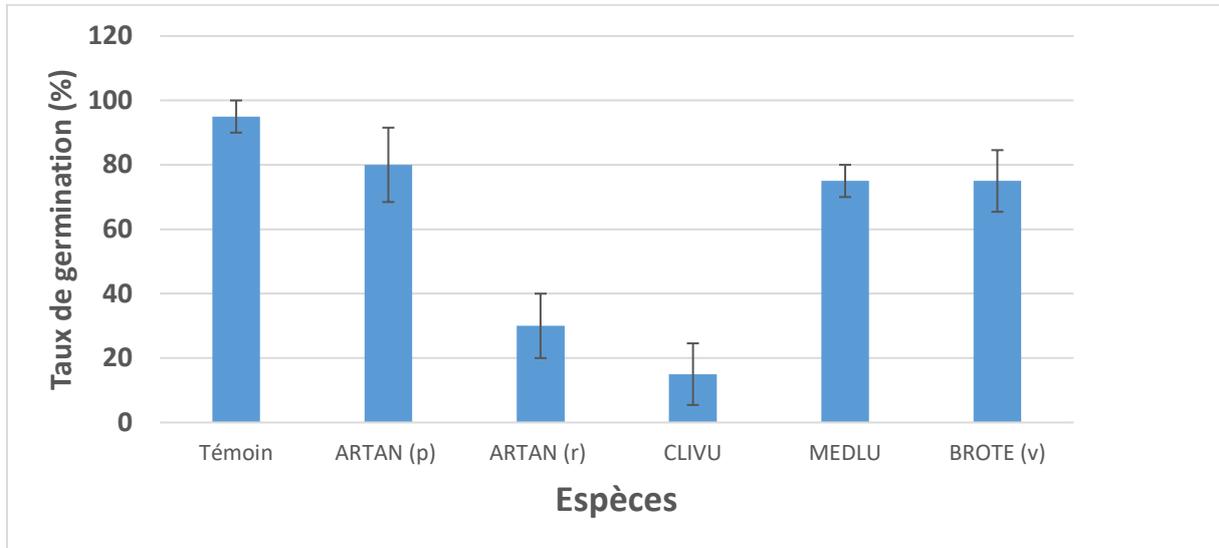


Fig 1 : Biotest substrat silice: effet, sur le taux de germination de graines de cresson, des feuilles sèches de 5 espèces (moyenne + SEM; n = 4)

(ARTAN: *Artemisia annua*, (p): pauvre en artemisine ( $\pm 0.05$  % w/w), (r): riche en artemisine ( $\pm 1.17$  % w/w); CLIVU : *Clinopodium vulgare*; MEDLU: *Medicago lupulina*; BROTE: *Bromus tectorum*, (v): stade végétatif)

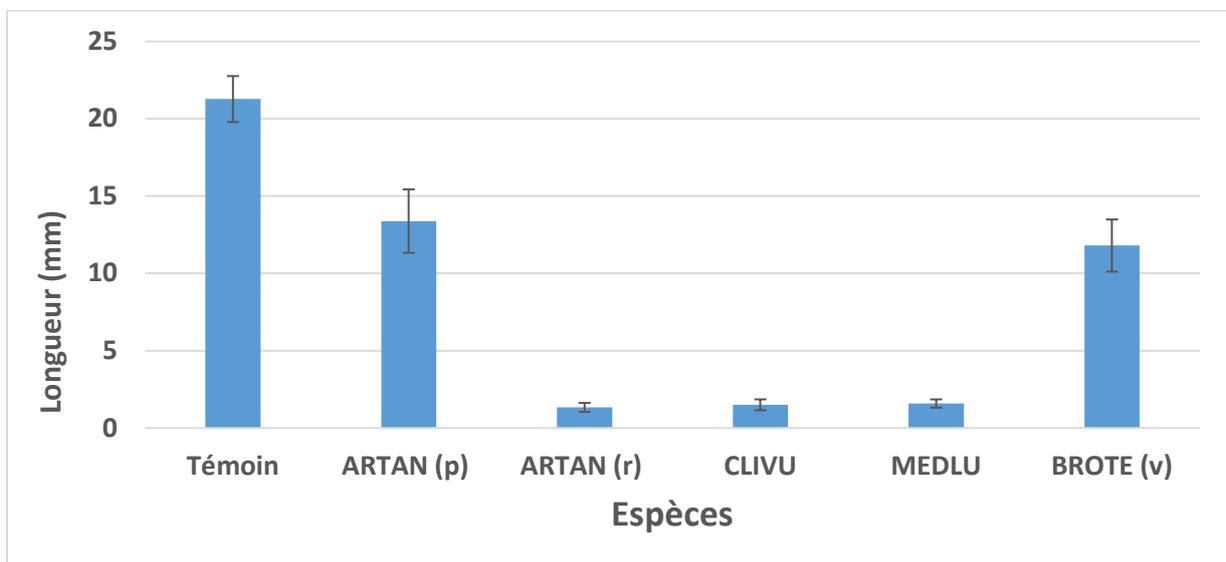


Fig 2: Biotest substrat silice: effet, sur la longueur des racines de cresson (graines germées uniquement<sup>3</sup>), des feuilles sèches de 5 espèces (moyenne + SEM; n = 4)

<sup>3</sup> Dans le rapport de l'essai NG7, la taille des racines des graines non germées avait été comptabilisée (à 0 mm) pour l'établissement de la moyenne.

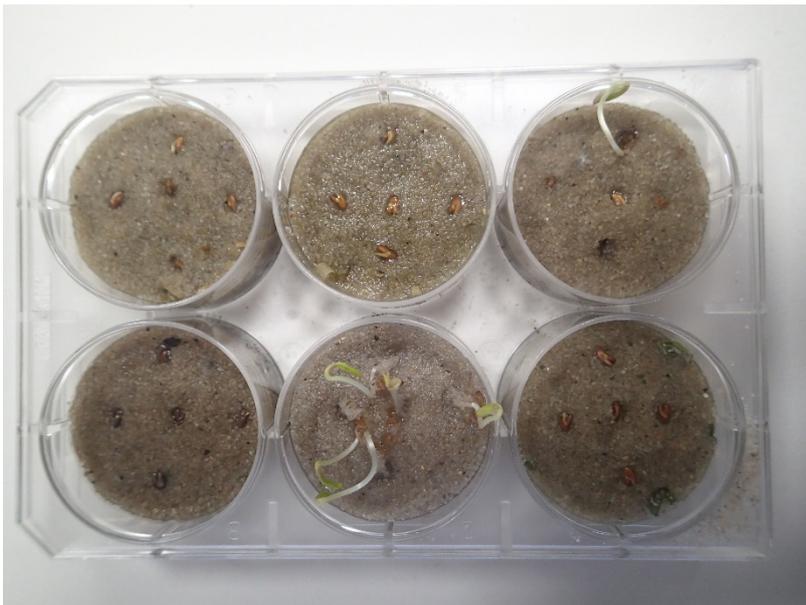
(ARTAN: *Artemisia annua*, (p): pauvre en artemisinine ( $\pm 0.05$  % w/w), (r): riche en artemisine ( $\pm 1.17$  % w/w); CLIVU: *Clinopodium vulgare*; MEDLU: *Medicago lupulina*; BROTE: *Bromus tectorum*, (v): stade végétatif)

Effet anti-germinatif confirmé pour CLIVU, par comparaison avec le témoin négatif<sup>4</sup> (ARTAN (p)); un effet comparable à celui du témoin positif (ARTAN (r))

Forte inhibition de la croissance des racines confirmée pour CLIVU et MEDLU, comparable a celle observée avec le témoin positif (ARTAN (r))

Pour BROTE (v), à 50 mg de feuilles sèches par puit, l'effet phytotoxique ne se distingue pas du témoin négatif (ARTAN (p)).

Nicolas Delabays, 27 novembre 2018



**Test multi-puits sandwich sur silice (= Biotest substrat silice) (NG7)**

---

<sup>4</sup> La variété d'*Artemisia annua* « Göttingen », considérée comme témoin « négatif », contient néanmoins une petite quantité d'artémisinine.

## Rapport essai: biotest NG 10 (19.02.2019 – 22.02.2019)

### Micro-biotest (embouts) sandwich, échantillons Habiba Davet du 25 janvier 2019

Extraits testés : *Clinopodium vulgare*, extraits CER1, CER2, CER2 et CER4, = extraits raffinés issus de CEB3

#### Protocole

19 février:

Echantillons: reprise des extraits dans 300 ul H<sub>2</sub>O, dispersion aux ultrasons, puis ajout de 300 ul agar à 2 %

Préparation des embouts (18 répétitions): 100 ul agar 1% + 25 ul échantillons + 75 ml agar 1% + dépôt 1 graine de cresson alenois (préalablement imbibée dans H<sub>2</sub>O pendant 2 heures) + 20 ul agar 1 % (stabilisation).

22 novembre:

Mesure des racines (prise en compte à partir d'une longueur supérieure au diamètre de la graines) et des hypocotyles (cotylédons sortis).

#### Résultats

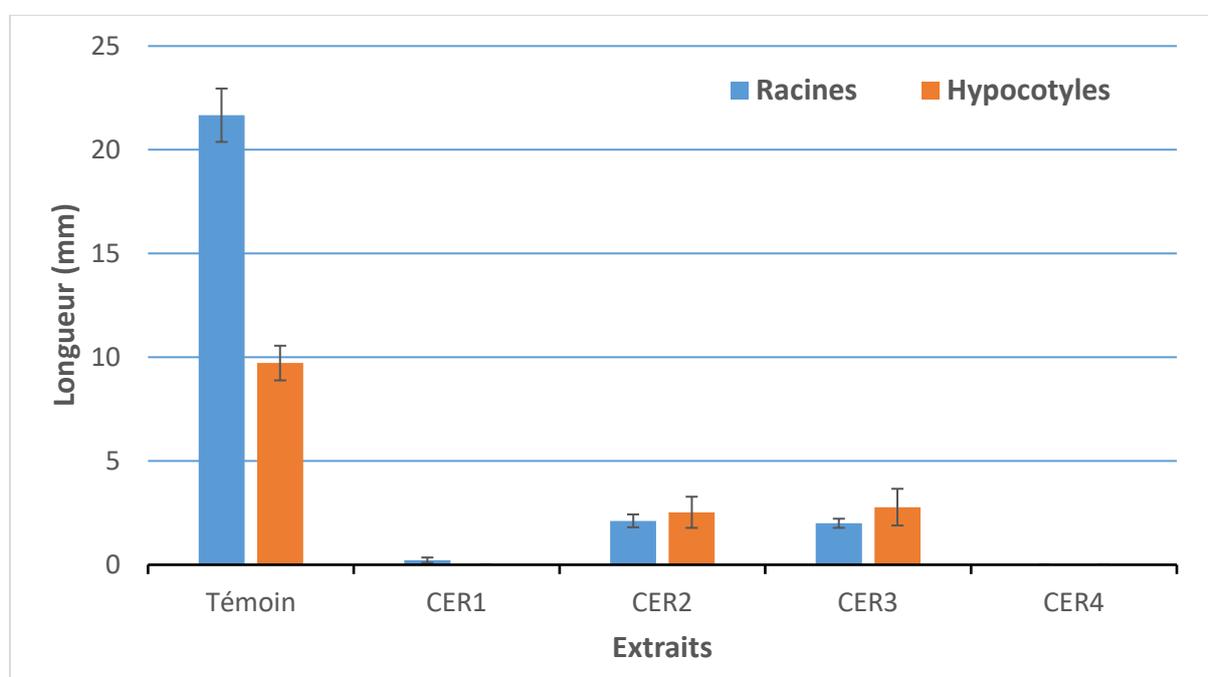


Figure 1: Effets, sur la croissance des racines et des hypocotyles de cresson alenois, de différents extraits (échantillons) de *Clinopodium vulgare* (CER) ( Moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne, n entre 17 et 18).

## Remarques

CER1: Toutes les semences se sont bien imbibées et ouvertes, mais, à 2 exceptions près, la croissance de la radicule est bloquée et ne dépasse pas le diamètre de la graine (longueur = 0 mm).

CER2: Toutes les semences se sont bien imbibées et ouvertes. Racines courtes et souvent très minces. Développement de l'hypocotyle sur la moitié des semences (9/17).

CER3: Toutes les semences se sont bien imbibées et ouvertes. Racines courtes et souvent très minces, et dans un cas, nécrosée. Développement de l'hypocotyle sur la moitié des semences (8/18).

CER4: Une légère rétractation de la couche supérieure d'agar est observée dans tous les embouts. Les graines sont peu ou pas gonflées (mauvaise imbibation), l'extrémité de la radicule pointe néanmoins parfois (7/18).

Nicolas Delabays, 22 février 2019



**Lot A :**

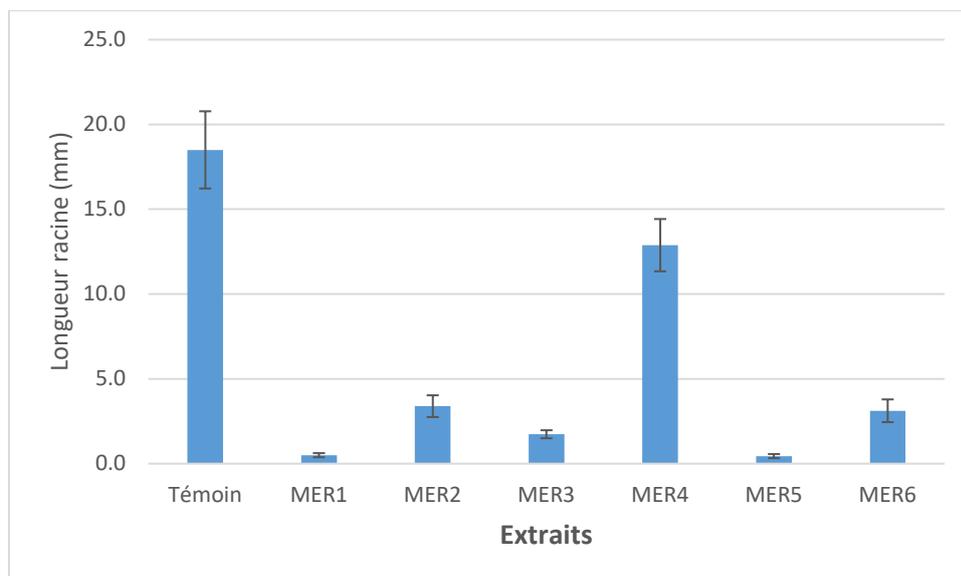


Figure 1: Effets, sur la croissance des racines et des hypocotyles de cresson alénois, de différents extraits (échantillons) de *Medicago lupulina* (MER) ( Moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne, n entre 17 et 18).

**Lot B :**

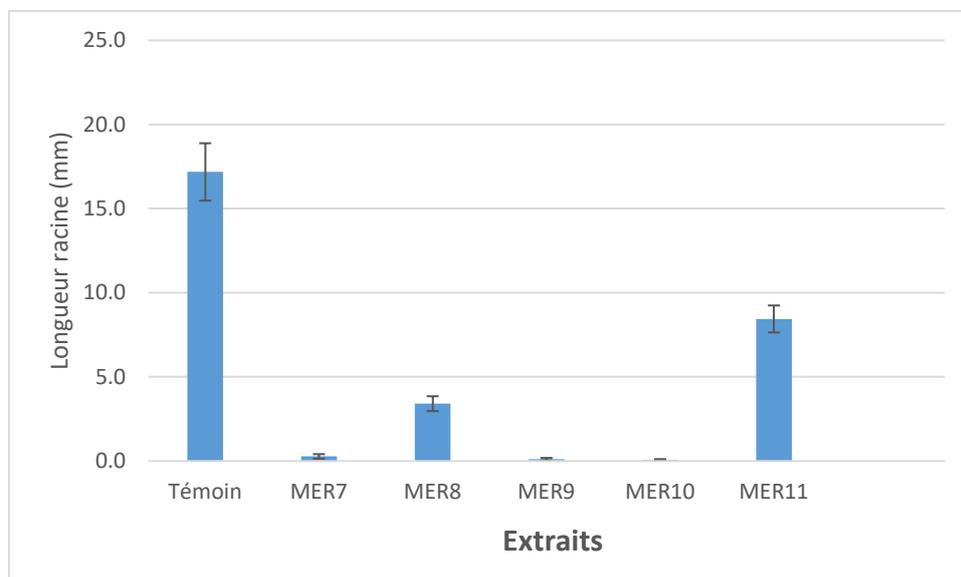


Figure 2: Effets, sur la croissance des racines de cresson alénois, de différents extraits (échantillons) de *Medicago lupulina* (MER) ( Moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne, n entre 17 et 18).

## Micro-biotest (embouts) sandwich, échantillons Habiba Davet du 15 mars 2019 (poste)

Extraits testés : *Clinopodium vulgare*, extraits (2 mg) CER1, CER5, CER6 et CER7

### Protocole

5 avril 2019:

Echantillons: reprise des extraits dans 300 ul H<sub>2</sub>O, dispersion aux ultrasons, puis ajout de 300 ul agar à 2 %

Préparation des embouts (18 répétitions): 80 ul agar 1% + 30 ul échantillons + 80 ml agar 1% + dépôt 1 graine de cresson alenois (préalablement imbibée dans H<sub>2</sub>O pendant 2 heures) + 20 ul agar 1 % (stabilisation).

Embouts répartis en ligne dans une boîte

8 avril 2019:

Mesure des racines (prise en compte à partir d'une longueur supérieure au diamètre de la graines).

### Résultats

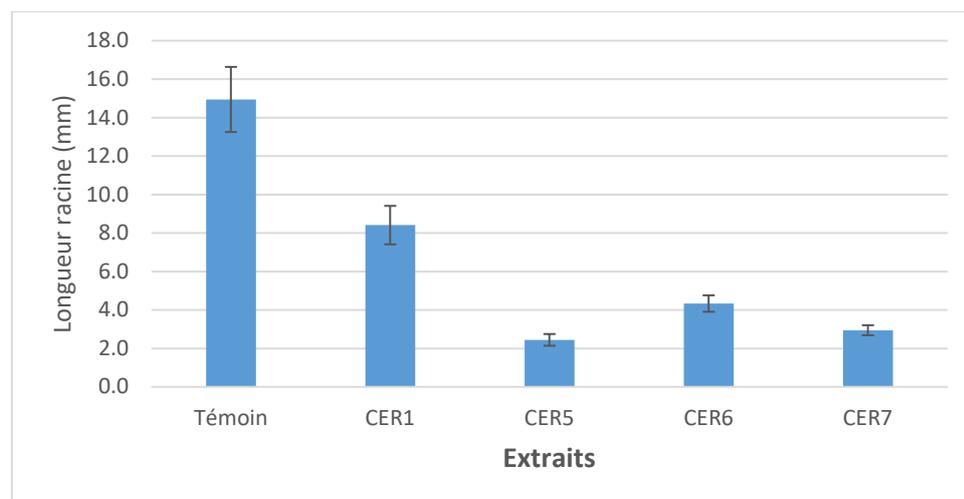


Figure 1: Effets, sur la croissance des racines de cresson alenois, de différents extraits (échantillons) de *Clinopodium vulgare* (CER) ( Moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne, n entre 17 et 18).

### Remarques

Inhibitions les plus fortes avec CER5, CER6 et CER7

CER5: brunissement des radicelles, ces dernières souvent recourbée

CER6 : léger brunissement des radicelles

CER7 : brunissement des radicelles

Nicolas Delabays, 8 avril 2019

## Micro-biotest (embouts) sandwich, échantillons Habiba Davet du 19 juin 2019 (poste)

Extraits testés : MER1 à MER7, CER2 (entre 1,8 et 2,5 mg)

26 juin 2019:

Echantillons: reprise des extraits dans 300 ul H<sub>2</sub>O, dispersion aux ultrasons, puis ajout de 300 ul agar à 2 %

Préparation des embouts (18 répétitions): 100 ul agar 1% + 30 ul échantillons + 90 ml agar 1% + dépôt (avec léger enfoncement) 1 graine de cresson alenois (préalablement imbibée dans H<sub>2</sub>O pendant 2 heures).

Embouts répartis en ligne dans une boîte

30 juin 2019:

Mesure des racines (prise en compte à partir d'une longueur supérieure au diamètre de la graines).

### Résultats

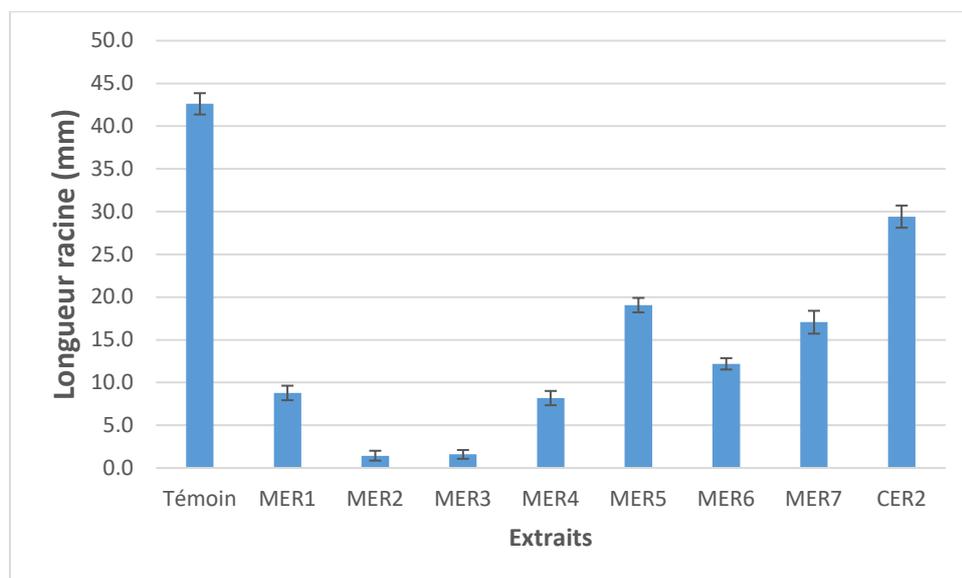


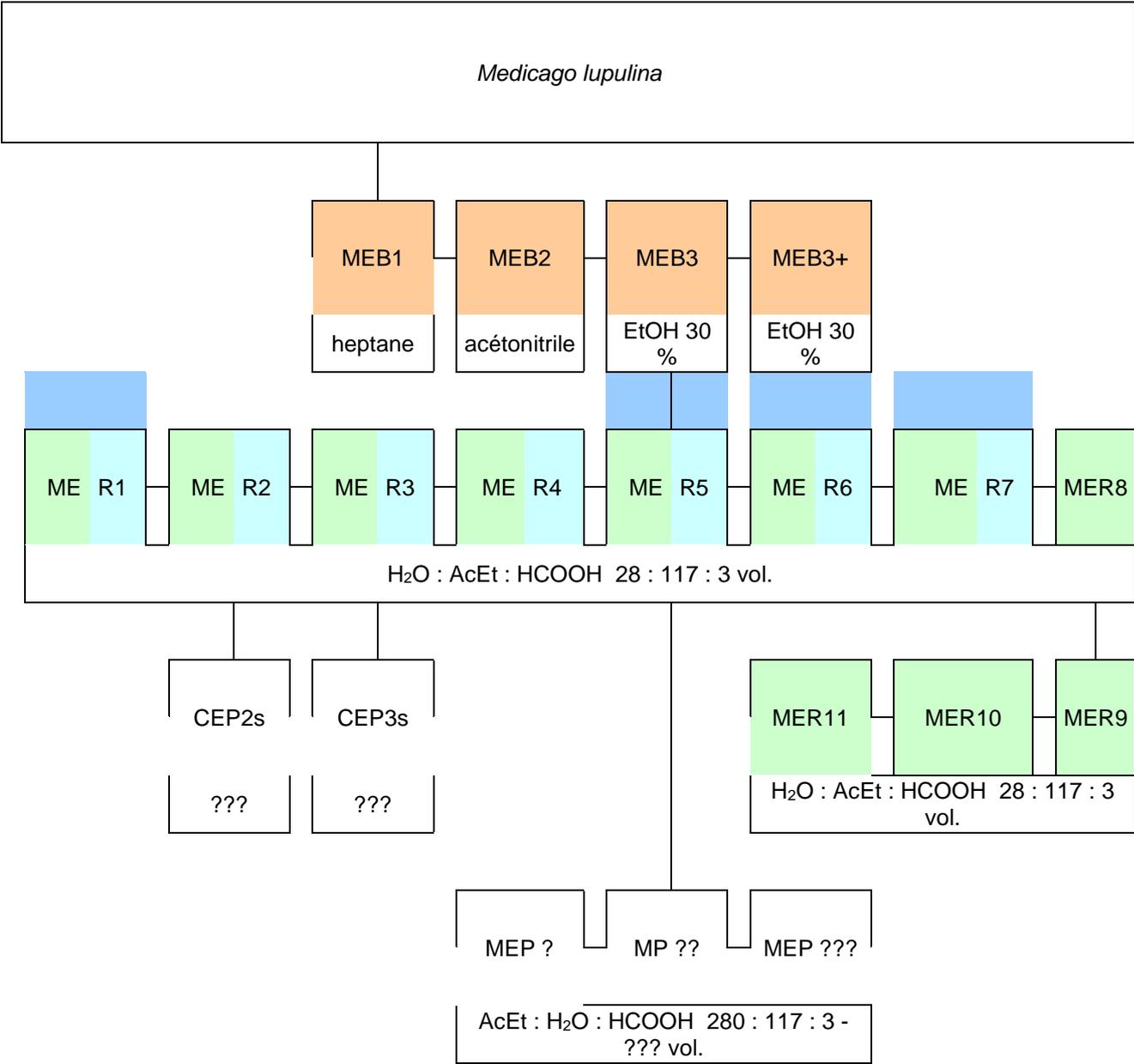
Figure 1: Effets, sur la croissance des racines de cresson alenois, de différents extraits (échantillons) (MER et CER) (Moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne, n entre 16 et 18).

### Remarques

Très fortes inhibitions avec MER 2 et MER 3. Aucun hypocotyle développé avec MER2

Nicolas Delabays, 2 juillet 2019

Procédure d'extraction



NG15  
2.07.19

## Micro-biotest (embouts) sandwich, échantillons Loïc (+ luteoline) du 16 juillet 2019 (poste)

Extraits testés : EP1, EP2, EP3, EP4 et EP5; luteoline

22 juillet 2019:

Echantillons: reprise des extraits dans 300 ul H<sub>2</sub>O, dispersion aux ultrasons, puis ajout de 300 ul agar à 2 %

Préparation des embouts (18 répétitions): 100 ul agar 1% + 30 ul échantillons + 90 ml agar 1% + dépôt (avec léger enfoncement) 1 graine de cresson alenois (préalablement imbibée dans H<sub>2</sub>O pendant 2 heures).

Embouts répartis en ligne dans une boîte

27 juillet 2019:

Mesure des racines (prise en compte à partir d'une longueur supérieure au diamètre de la graine).

### Résultats

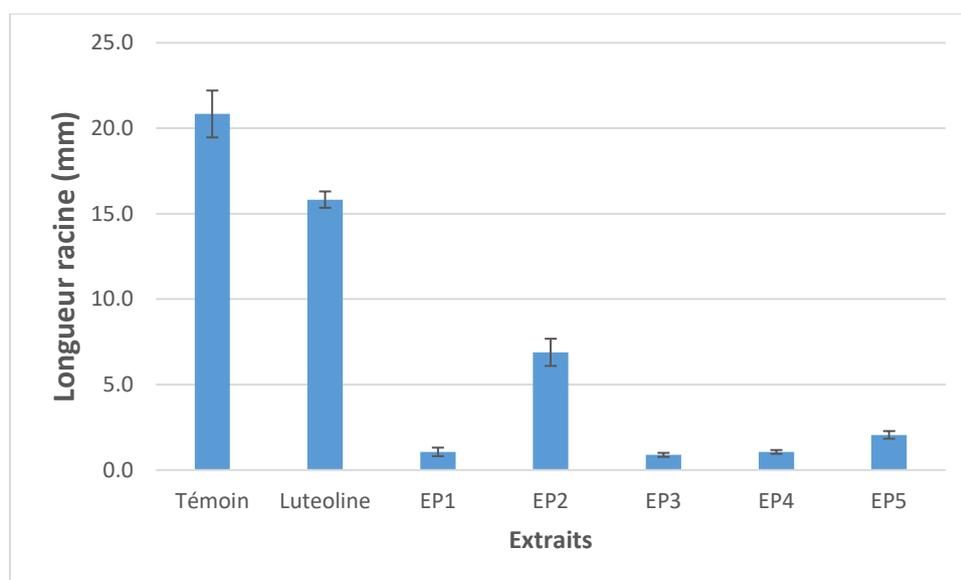


Figure 1: Effets, sur la croissance des racines de cresson alenois, de différents extraits (EP) et de lutéoline pure ( Moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne, n entre 16 et 18).

### Remarques

Faible effet inhibiteur de la lutéoline.

Très forte inhibition avec EP1, EP3, EP4 et EP5. Pratiquement aucune pénétration de la radicelle dans le substrat avec EP1, EP2 et EP4. Légère pénétration avec EP5, mais blocage rapide (1 mm) et brunissement.

Nicolas Delabays, 25 juillet 2019

**Biotest terre végétale multipuits (BTVM), *Bromus tectorum*, *Clinopodium vulgare*, *Medicago lupulina*, en deux concentrations.**

**Espèces:** *Bromus tectorum*, *Clinopodium vulgare*, *Medicago lupulina*

**Témoin :** terre seule

**Traitement :** concentrations

|    |             |                       |
|----|-------------|-----------------------|
| C2 | 0.55g/100ml | 57.3 g/m <sup>2</sup> |
| C3 | 0.11g/100ml | 11.4 g/m <sup>2</sup> |

7 octobre 2019 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type sable de quartz lavé) à une concentration de ¼ (sable/TV).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons sont mélangés au substrat aux deux concentrations citées ci-dessus. Le mélange est réparti dans les puits à raison de 10ml/puits. Les puits sont humectés avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.3ml d'eau).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/puits) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées dans de l'eau.

Les boîtes multipuits sont placées avec leur couvercle sur une paille du laboratoire devant une fenêtre.

10 octobre 2019 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicelle). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

**Résultats**

|        | BROTE |     | CLINOVU |     |
|--------|-------|-----|---------|-----|
|        | C2    | C3  | C2      | C3  |
| % germ | 80%   | 95% | 100%    | 95% |
|        | MEDLU |     | Témoin  |     |
|        | C2    | C3  | C2      | C3  |
| % germ | 70%   | 95% | 100%    | 95% |

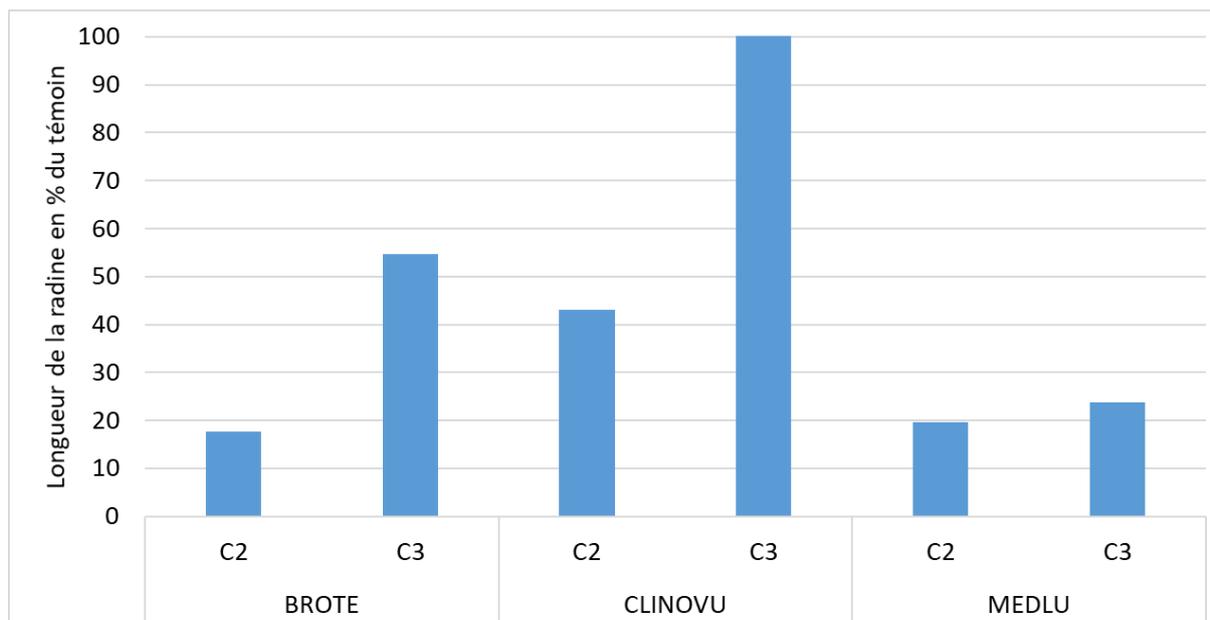


Figure 1 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de *Bromus tectorum*, *Clinopodium vulgare* et *Medicago lupulina* en deux concentrations différentes, sur la longueur des racines de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne; n=4). Concentration : C2 = 0.55g/100ml de substrat, C3 = 0.11g/100ml. Témoins : substrat seul.

### Remarques

- trop peu de données pour faire un écart-type.
- *Medicago lupulina* semble avoir les propriétés allélopathiques les plus fortes. *Clinopodium vulgare* commence à avoir un effet à partir de C2 (env. 50 g par m<sup>2</sup>).
- les effets allélopathiques de *Bromus tectorum* diminuent fortement entre C2 et C3

Annabelle Berthet, 10 octobre 2019

**Biotest terre végétale multipuits (BTVM), *Bromus tectorum*, *Clinopodium vulgare*, *Medicago lupulina*, en trois concentrations.**

**Espèces:** *Bromus tectorum*, *Clinopodium vulgare*, *Medicago lupulina*

**Témoin :** terre seule

**Traitement :** concentrations

|    |              |                       |
|----|--------------|-----------------------|
| C2 | 0.55g/100ml  | 57.3 g/m <sup>2</sup> |
| C3 | 0.11g/100ml  | 11.4 g/m <sup>2</sup> |
| C4 | 0.055g/100ml | 5.7 g/m <sup>2</sup>  |

10 octobre 2019 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type sable de quartz lavé) à une concentration de ¼ (sable/TV).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons sont mélangés au substrat aux trois concentrations citées ci-dessus. Le mélange est réparti dans les puits à raison de 10ml/puits. Les puits sont humectés avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.3ml d'eau).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/puits) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement pré-germées dans de l'eau.

Les boîtes multipuits sont placées avec leur couvercle sur une paille du laboratoire devant une fenêtre.

14 octobre 2019 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicelle). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

**Résultats**

|        | BROTE |      |      | CLINOVU |     |      |
|--------|-------|------|------|---------|-----|------|
|        | C2    | C3   | C4   | C3      | C4  |      |
| % germ | 88%   | 100% | 100% | 92%     | 96% |      |
|        | MEDLU |      |      | Témoin  |     |      |
|        | C2    | C3   | C4   | C2      | C3  | C4   |
| % germ | 96%   | 96%  | 100% | 100%    | 96% | 100% |

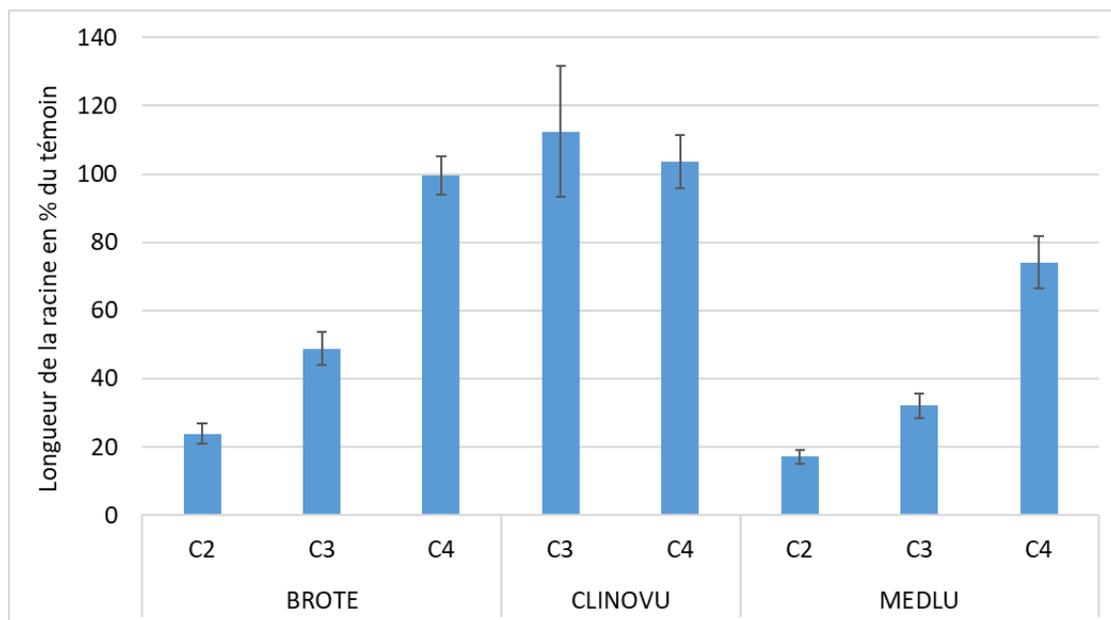


Figure 1 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de *Bromus tectorum*, *Clinopodium vulgare* et *Medicago lupulina* en trois concentrations différentes, sur la longueur des racines de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne ± ESM; n=5). Concentration : C2 = 0.55g/100ml de substrat, C3 = 0.11g/100ml, C4 = 0.055g/100ml. Témoins : substrat seul.

### Remarques

- S'il n'y a pas de concentration C2 pour *Clinopodium*, c'est parce que je n'avais plus assez de matériel végétal.
- La concentration C4 semble trop faible pour ces biotests de screening.
- La concentration C2 peut être baissée pour trouver une quantité au mètre carré plus réaliste pour ce genre de plantes.
- Pour *Clinopodium*, il semble de pas y avoir d'effet allélopathique à ces concentrations.

Annabelle Berthet, 14 octobre 2019

**Biotest terre végétale multipuits (BTVM), *Bromus tectorum*, *Prunella vulgaris*, *Lotus corniculatus*, en deux concentrations.**

**Espèces:** *Bromus tectorum*, *Prunella vulgaris*, *Lotus corniculatus*

**Témoin :** terre seule

**Traitement :** concentrations

|    |             |                       |
|----|-------------|-----------------------|
| C2 | 0.55g/100ml | 57.3 g/m <sup>2</sup> |
| C5 | 0.2g/100ml  | 21 g/m <sup>2</sup>   |

14 octobre 2019 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type sable de quartz lavé) à une concentration de ¼ (sable/TV).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons sont mélangés au substrat aux deux concentrations citées ci-dessus. Le mélange est réparti dans les puits à raison de 10ml/puits. Les puits sont humectés avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.3ml d'eau).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/puits) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées dans de l'eau.

Les boîtes multipuits sont placées avec leur couvercle sur une paille du laboratoire devant une fenêtre.

17 octobre 2019 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicelle). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

**Résultats**

|        | BROTE  |      | PRUNVU |      |
|--------|--------|------|--------|------|
|        | C2     | C5   | C2     | C5   |
| % germ | 80%    | 100% | 88%    | 100% |
|        | LOTGOR |      | Témoin |      |
|        | C2     | C5   | C2     | C5   |
| % germ | 88%    | 92%  | 100%   | 100% |

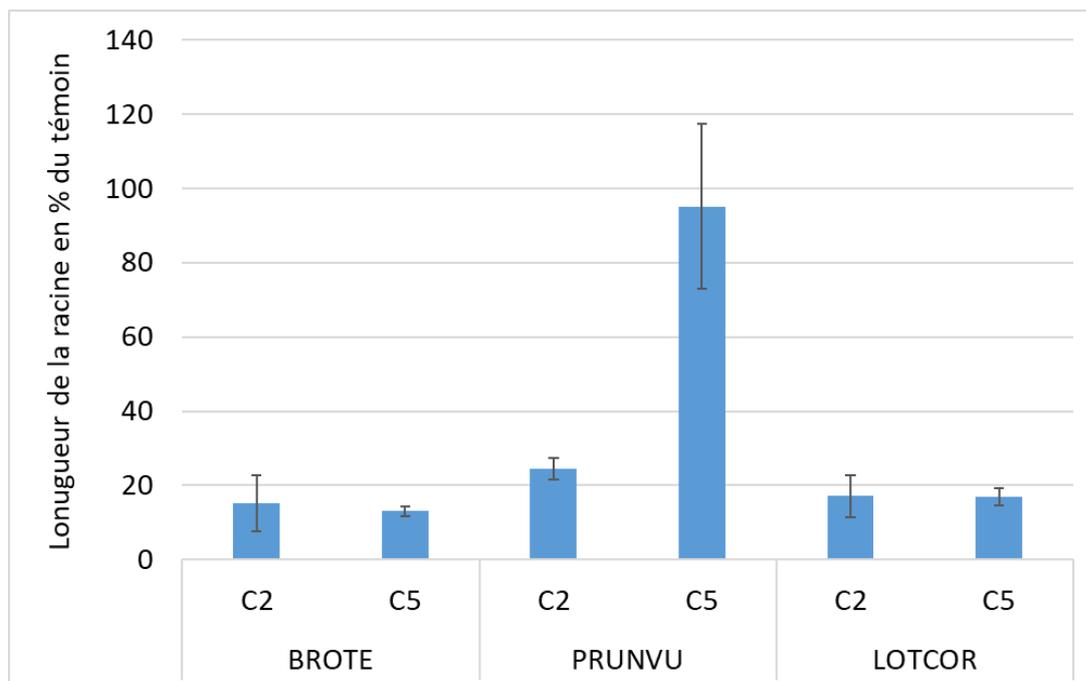


Figure 1 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de *Bromus tectorum*, *Prunella vulgaris* et *Lotus corniculatus* en deux concentrations différentes, sur la longueur des racines de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne ± ESM; n=5). Concentration : C2 = 0.55g/100ml de substrat, C5 = 0.2g/100ml. Témoins : substrat seul.

### Remarques

- avec la concentration C2, il semble qu'il y ait toujours un effet, mais c'est peut-être également dû à la forte présence de matière végétale. De plus ce n'est pas une concentration très réaliste pour ces plantes.
- la concentration C5 permet d'avoir un témoin négatif (*Prunella vulgaris*) tout en détectant les potentielles propriétés allélopathiques de *Bromus* et de *Lotus*.

Annabelle Berthet, 17 octobre 2019

## Biotest terre végétale multipuits (BTVM), *Bromus tectorum*, *Prunella vulgaris*, *Lotus corniculatus*

Espèces: *Bromus tectorum*, *Prunella vulgaris*, *Lotus corniculatus*

Témoin : terre seule

21 octobre 2019 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type sable de quartz lavé) à une concentration de ¼ (sable/TV).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons sont mélangés au substrat à une concentration de 0.2g/100ml de terre végétale (21g/m<sup>2</sup>). Le mélange est réparti dans les puits à raison de 10ml/puits. Les puits sont humectés avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.3ml d'eau).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/puits) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 18h dans de l'eau.

Les boîtes multipuits sont placées avec leur couvercle sur une paille du laboratoire devant une fenêtre.

24 octobre 2019 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicelle). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

### Résultats

|        | <i>Bromus tectorum</i> | <i>Prunella vulgaris</i> | <i>Lotus corniculatus</i> | Témoin |
|--------|------------------------|--------------------------|---------------------------|--------|
| % germ | 100%                   | 98%                      | 96%                       | 98%    |

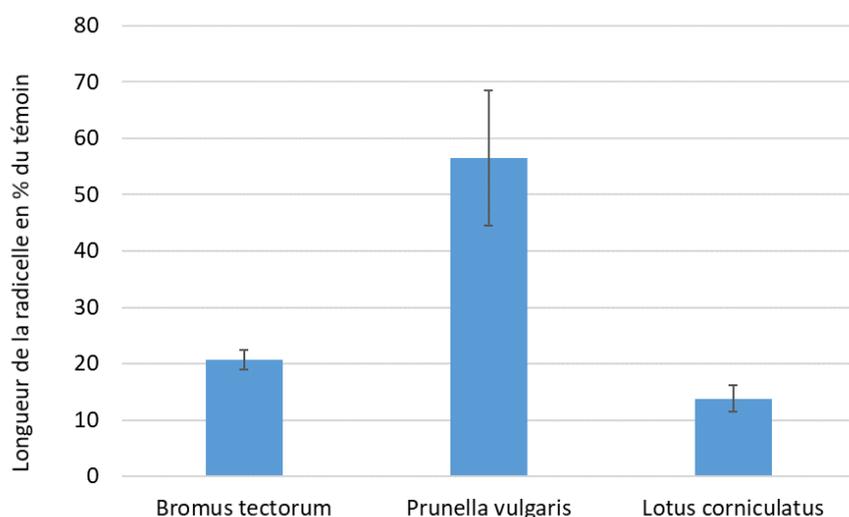


Figure 1 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de *Bromus tectorum*, *Prunella vulgaris*, *Lotus corniculatus* sur la longueur des racelles de cresson

alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne  $\pm$  ESM; n=10). Concentration : 0.2g MV/100ml de substrat.  
Témoins : substrat seul.

### **Remarques**

- ces résultats font penser que *Prunella vulgaris* a peu de propriété allélopathiques, alors que *Bromus tectorum* et *Lotus corniculatus* réduisent à 80% ou plus la croissance des racines de cresson.

Annabelle Berthet, 24 octobre 2019

## Biotest terre végétale multipuits (BTVM), 3 écotypes de *Prunella vulgaris* (écotypes sélection avec OHS en 2018 ?)

Ecotypes: *Prunella vulgaris* S3, S10, S11

Témoin : terre seule

28 octobre 2019 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type sable de quartz lavé) à une concentration de ¼ (sable/TV).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons sont mélangés au substrat à une concentration de 0.2g/100ml de terre végétale (21g/m<sup>2</sup>). Le mélange est réparti dans les puits à raison de 10ml/puits. Les puits sont humectés avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.3ml d'eau).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/puits) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 6h dans de l'eau.

Les boîtes multipuits sont placées avec leur couvercle sur une paille du laboratoire devant une fenêtre.

31 octobre 2019 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicelle). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

### Résultats

|        | PRUNVU S3 | PRUNVU S10 | PRUNVU S11 | Témoin |
|--------|-----------|------------|------------|--------|
| % germ | 98%       | 98%        | 100%       | 100%   |

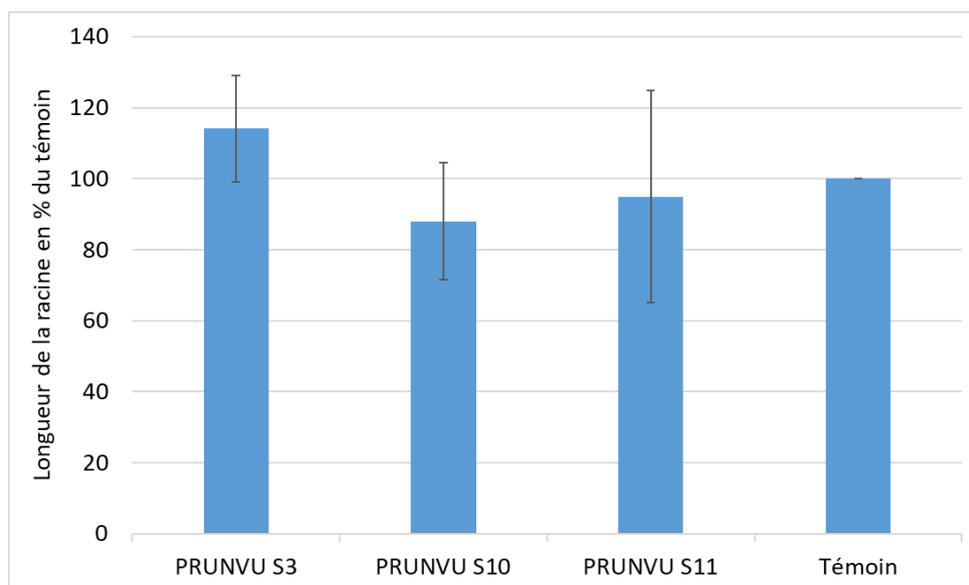


Figure 1 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de trois écotypes de *Prunella vulgaris* sur la longueur des racines de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne  $\pm$  ESM; n=10). Concentration : 0.2g MV/100ml de substrat. Ecotypes : *Prunella vulgaris* S3, S10, S11. Témoins : substrat seul.

### Remarques

- Très bonne piste pour être un témoin négatif.

Annabelle Berthet, 31 octobre 2019

## Biotest terre végétale multipuits (BTVM), 3 écotypes de *Lotus corniculatus* (écotypes sélection avec OHS en 2018 ?)

Ecotypes: *Lotus corniculatus* S13, S15, S16

Témoin : terre seule

2 décembre 2019 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type sable de quartz lavé) à une concentration de ¼ (sable/TV).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons sont mélangés au substrat à une concentration de 0.2g/100ml de terre végétale (21g/m<sup>2</sup>). Le mélange est réparti dans les puits à raison de 10ml/puits. Les puits sont humectés avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.3ml d'eau).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/puits) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 6h dans de l'eau.

Les boîtes multipuits sont placées avec leur couvercle sur une paille de laboratoire devant une fenêtre.

5 décembre 2019 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicelle). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

### Résultats

|        | S13 | S15 | S16 | Témoin |
|--------|-----|-----|-----|--------|
| % germ | 96% | 84% | 92% | 98%    |

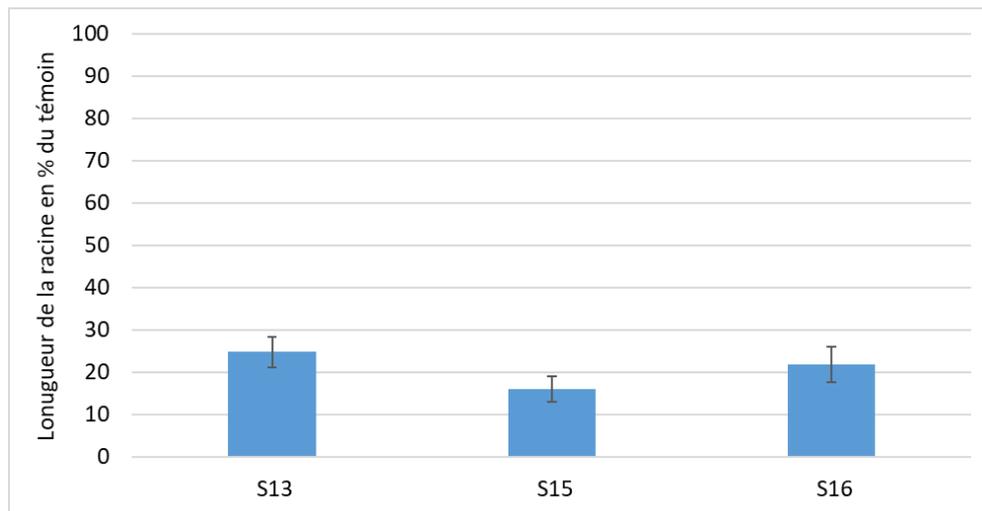


Figure 1 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de trois écotypes de *Lotus corniculatus* sur la longueur des radicules de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne ± ESM; n=10). Concentration : 0.2g MV/100ml de substrat. Ecotypes : *Lotus corniculatus* S13, S15 et S16. Témoins : substrat seul.

## **Remarques**

- bonne efficacité mais ces résultats ne montrent pas de différence statistiquement significative entre les différents écotypes.

Annabelle Berthet, 5 décembre 2019

**Biotest terre végétale multipuits (BTVM), sur *Bromus tectorum* et *Lotus corniculatus*, comparaison entre les échantillons selon le protocole classique et les échantillons broyés à l'azote liquide.**

**Espèces : *Bromus tectorum* et *Lotus corniculatus***

**Traitement : passage des échantillons à l'azote liquide**

**Témoins : terre seule**

5 décembre 2019 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type sable de quartz lavé) à une concentration de ¼ (sable/TV).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Une partie des échantillons sont encore broyé à l'azote liquide. Les échantillons sont mélangés au substrat à une concentration de 0.2g/100ml de terre végétale (21g/m<sup>2</sup>). Le mélange est réparti dans les puits à raison de 10ml/puits. Les puits sont humectés avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.3ml d'eau).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/puits) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 18h dans de l'eau.

Les boîtes multipuits sont placées avec leur couvercle sur une paille du laboratoire devant une fenêtre.

9 décembre 2019 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicelle). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

**Résultats**

|        | BROTE | BROTE-N | LOTCOR | LOTCOR-N | Témoin |
|--------|-------|---------|--------|----------|--------|
| % germ | 92%   | 100%    | 98%    | 98%      | 100%   |

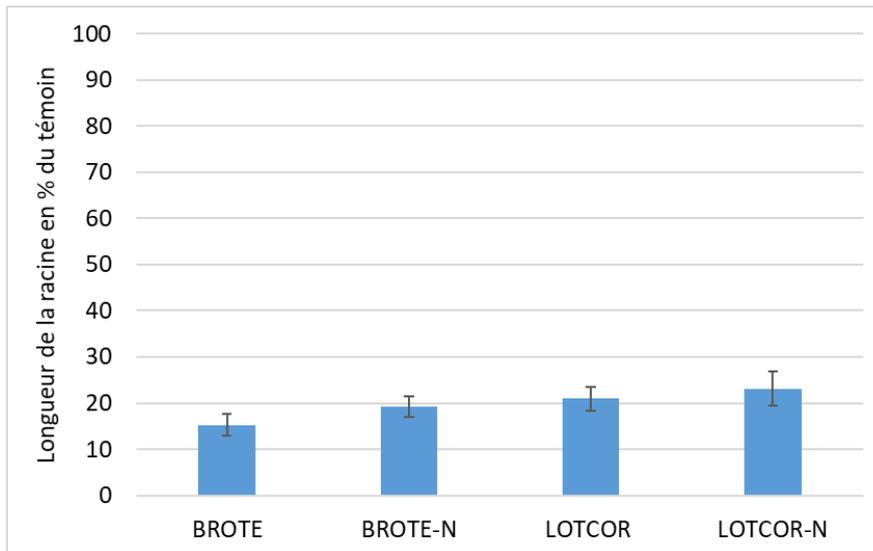


Figure 1 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de *Bromus tectorum* et de *Lotus corniculatus*, dont la moitié de chaque échantillon est broyée à l'azote liquide, sur la longueur des racines de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne  $\pm$  ESM; n=10). Concentration : 0.2g MV/100ml de substrat. Traitement : *Bromus tectorum* broyage classique (BROTE), *Bromus tectorum* broyé à l'azote liquide (BROTE-N), *Lotus corniculatus* broyage classique (LOTCOR), *Lotus corniculatus* broyé à l'azote liquide (LOTCOR-N). Témoins : substrat seul.

### Remarques

- Il semblerait que le broyage à l'azote liquide augmente pour les deux espèces l'effet allélopathique. Mais ces différences ne sont pas statistiquement significatives au seuil de 5% (test T à 2 échantillons sur les données transformées en log). Cette légère augmentation peut être expliquée soit par l'hypothèse que le broyage est plus fin avec l'azote liquide, ce qui augmente la surface et donc l'intensité de libération de molécules allélopathiques. Une autre hypothèse moins probable, est que l'augmentation de l'efficacité provient de la désinfection découlant du passage au froid à travers l'azote liquide.

Annabelle Berthet, 9 décembre 2019

**Biotest terre végétale multipuits (BTVM), deux écotypes de *Clinopodium vulgare* et un écotype de *Prunella vulgaris***

**Espèces et écotypes testés : *Prunella vulgaris* G1, *Clinopodium vulgare* D1, *Clinopodium vulgare* D8**

**Témoins : terre seule**

12 décembre 2019 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type bac à sable MBrico) à une concentration de ¼ (sable/TV).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons triés sont mélangés au substrat à une concentration de 0.2g/100ml de terre végétale (21g/m<sup>2</sup>). Le mélange est réparti dans les puits à raison de 10ml/puits. Les puits sont humectés avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.3ml d'eau).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/puits) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 18h dans de l'eau.

Les boîtes multipuits sont placées avec leur couvercle sur une pailleuse du laboratoire devant une fenêtre.

16 décembre 2019 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicule). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

**Résultats**

|        | CLINOVU D1 | CLINOVU D8 | PRUNVU G1 | Témoin |
|--------|------------|------------|-----------|--------|
| % germ | 100%       | 92%        | 98%       | 100%   |

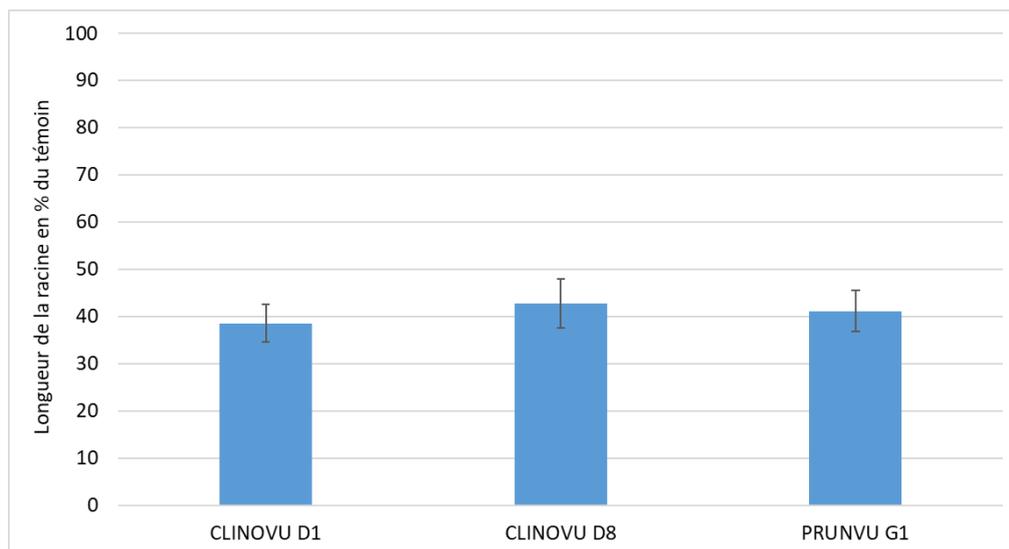


Figure 1 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de deux écotypes de *Clinopodium vulgare* et d'un écotype de *Prunella vulgaris*, sur la longueur des racines de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne ± ESM; n=10). Concentration : 0.2g MV/100ml de substrat. Ecotypes : *Clinopodium vulgare* CLINOVU D1 et CLINOVU D8, *Prunella vulgaris* PRUNVU G1. Témoins : substrat seul.

### Remarques

- Ces résultats ne montrent pas de différence entre les propriétés allélopathiques de ces différents écotypes et espèces.

Annabelle Berthet, 17 décembre 2019

## Biotest terre végétale multipuits (BTVM), *Medicago lupulina*, écotypes (Changins) OHS

Écotypes testés : *Medicago lupulina* 41-OHS, Sta-OHS, 22-OHS

Témoins : terre seule

16 décembre 2019 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type bac à sable MBrico) à une concentration de ¼ (sable/TV).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons triés sont mélangés au substrat à une concentration de 0.2g/100ml de terre végétale (21g/m<sup>2</sup>). Le mélange est réparti dans les puits à raison de 10ml/puits. Les puits sont humectés avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.3ml d'eau).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/puits) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 24h dans de l'eau.

Les boîtes multipuits sont placées avec leur couvercle sur une paille du laboratoire devant une fenêtre.

19 décembre 2019 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicelle). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

### Résultats

|         | 41-OHS | Sta-OHS | 22-OHS | Témoin |
|---------|--------|---------|--------|--------|
| % germ. | 86%    | 92%     | 98%    | 94%    |

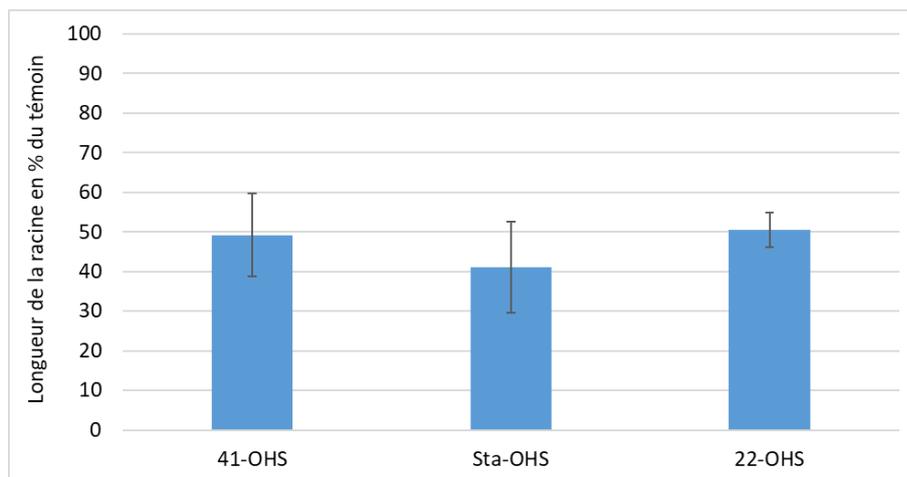


Figure 1 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de *Medicago lupulina* provenant de trois mélanges élaborés par OHS, sur la longueur des radicelles de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne ± ESM; n=10). Concentration : 0.2g MV/100ml de substrat. Mélanges : 41-OHS, Sta-OHS, 22-OHS. Témoins : substrat seul.

## **Remarques**

- Ces résultats ne montrent pas de différences notable entre l'effet allélopathique de Medicago lupulina de ces trois mélanges.

Annabelle Berthet, 19 décembre 2019

## Biotest terre végétale multipuits (BTVM), écotypes (ISA) *Medicago lupulina*

Écotypes testés : *Medicago lupulina* A1, B4, C9, D13, E15, F17, G18, H20 (ISA)

Témoins : terre seule

30 janvier 2020 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type bac à sable MBrico) à une concentration de ¼ (sable/TV).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons triés sont mélangés au substrat à une concentration de 0.2g/100ml de terre végétale (21g/m<sup>2</sup>). Le mélange est réparti dans les puits à raison de 10ml/puits. Les puits sont humectés avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.3ml d'eau).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/puits) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 24h dans de l'eau.

Les boîtes multipuits sont placées avec leur couvercle sur une pailasse du laboratoire devant une fenêtre.

3 février 2020 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicelle). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

### Résultats

|        | D13 | B4  | F17  | G18 | E15 | H20 | A1  | C9   | Témoin |
|--------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|--------|
| % germ | 96% | 98% | 100% | 98% | 98% | 98% | 98% | 100% | 100%   |

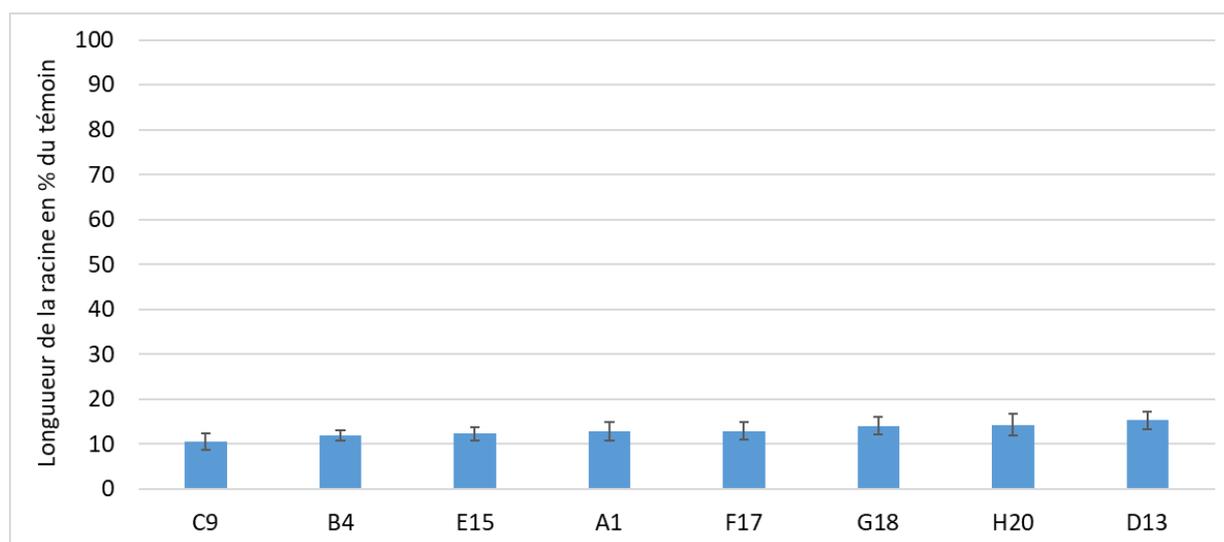


Figure 1 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de 8 écotypes de *Medicago lupulina*, sur la longueur des radicelles de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne ± ESM; n=10). Concentration : 0.2g MV/100ml de substrat. Ecotypes : A1, B4, C9, D13, E15, F17, G18, H20. Témoins : substrat seul (Témoin).

## Remarques

- Ces écotypes semble montrer de fortes propriétés allélopathiques.
- L'analyse statistique (ANOVA et comparaison de Fisher sur les données transformées par log) montre une différence statistiquement significative à 5% entre l'écotype C9 et D13.

| Comparaisons deux à deux de Fisher              |    |          |            |
|---|----|----------|------------|
| Informations de groupement avec la méthode de l |    |          |            |
| Indices   | N  | Moyenne  | Groupement |
| D13   | 10 | 1.1815 A |            |
| G18   | 10 | 1.1472 A | B          |
| H20   | 10 | 1.1467 A | B          |
| F17   | 10 | 1.1123 A | B          |
| A1  | 10 | 1.1045 A | B          |
| E15   | 10 | 1.1018 A | B          |
| B4  | 10 | 1.0938 A | B          |
| C9  | 10 | 1.0207   | B          |

*Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.*

Annabelle Berthet, 4 février 2020

## Biotest terre végétale multipuits (BTVM), écotypes (ISA) *Medicago lupulina*

Écotypes testés : *Medicago lupulina* A1, B4, C9, D13, E15, F17, G18, H20 (ISA)

Témoins : terre seule

6 février 2020 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type bac à sable MBrico) à une concentration de ¼ (sable/TV).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons triés sont mélangés au substrat à une concentration de 0.2g/100ml de terre végétale (21g/m<sup>2</sup>). Le mélange est réparti dans les puits à raison de 10ml/puits. Les puits sont humectés avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.3ml d'eau).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/puits) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 24h dans de l'eau.

Les boîtes multipuits sont placées avec leur couvercle sur une pailasse du laboratoire devant une fenêtre.

10 février 2020 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicelle). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

### Résultats

|        | D13 | B4  | F17 | G18 | E15 | H20 | A1  | C9  | Témoin |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|
| % germ | 96% | 96% | 94% | 90% | 88% | 90% | 94% | 94% | 98%    |

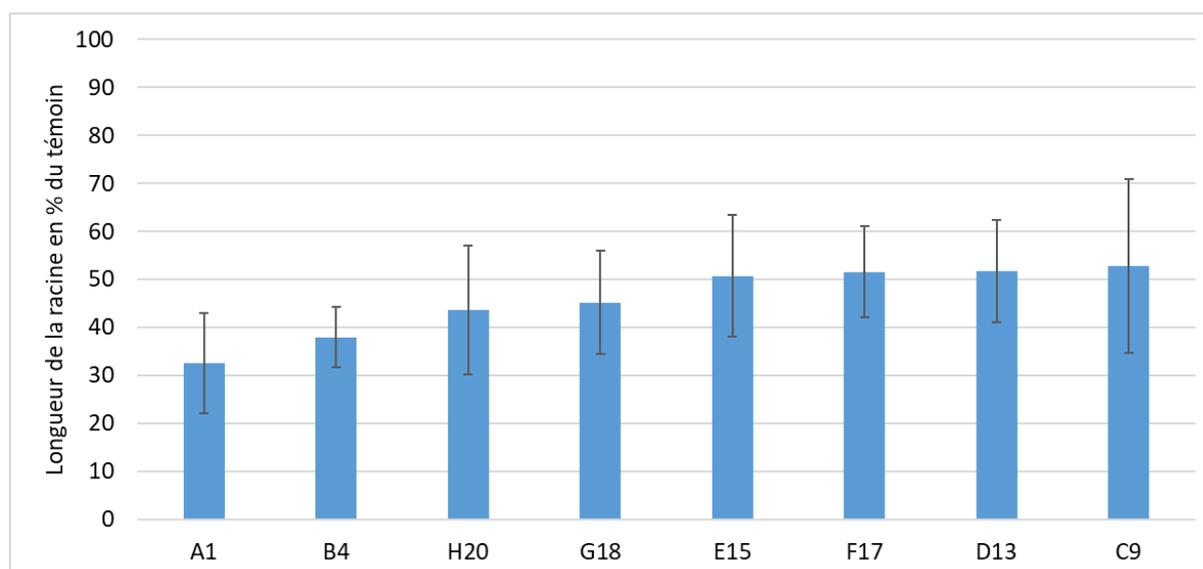


Figure 1 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de 8 écotypes de *Medicago lupulina*, sur la longueur des radicelles de cresson alénois (*Lepidium*)

*sativum*) (moyenne  $\pm$  ESM; n=10). Concentration : 0.2g MV/100ml de substrat. Ecotypes : A1, B4, C9, D13, E15, F17, G18, H20. Témoins : substrat seul (Témoin).

### **Remarques**

- Il semble que l'écotype A1 soit celui ayant les propriétés allélopathiques les plus fortes. Cependant l'analyse statistique (ANOVA et comparaison de Fisher sur les données transformées par log) ne montre pas de différences statistiquement significatives à 5%.

Annabelle Berthet, 11 février 2020

**Biotest terre végétale multipuits (BTVM), échantillons de feuille d'une part et de graines/enveloppe de la graine et tige d'autre, de deux écotypes de *Medicago lupulina*.**

Écotypes testés : *Prunella vulgaris* A1 et C9

Traitement: organes testés séparément

|           |   |
|-----------|---|
| <b>A</b>  | <b>Écotypes A1 majoritairement feuille</b>          |
| <b>AF</b> | <b>A1 majoritairement graines/enveloppe et tige</b> |
| <b>C</b>  | <b>Écotypes C9 majoritairement feuille</b>          |
| <b>CF</b> | <b>C9 majoritairement graines/enveloppe et tige</b> |

**Témoins : terre seule**

13 février 2020 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type bac à sable MBrico) à une concentration de ¼ (sable/TV).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). L'échantillon est ensuite tamisé pour obtenir principalement des extraits de feuilles d'un côté, et des extraits de tiges, graines et enveloppe de la graine de l'autre. Les échantillons triés sont mélangés au substrat à une concentration de 0.05g/100ml de terre végétale (5.2g/m<sup>2</sup>). Le mélange est réparti dans les puits à raison de 10ml/puits. Les puits sont humectés avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.3ml d'eau).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/puits) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 24h dans de l'eau.

Les boîtes multipuits sont placées avec leur couvercle sur une paille du laboratoire devant une fenêtre.

17 février 2020 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicule). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

**Résultats**

|        | <b>A - feuille</b> | <b>A - graine&amp;tige</b> | <b>C - feuille</b> | <b>C - graine&amp;tige</b> | <b>Témoin</b> |
|--------|--------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|---------------|
| % germ | 100%               | 95%                        | 95%                | 90%                        | 95%           |

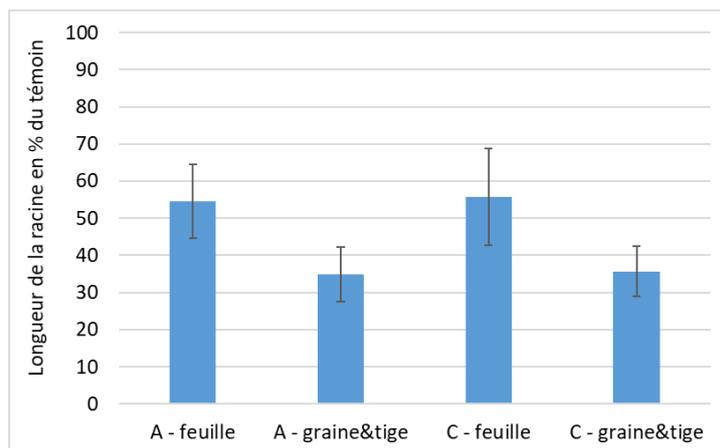


Figure 1 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches d'un côté et de tige, graines et enveloppe de la graine de l'autre, de deux écotypes de *Medicago lupulina*, sur la longueur des radicelles de cresson alénois (*Lepidium sativum*) en différentes concentrations (moyenne ± ESM; n=20). Concentration : 0.2g de matériel végétal/100ml de substrat.

### Remarques

- il semble que les propriétés allélopathiques des organes graines, enveloppes de la graine et tige sont plus fortes d'environ 20% que celles de la feuille dans le cas de *Medicago lupulina*. Cependant, les analyses statistiques (ANOVA et comparaison de Fisher sur les données transformées par log) ne montrent pas de différence statistiquement significative à 5%, ni même à 10%, mais en revanche à 15%.

| Analyse de variance |    |              |          |          |             |
|---------------------|----|--------------|----------|----------|-------------|
| Source              | DL | SomCar ajust | CM ajust | Valeur F | Valeur de p |
| Indices             | 3  | 0.5636       | 0.1879   | 1.84     | 0.147       |
| Erreur              | 76 | 7.768        | 0.1022   |          |             |
| Total               | 79 | 8.3316       |          |          |             |

| Informations de groupement avec la méthode de L. |    |                    |
|--|----|--------------------|
| Indices  | N  | Moyenne Groupement |
| A  | 20 | 1.6441 A           |
| C  | 20 | 1.5881 A           |
| CF   | 20 | 1.4597 A           |
| AF   | 20 | 1.4467 A           |

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

- Une hypothèse serait que la graine et/ou son enveloppe contiennent de telles propriétés pour favoriser le développement de cette graine au sol.

Annabelle Berthet, 18 février 2020

## Biotest terre végétale multipuits (BTVM), échantillons de *Prunella vulgaris* pour recherche de concentration pour plante-témoin

Espèce testée : *Prunella vulgaris*

Traitement: concentration

|    |             |                    |
|----|-------------|--------------------|
| C5 | 0.2g/100ml  | 20g/m <sup>2</sup> |
| C6 | 0.1g/100ml  | 10g/m <sup>2</sup> |
| C7 | 0.05g/100ml | 5g/m <sup>2</sup>  |

Témoins : terre seule

20 février 2020 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type bac à sable MBrico) à une concentration de ¼ (sable/TV).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons sont mélangés au substrat aux différentes concentrations citées dans le tableau ci-dessus. Le mélange est réparti dans les puits à raison de 10ml/puits. Les puits sont humectés avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.3ml d'eau).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/puits) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 24h dans de l'eau.

Les boîtes multipuits sont placées avec leur couvercle sur une paille du laboratoire devant une fenêtre.

24 février 2020 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicule). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

### Résultats

|        | C5  | C6  | C7   | Témoin |
|--------|-----|-----|------|--------|
| % germ | 99% | 96% | 100% | 99%    |

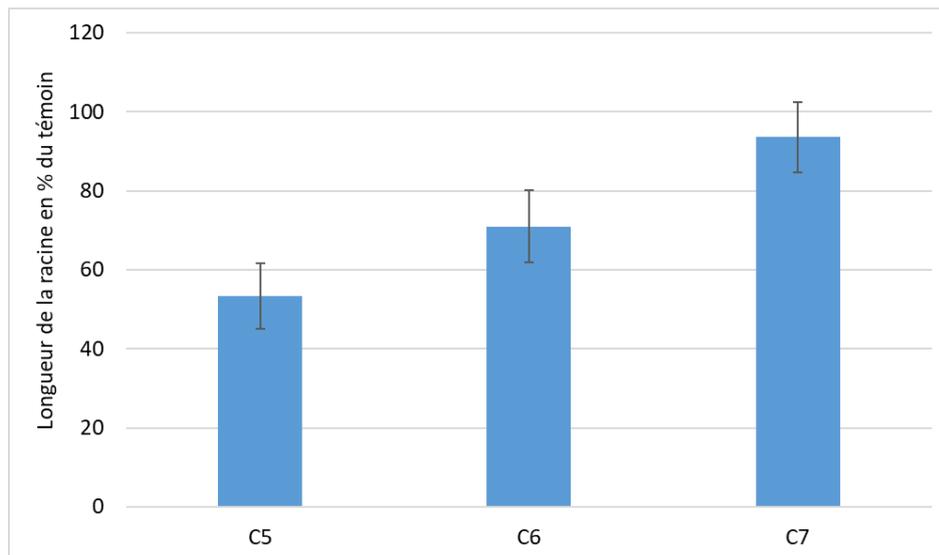


Figure 2 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de *Prunella vulgaris*, sur la longueur des racines de cresson alénois (*Lepidium sativum*) en différentes concentrations (moyenne  $\pm$  ESM; n=20). Concentrations : C5=0.2g de matériel végétal/100ml de substrat, C6=0.1g/100ml, C7=0.05g/100ml. Témoin : substrat seul (Témoin).

### Remarques

- La concentration C7 (0.05g/100ml) a < 10% d'efficacité dans la réduction des racines. Elle est donc adaptée pour utiliser *Prunella vulgaris* comme plante témoin.
- Précision : plante témoin = plante qui n'a pas d'effet allélopathique négatif sur la croissance des racines, permettant de montrer que l'effet des autres plantes n'est pas dû à la présence de résidus végétaux.

Annabelle Berthet, 25 février 2020

**Biotest terre végétale multipuits (BTVM), échantillons de *Medicago lupulina*, *Bromus tectorum* et *Prunella vulgaris*, dans boîtes multipuits stériles et boîtes usagées (nettoyée au savon et éthanol).**

**Espèces testés: *Medicago lupulina*, *Bromus tectorum*, *Prunella vulgaris***

**Témoins négatif: *Prunella vulgaris*, terre seule**

**Modalité : boîtes multipuits usagées vs boîtes stériles**

27 février 2020 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type bac à sable MBrico) à une concentration de ¼ (sable/TV).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons des différents écotypes sont mélangés au substrat à une concentration de 0.05g/100ml de terre végétale (5.2g/m<sup>2</sup>). Le mélange est réparti dans les puits des boîtes usagées d'une part, et dans les boîtes stériles d'autre part, à raison de 10ml/puits. Les puits sont humectés avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation.

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/puits) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 24h dans de l'eau.

Les boîtes multipuits sont placées avec leur couvercle dans une chambre climatique à 20°C, temps j/n de 12h/12h, HR 50%.

2 mars 2020 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicule). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

**Résultats**

|        | Boîtes usagées |       |        |        | Boîtes stériles |       |        |        |
|--------|----------------|-------|--------|--------|-----------------|-------|--------|--------|
|        | BROTE          | MEDLU | PRUNVU | Témoin | BROTE           | MEDLU | PRUNVU | Témoin |
| % germ | 98%            | 0%    | 100%   | 100%   | 100%            | 100%  | 100%   | 100%   |

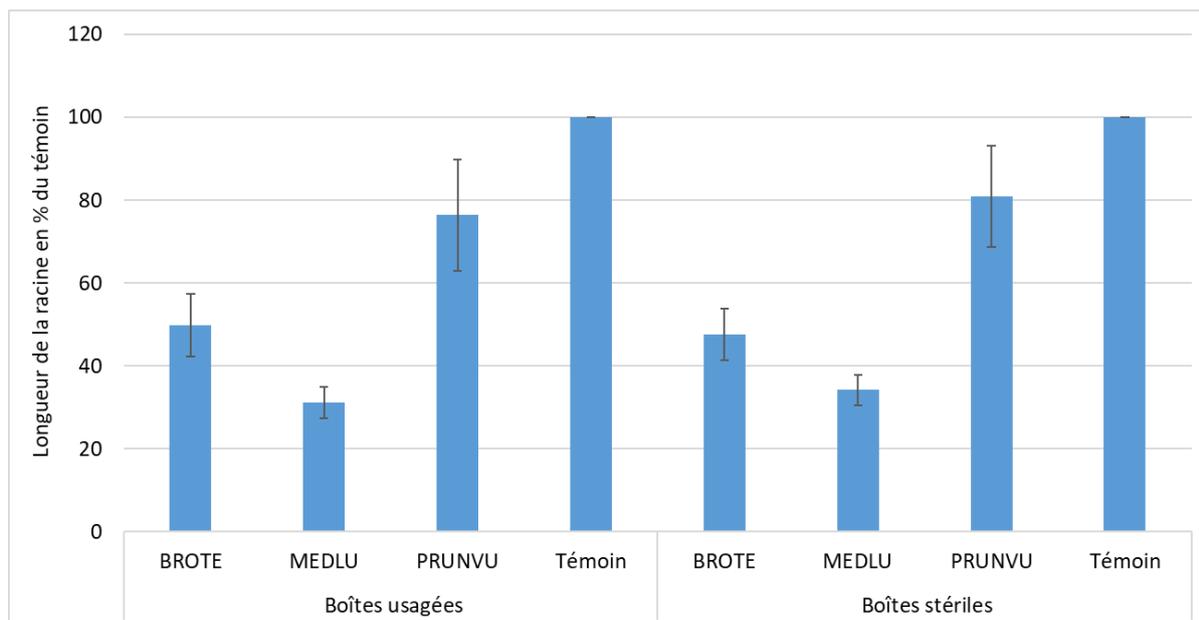


Figure 3 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de 3 espèces : *Medicago lupulina*, *Bromus tectorum* et *Prunella vulgaris*, sur la longueur des racines de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne ± ESM; n=10). Concentration : 0.05g de matière végétale/100ml de substrat. Témoins : *Prunella vulgaris* et substrat 0.05g/100ml (Prunvu), substrat seul (Témoin).

### Remarques

- Il ne semble pas y avoir de différences significatives entre les biotests dans des boîtes stériles et des boîtes usagées.

Annabelle Berthet, 4 mars 2020

**Biotest terre végétale multipuits (BTVM), échantillons de *Medicago lupulina* de Changins, 0 jour de macération du substrat+plt**

**Écotypes testés (Medlup) : C2, C5, A9, C10**

**Témoins négatif: *Prunella vulgaris*, terre seule**

14 mai 2020 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type bac à sable MBrico) à une concentration de ¼ (sable/TV).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons des différents écotypes sont mélangés au substrat à une concentration de 0.05g/100ml de terre végétale (5.2g/m<sup>2</sup>). Le mélange est réparti dans les puits à raison de 10ml/puits. Les puits sont humectés avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.3ml d'eau).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/puits) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 24h dans de l'eau.

Les boîtes multipuits sont placées avec leur couvercle dans une chambre climatique à 20°C, temps j/n de 12h/12h, HR 50%.

18 mai 2020 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicelle). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

**Résultats**

|        | <b>C2</b> | <b>C5</b> | <b>A9</b> | <b>C10</b> | <b>Prunvu</b> | <b>Témoin</b> |
|--------|-----------|-----------|-----------|------------|---------------|---------------|
| % germ | 98%       | 100%      | 98%       | 100%       | 98%           | 100%          |

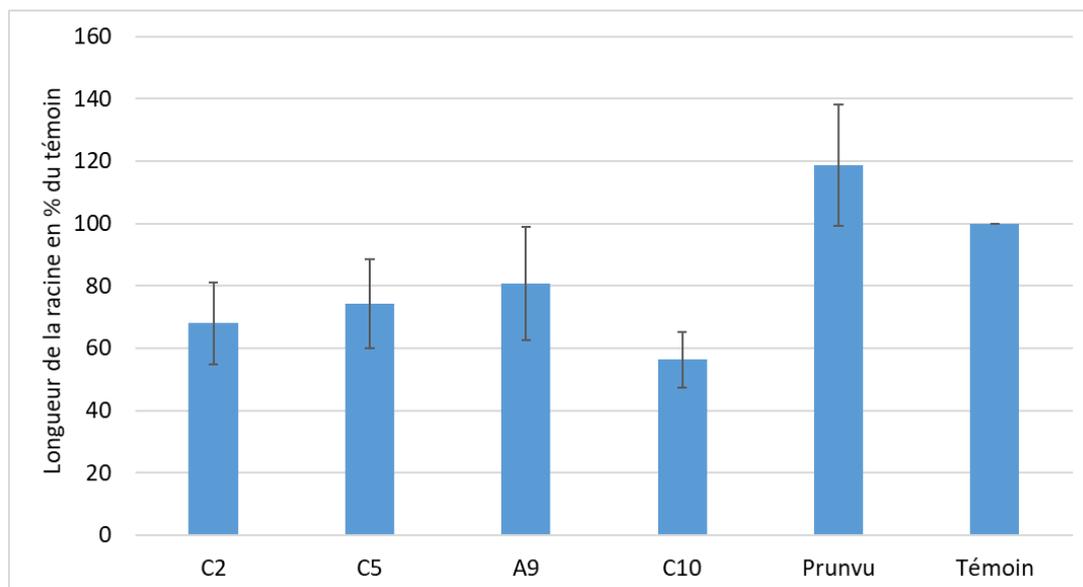


Figure 4 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de 4 écotypes (C2, C5, A9, C10) de *Medicago lupulina*, sur la longueur des radicelles de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne  $\pm$  ESM; n=10). Concentration : 0.05g de matière végétale/100ml de substrat. Témoins : *Prunella vulgaris* et substrat 0.05g/100ml (Prunvu), substrat seul (Témoin).

### Remarques

Témoin « Prunvu » présente de plus grandes racines que le témoin « terre seule » → à observer dans les prochains BT.

Globalement, toutes les moyennes des écotypes Medlup sont entre 50% et 80%.

Annabelle Berthet, 20 mai 2020

## Biotest terre végétale multipuits (BTVM), échantillons de *Medicago lupulina* de Changins, 7 jours de macération du substrat+plt

Écotypes testés (Medlup) : C2, C5, A9, C10

Témoins négatif: *Prunella vulgaris*, terre seule

4 juin 2020 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type bac à sable MBrico) à une concentration de ¼ (sable/TV).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons des différents écotypes sont mélangés au substrat à une concentration de 0.05g/100ml de terre végétale (5.2g/m<sup>2</sup>). Le mélange est réparti dans les puits à raison de 10ml/puits. Les puits sont humectés avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.5ml d'eau). Les puits sont préparés 7 jours avant le début du biotest, et sont conservés en chambre climatique (20°C, 12h jour/ 12h nuit, HR 50%).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/puits) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 24h dans de l'eau.

Les boîtes multipuits sont placées avec leur couvercle dans une chambre climatique à 20°C, temps j/n de 12h/12h, HR 50%.

8 juin 2020 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicule). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

### Résultats

|        | C2   | C5   | A9   | C10  | Prunvu | Témoin |
|--------|------|------|------|------|--------|--------|
| % germ | 100% | 100% | 100% | 100% | 100%   | 100%   |

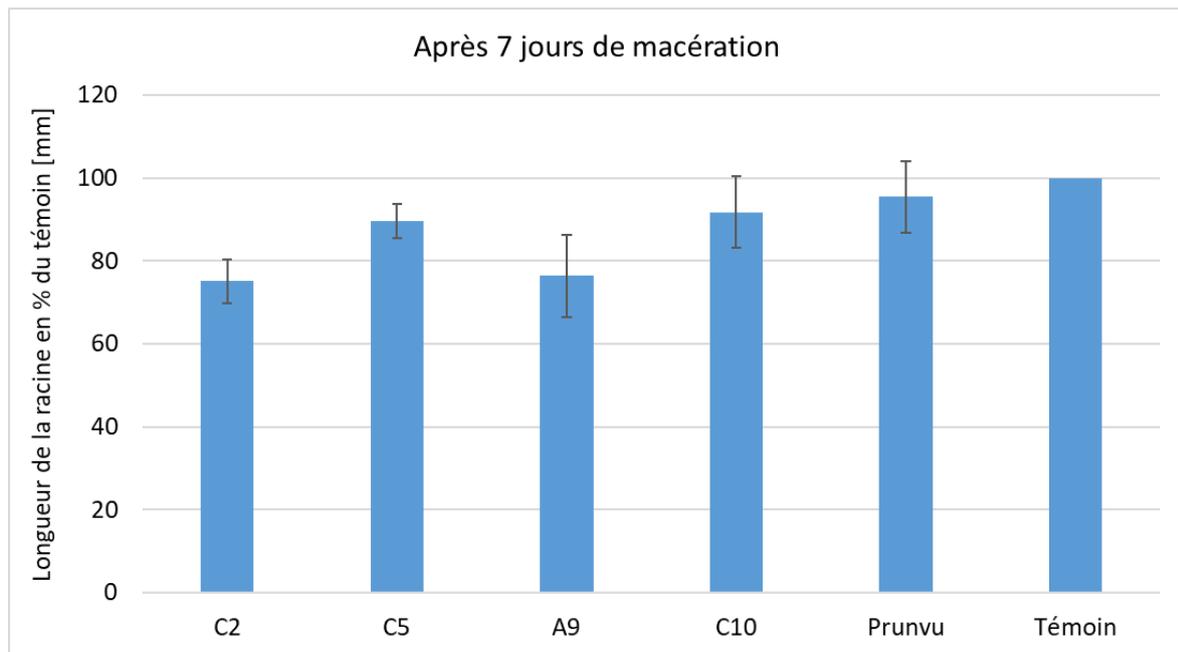


Figure 5 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de 4 écotypes (C2, C5, A9, C10) de *Medicago lupulina*, sur la longueur des radicelles de cresson alénois (*Lepidium sativum*) après 7 jours de macération du substrat + matériel végétal (MV) (moyenne  $\pm$  ESM; n=10). Concentration : 0.05g MV/100ml de substrat. Témoins : *Prunella vulgaris* et substrat 0.05g/100ml (Prunvu), substrat seul (Témoin).

### Remarques

Cette fois, témoin « prunvu » donne des racines moins longue que témoin  $\rightarrow$  vs B20 ! Pas de répétabilité pour une éventuelle stimulation de la croissance.

Globalement, toutes les moyennes semblent au-dessus des 70%. Donc racines plus longues que dans B30 avec 0j de macération du substrat. Mais pas même rapport entre les écotypes (C10 était le plus bas, mnt le plus élevé).  $\rightarrow$  pas de répétabilité dans l'efficacité due aux écotypes, mais l'efficacité générale semble baisser.

La macération de 7 jours du matériel végétal semble diminuer légèrement les effets allélopathiques.

Annabelle Berthet, 8 juin 2020

## Biotest terre végétale multipuits (BTVM), échantillons de *Medicago lupulina* de Changins, 14 jours de macération du substrat+plt

Écotypes testés (Medlup) : C2, C5, A9, C10

Témoins négatif: *Prunella vulgaris*, terre seule

11 juin 2020 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type bac à sable MBrico) à une concentration de ¼ (sable/TV).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons des différents écotypes sont mélangés au substrat à une concentration de 0.05g/100ml de terre végétale (5.2g/m<sup>2</sup>). Le mélange est réparti dans les puits à raison de 10ml/puits. Les puits sont humectés avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.5ml d'eau). Les puits sont préparés 7 jours avant le début du biotest, et sont conservés en chambre climatique (20°C, 12h jour/ 12h nuit, HR 50%).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/puits) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 21h dans de l'eau.

Les boîtes multipuits sont placées avec leur couvercle dans une chambre climatique à 20°C, temps j/n de 12h/12h, HR 50%.

15 juin 2020 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicelle). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

### Résultats

|        | C2   | C5   | A9   | C10  | Prunvu | Témoin |
|--------|------|------|------|------|--------|--------|
| % germ | 100% | 100% | 100% | 100% | 100%   | 100%   |

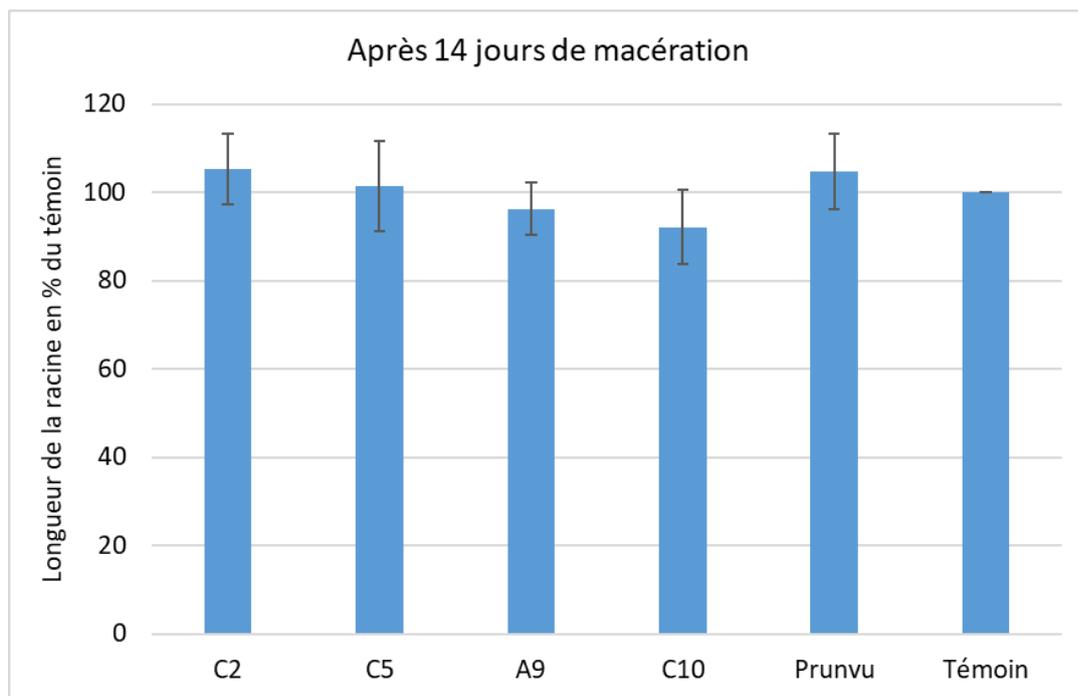


Figure 6 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de 4 écotypes (C2, C5, A9, C10) de *Medicago lupulina*, sur la longueur des radicelles de cresson alénois (*Lepidium sativum*). Le mélange substrat et extrait de plante a macéré pendant 14 jours avant le lancement du test (moyenne  $\pm$  ESM; n=10). Concentration : 0.05g MV/100ml de substrat. Témoins : *Prunella vulgaris* et substrat 0.05g/100ml (Prunvu), substrat seul (Témoin).

### Remarques

- La macération du substrat semble dégrader les molécules responsables des propriétés allélopathiques dans le cas de *Medicago lupulina*.

Annabelle Berthet, 17 juin 2020

## Biotest terre végétale multipuits (BTVM), échantillons de *Bromus tectorum* de Changins, dynamique allélopathie entre différents stades phénologiques

Stades phénologiques testés (*Bromus tectorum*) :

| Code         | n°1      | n°2      | n°3      | n°4      |
|--------------|----------|----------|----------|----------|
| Stade BBCH   | 29       | 59       | 65       | 79-89    |
| Date récolte | 05.03.20 | 12.04.20 | 27.04.20 | 17.05.20 |

Témoins négatif: *Prunella vulgaris*, terre seule

18 juin 2020 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type bac à sable MBrico) à une concentration de ¼ (sable/TV).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons des différents écotypes sont mélangés au substrat à une concentration de 0.05g/100ml de terre végétale (5.2g/m<sup>2</sup>). Le mélange est placé dans des béchers de 25ml à raison de 10ml/bécher. Le mélange est humecté avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.3ml d'eau).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/bécher) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 21h dans de l'eau.

Les béchers sont placés avec un couvercle dans une chambre climatique à 20°C, temps j/n de 12h/12h, HR 50%.

22 juin 2020 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicelle). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

### Résultats

|        | n°1  | n°2  | n°3  | n°4  | Prunvu | Témoin |
|--------|------|------|------|------|--------|--------|
| % germ | 100% | 100% | 100% | 100% | 100%   | 100%   |

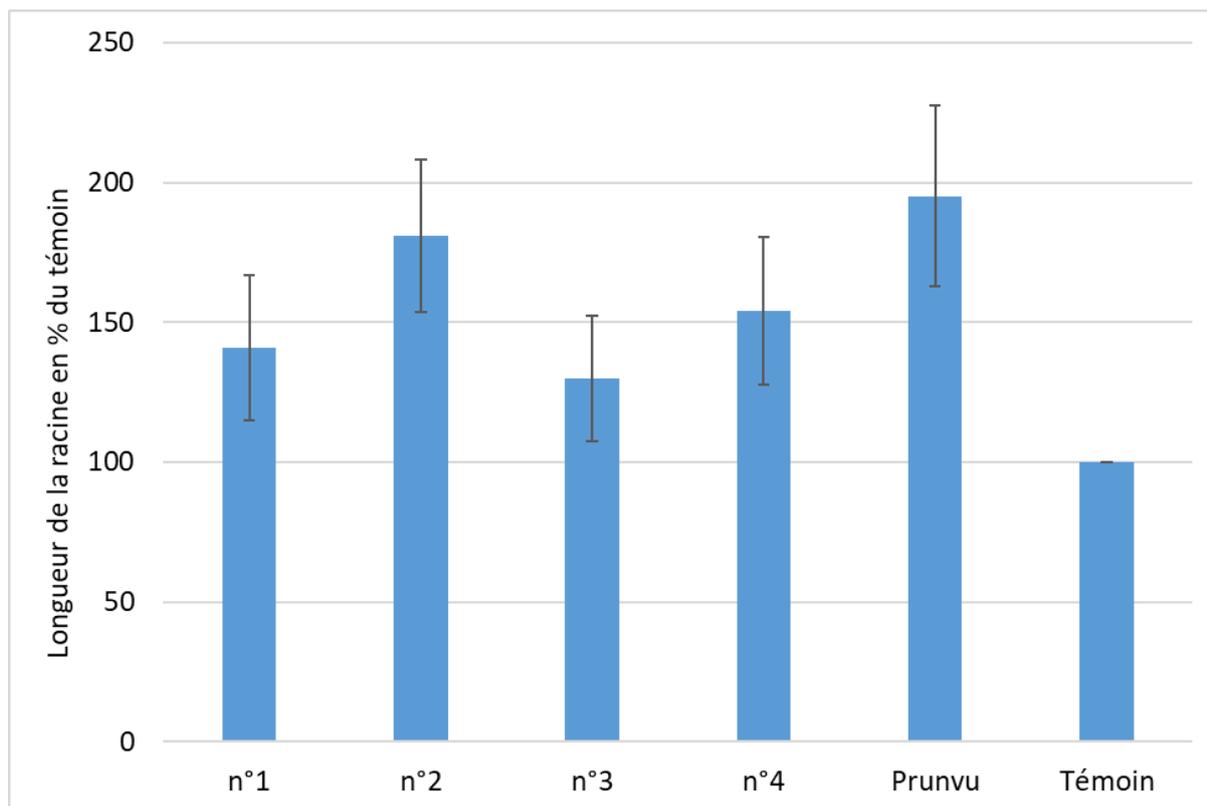


Figure 7 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de *Bromus tectorum* à 4 stades phénologiques différents, sur la longueur des radicules de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne  $\pm$  ESM; n=10). Stades BBCH : n°1 = 29, n°2 = 59, n°3 = 65, N°4 = 79-89. Concentration : 0.05g MV/100ml de substrat. Témoins : *Prunella vulgaris* et substrat 0.05g/100ml (Prunvu), substrat seul (Témoin).

#### Remarques

- Une grande partie des béciers contenant du brome sent l'eau croupie. Il y a peut-être trop d'eau  $\rightarrow$  à tester avec moins d'eau (4.8-5ml) dans les béciers.
- Toutes les moyennes de longueur de racine sont plus élevées que celle du témoin  $\rightarrow$  ne montrent pas d'effet allélopathique négatif.

Annabelle Berthet, 23 juin 2020

## Biotest terre végétale multipuits (BTVM), échantillons de *Bromus tectorum* de Changins, dynamique de l'effet allélopathique entre différents stades phénologiques

Stades phénologiques testés (*Bromus tectorum*) :

| Code         | n°1      | n°2      | n°3      | n°4      | n°5      |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Stade BBCH   | 29       | 59       | 65       | 79-89    | 97       |
| Date récolte | 05.03.20 | 12.04.20 | 27.04.20 | 17.05.20 | 21.06.20 |

Témoins : *Prunella vulgaris* (négatif), terre seule (réf)

25 juin 2020 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable (type bac à sable MBrico) à une concentration de ¼ de sable.

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons des différents écotypes sont mélangés au substrat à une concentration de 0.1g/100ml de terre végétale (10g/m<sup>2</sup>). Le mélange est placé dans des béciers de 25ml à raison de 10ml/bécher. Le mélange est humecté avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.1ml d'eau).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/bécher) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 24h dans de l'eau.

Les béciers sont placés sans couvercle dans une chambre climatique à 20°C, temps j/n de 12h/12h, HR 50%.

29 juin 2020 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicelle). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

### Résultats

|        | n°1 | n°2  | n°3 | n°4 | n°5 | Prunvu | Témoin |
|--------|-----|------|-----|-----|-----|--------|--------|
| % germ | 98% | 100% | 98% | 96% | 96% | 98%    | 100%   |

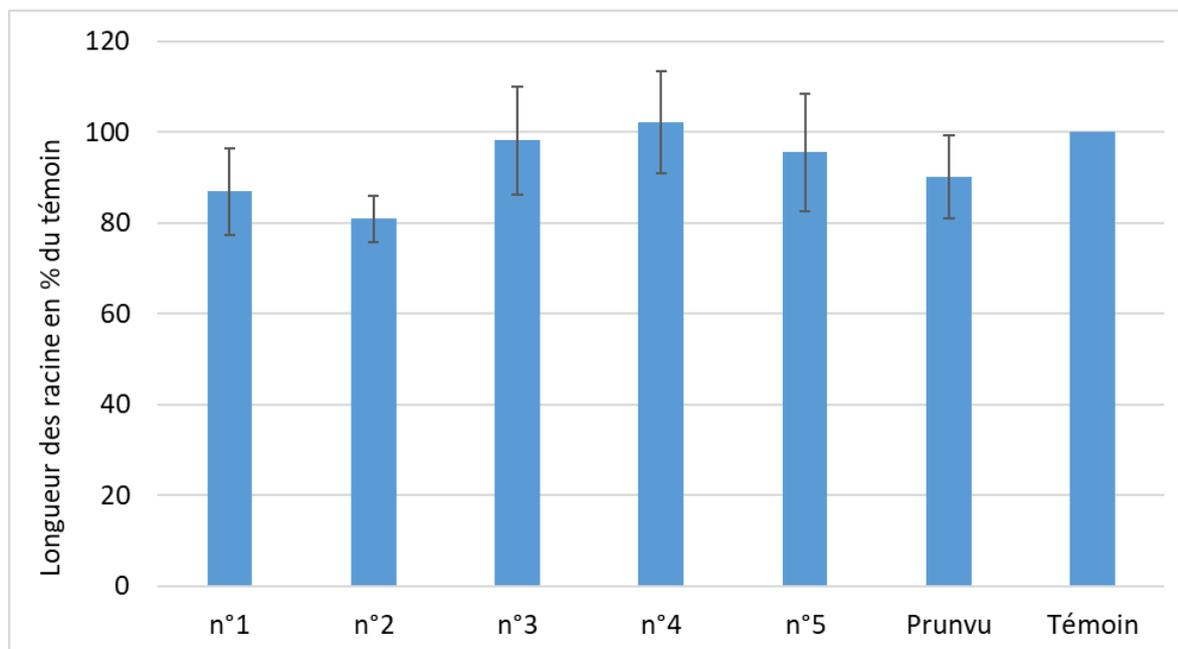


Figure 8 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de *Bromus tectorum* à 5 stades phénologiques différents, sur la longueur des racines de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne  $\pm$  ESM; n=10). Stades BBCH : n°1 = 29, n°2 = 59, n°3 = 65, n°4 = 79-89, n°5 = 97. Concentration : 0.1g MV/100ml de substrat. Témoins : *Prunella vulgaris* et substrat 0.1g/100ml (Prunvu), substrat seul (Témoin).

#### Remarques

- Pas de répétabilité par rapport à l'essai B33 qui teste les bromes n°1-n°4.
- Malgré l'augmentation des doses (x2) il est difficile d'affirmer que le brome a ici un effet allélopathique.

Annabelle Berthet, 1<sup>er</sup> juillet 2020

**Biotest terre végétale multipuits (BTVM), échantillons de *Bromus tectorum* de Changins, test de durée : 3 jours, dynamique de l'effet allélopathique entre différents stades phénologiques**

Stades phénologiques testés (*Bromus tectorum*) :

| Code         | n°1      | n°2      | n°3      | n°4      | n°5      |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Stade BBCH   | 29       | 59       | 65       | 79-89    | 97       |
| Date récolte | 05.03.20 | 12.04.20 | 27.04.20 | 17.05.20 | 21.06.20 |

Témoins : terre seule (réf), *Prunella vulgaris* (négatif), *Artemisia annua* (positif)

27 juillet 2020 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable de quartz (lavé, marque Baumit) à une concentration de ¼ de sable.

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons des différents écotypes sont mélangés au substrat à une concentration de 0.1g/100ml de terre végétale (10.4g/m<sup>2</sup>). Le mélange est placé dans des béchers de 25ml à raison de 10ml/bécher. Le mélange est humecté avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.1ml d'eau).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/bécher) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 24h dans de l'eau.

Les béchers sont placés sans couvercle dans une chambre climatique à 20°C, temps j/n de 12h/12h, HR 50%.

30 juillet 2020 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicule). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ». Une des cinq répétitions est sortie du biotest et conservée pour servir d'exemple à la formation de Daphné Costention sur les biotests.

**Résultats**

|        | n°1 | n°2  | n°3  | n°4  | n°5 | Prunvu | Artannua | Témoin |
|--------|-----|------|------|------|-----|--------|----------|--------|
| % germ | 95% | 100% | 100% | 100% | 95% | 100%   | 100%     | 100%   |

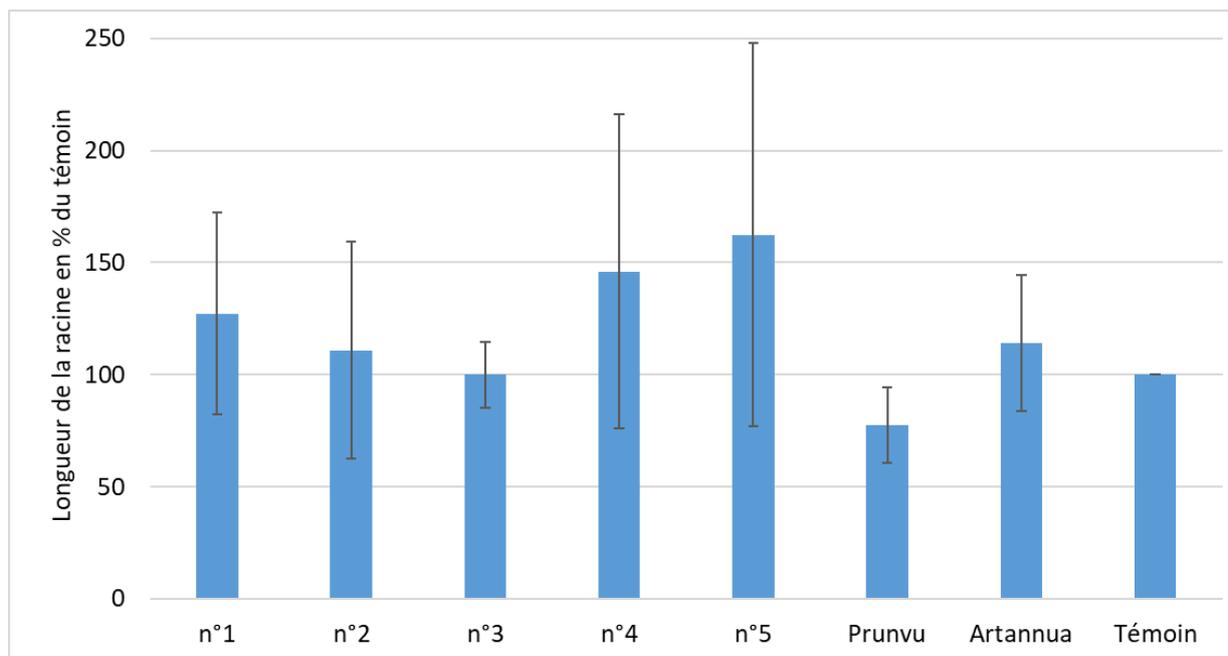


Figure 9 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de *Bromus tectorum* à 5 stades phénologiques différents, sur la longueur des radicelles de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne  $\pm$  écart-type; n=4). Stades BBCH : n°1 = 29, n°2 = 59, n°3 = 65, n°4 = 79-89, n°5 = 97. Concentration : 0.1g MV/100ml de substrat. Témoins : *Prunella vulgaris* et substrat 0.1g/100ml (Prunvu), substrat seul (Témoin).

#### Remarques

- Les résultats sont à l'opposé des effets attendus.
- La durée de 3 jours est définitivement trop courte pour ce biotest. Les racines ont l'air d'émerger à peine, probablement sur la réserve de la graine.

Annabelle Berthet, 4 août 2020

**Biotest terre végétale multipuits (BTVM), échantillons de *Bromus tectorum* de Changins, test de durée : 6 jours, dynamique de l'effet allélopathique entre différents stades phénologiques**

Ecotypes testés (Bromus) :

| Code         | n°1      | n°2      | n°3      | n°4      | n°5      |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Stade BBCH   | 29       | 59       | 65       | 79-89    | 97       |
| Date récolte | 05.03.20 | 12.04.20 | 27.04.20 | 17.05.20 | 21.06.20 |

Témoins : terre seule (réf), *Prunella vulgaris* (négatif), *Artemisia annua* (positif)

30 juillet 2020 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable de quartz (lavé, marque Baumit) à une concentration de ¼ de sable.

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons des différents écotypes sont mélangés au substrat à une concentration de 0.1g/100ml de terre végétale (10.4g/m<sup>2</sup>). Le mélange est placé dans des béchers de 25ml à raison de 10ml/bécher. Le mélange est humecté avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ 5.1ml d'eau).

Plante test : graines de cressons alénois, *Lepidium sativum* (UFA, landi), sont disposés (5/bécher) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 24h dans de l'eau.

Les béchers sont placés sans couvercle dans une chambre climatique à 20°C, temps j/n de 12h/12h, HR 50%.

5 août 2020 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicelle). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

**Résultats**

|        | n°1  | n°2 | n°3  | n°4 | n°5 | Prunvu | Artannua | Témoin |
|--------|------|-----|------|-----|-----|--------|----------|--------|
| % germ | 100% | 97% | 100% | 97% | 91% | 100%   | 97%      | 100%   |

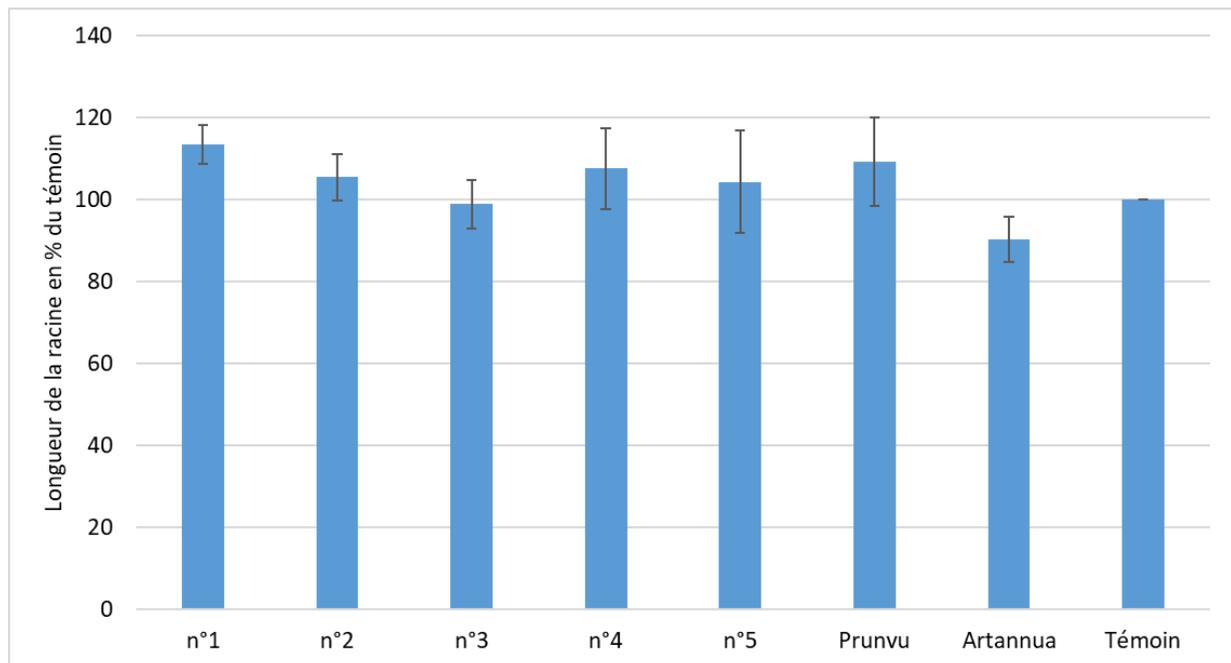


Figure 10 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de *Bromus tectorum* à 5 stades phénologiques différents, sur la longueur des racines de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne ± ESM; n=7). Stades BBCH : n°1 = 29, n°2 = 59, n°3 = 65, n°4 = 79-89, n°5 = 97. Concentration : 0.1g MV/100ml de substrat. Témoins : *Prunella vulgaris* et substrat 0.1g/100ml (Prunvu), substrat seul (Témoin).

#### Remarques

- Comme les derniers tests sur la dynamique du brome, l'effet croît jusqu'au n°3 et puis décroît. Mais il n'y a pas de réel effet puisque le n°3 est très proche des 100% !

Annabelle Berthet, 6 août 2020

**Biotest terre végétale multipuits (BTVM), échantillons de *Bromus tectorum* (printemps 2019) et *Medicago lupulina* de Isaline, test de durée : 5 jours avec 20ml de substrat par bécher.**

Espèces & écotypes testés : *Bromus tectorum* printemps 2019 (récolté par ?), *Medicago lupulina* B4 et C9 (ISA)

Témoins : terre seule (réf), *Prunella vulgaris* (négatif), *Artemisia annua* (positif)

8 septembre 2020 :

Préparation du biotest.

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h   l'étuve à 50 C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable de quartz (lavé, marque Baumit)   une concentration de à de sable.

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T  ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons des différents écotypes sont mélangés au substrat à une concentration de **0.2g/100ml** de terre végétale (21g/m<sup>2</sup>). Le mélange est placé dans des béchers de 25ml à raison de **20ml/bécher**. Le mélange est humecté avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ **10ml** d'eau). Les béchers sont placés en chambre climatique à 20 C, temps j/n de 12h/12h, HR 50%.

9 septembre 2020 :

Plante test : graines de cressons alénois simple, *Lepidium sativum* (UFA, Landi), sont disposées (5/bécher) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 24h dans de l'eau.

Les béchers sont placés sans couvercle dans une chambre climatique à 20 C, temps j/n de 12h/12h, HR 50%.

14 septembre 2020 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicelle). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

**Résultats**

|        | <b>BROTE</b> | <b>MED B4</b> | <b>MED C9</b> | <b>Artannua</b> | <b>Prunvu</b> | <b>Témoin</b> |
|--------|--------------|---------------|---------------|-----------------|---------------|---------------|
| % germ | 100%         | 98%           | 100%          | 100%            | 100%          | 98%           |

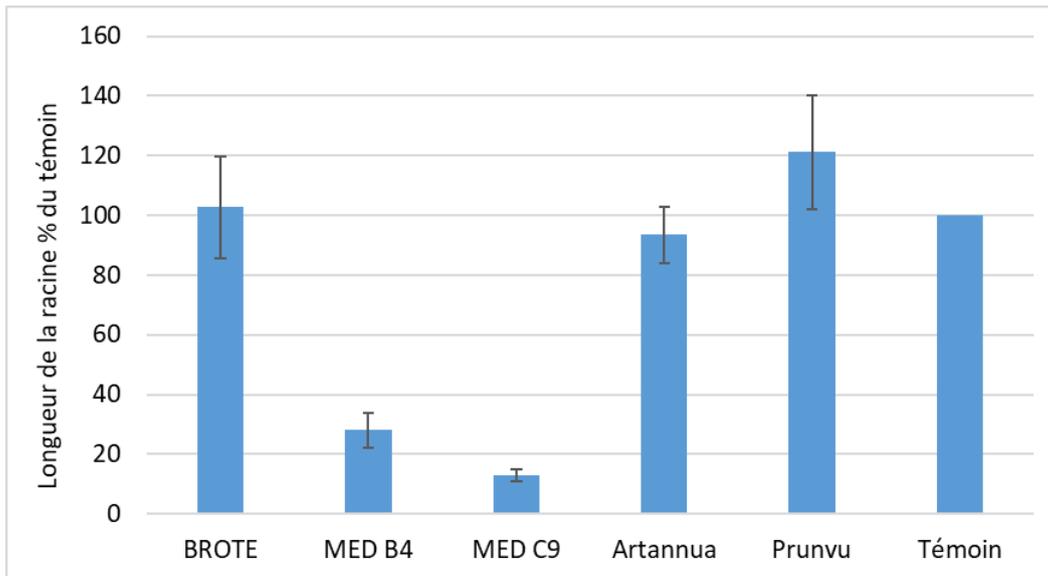


Figure 11 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 4/1) de résidus de feuilles sèches de *Bromus tectorum* et de deux écotypes de *Medicago lupulina* (B4 et C9), sur la longueur des racines de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne ± ESM; n=10). Concentration : 0.2g MV/100ml de substrat. Témoins : *Prunella vulgaris*, substrat seul (Témoin).

#### Remarques

- Dans ce test, j'ai testé à la fois la possibilité de faire un test de 5 jours, cette fois en doublant le volume de substrat (10ml/bécher → 20ml/bécher) pour avoir plus de profondeur pour les racines. Mais aussi de retrouver un effet allélopathique clair de la part d'une plante quelle qu'elle soit. C'est pourquoi j'ai choisi ce brome et ces luzernes, car ce sont celles qui ont donné les meilleurs résultats dans les biotests que j'ai réalisés depuis une année. C'est aussi pourquoi j'ai repris une concentration plus élevée (C5=0.2g/100ml).
- Il me semble que les semences de Landi de **cresson alénois simple** sont mieux que le cresson alénois large.

Annabelle Berthet, 14 septembre 2020

## Biotest terre végétale multipuits (BTVM), substrat avec 50% et 75% de sable

Écotypes testé : *Medicago lupulina* C9 (ISA)

Témoins : terre seule (réf), *Prunella vulgaris* (négatif), *Artemisia annua* (positif)

29 septembre 2020 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable de quartz (lavé, marque Baunit) à deux concentrations de de sable : 50% (1.) et 75% (2.).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons des différents écotypes sont mélangés au substrat à une concentration de **0.2g/100ml** de terre végétale (21g/m<sup>2</sup>). Le mélange est placé dans des bécchers de 25ml à raison de **20ml/bécher**. Le mélange est humecté avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ **6ml** d'eau). Les bécchers sont placés en chambre climatique à 20°C, temps j/n de 12h/12h, HR 50%.

30 septembre 2020 :

Plante test : graines de cressons alénois simple, *Lepidium sativum* (UFA, Landi), sont disposées (5/bécher) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 24h dans de l'eau.

Les bécchers sont placés sans couvercle dans une chambre climatique à 20°C, temps j/n de 12h/12h, HR 50%.

5 octobre 2020 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicule). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

### Résultats

|        | Medlu C9 | Artannua | Prunvu | 1.Témoin | 2.Medlu C9 | 2.Artannua | 2.Prunvu | 2.Témoin |
|--------|----------|----------|--------|----------|------------|------------|----------|----------|
| % germ | 100%     | 100%     | 96%    | 100%     | 100%       | 100%       | 100%     | 96%      |

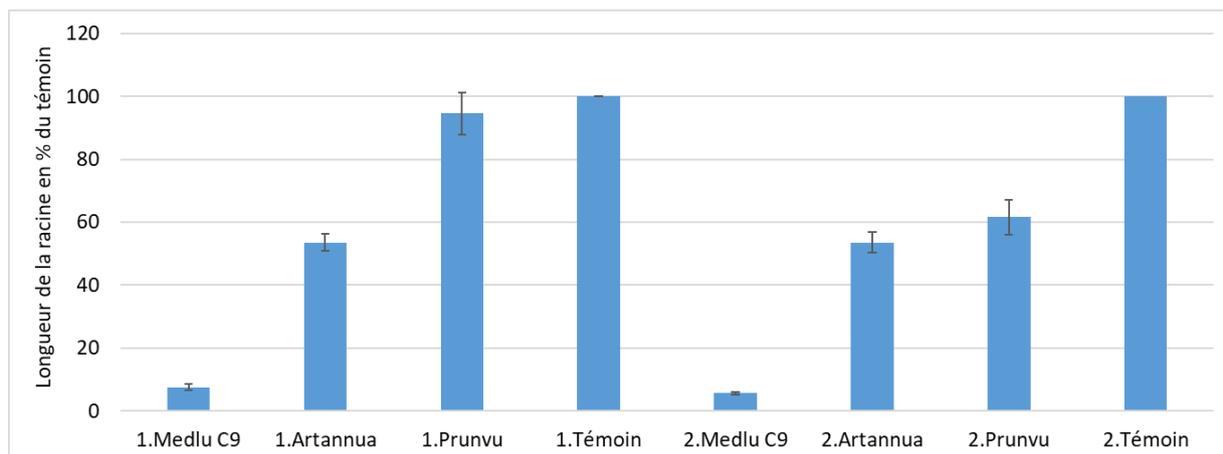


Figure 12 Effet de l'incorporation à deux substrats (terre végétale (1)+50% ou (2)+75% sable) de résidus de feuilles sèches d'un écotype de *Medicago lupulina* (C9), sur la longueur des racines de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne  $\pm$  ESM; n=5). Concentration : 0.2g MV/100ml de substrat. (1.) : substrat avec 50% de sable (v/v), (2.) : substrat avec 75% de sable (v/v). Témoins : *Prunella vulgaris*, *Artemisia annua*, substrat seul (Témoin).

### Remarques

- Il semble que l'augmentation de la proportion de sable dans le substrat augmente l'effet allélopathique de *Prunella vulgaris*. Peut-être qu'elle a un effet allélopathique qui est annulé par l'interaction avec la terre végétale, ce qui expliquerait qu'elle ait pu passer les screening en milieux gélosés, mais qu'elle ne soit plus efficace dans le biotest avec la terre végétale.

Annabelle Berthet, 12 octobre 2020

## Biotest terre végétale multipuits (BTVM), écotypes (ISA) *Medicago lupulina* avec protocole final (20ml, 50% sable...)

Écotypes testés : *Medicago lupulina* A1, B4, C9, D13, E15, F17, G18, H20 (ISA)

Témoins : terre seule (réf), *Prunella vulgaris* (négatif)

13 octobre 2020 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable de quartz (lavé, marque Baumit) à une concentration de sable de 50% (v/v).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons des différents écotypes sont mélangés au substrat à une concentration de **0.2g/100ml** de terre végétale (21g/m<sup>2</sup>). Le mélange est placé dans des bécchers de 25ml à raison de **20ml/bécher**. Le mélange est humecté avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ **6ml** d'eau).

14 octobre 2020 :

Plante test : graines de cressons alénois simple, *Lepidium sativum* (UFA, Landi), sont disposées (5/bécher) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 24h dans de l'eau.

Les bécchers sont placés sans couvercle dans une chambre climatique à 20°C, temps j/n de 12h/12h, HR 50%.

19 octobre 2020 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicelle). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ».

### Résultats

|        | D13 | B4  | F17 | G18 | E15 | H20 | A1  | C9  | Prunvu | Témoin |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|--------|
| % germ | 90% | 93% | 93% | 97% | 97% | 93% | 97% | 93% | 90%    | 87%    |

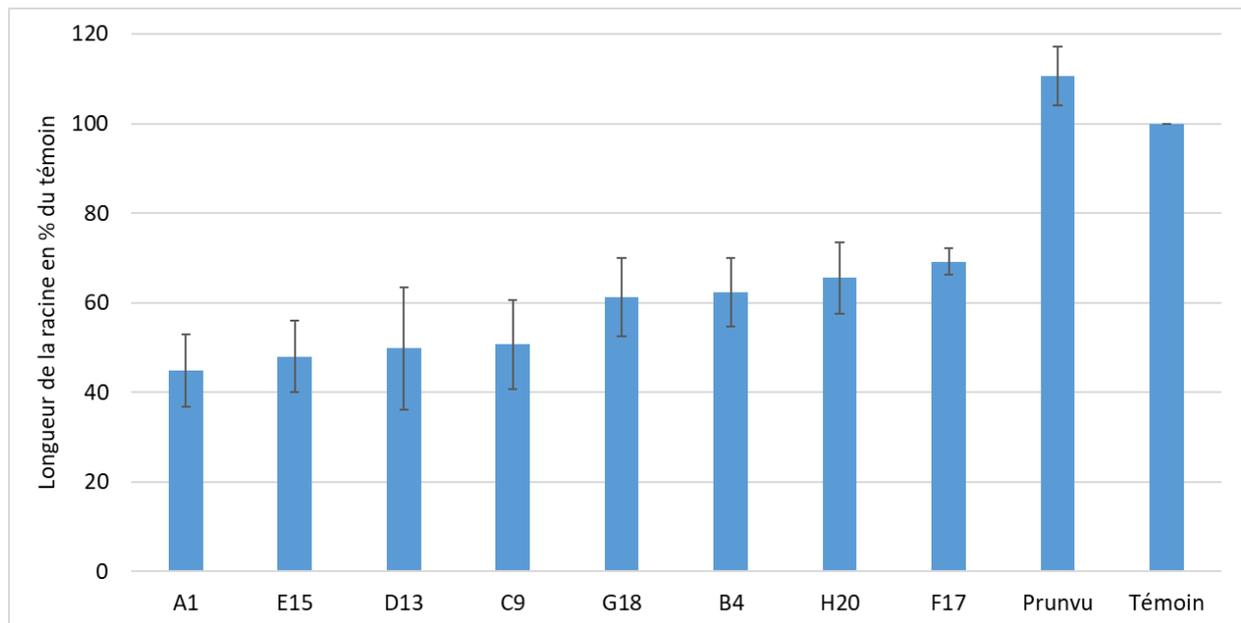


Figure 13 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 1/1) de résidus de feuilles sèches de 8 écotypes de *Medicago lupulina*, sur la longueur des racines de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne ± ESM; n=6). Concentration : 0.2g MV/100ml de substrat. Ecotypes : A1, B4, C9, D13, E15, F17, G18, H20. Témoins : *Prunella vulgaris*, *Artemisia annua*, substrat seul (Témoin).

#### Remarques

- C9 semble moins allélopathique que dans les précédents biotests, dans lesquels il est utilisé comme témoin positif. Probablement parce que dans les précédents biotests, j'ai utilisé un extrait tamisé et uniquement composé de feuilles. A tester dans B41.
- À comparer avec B24, B41

Annabelle Berthet, le 3 novembre 2020

**Biotest terre végétale multipuits (BTVM), écotypes (ISA) *Medicago lupulina* avec protocole final (20ml, 50% sable...)**

**Écotypes testés : *Medicago lupulina* A1, B4, C9, D13, E15, F17, G18, H20 (ISA)**

**Témoins : terre seule (réf), *Prunella vulgaris* (négatif)**

27 octobre 2020 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable de quartz (lavé, marque Baumit) à une concentration de sable de 50% (v/v).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Un échantillon de l'écotype C9 est tamisé pour obtenir un extrait composé uniquement de feuille, nommé « C9 feuille ». Les échantillons des différents écotypes sont mélangés au substrat à une concentration de **0.2g/100ml** de terre végétale (21g/m<sup>2</sup>). Le mélange est placé dans des béchers de 25ml à raison de **20ml/bécher**. Le mélange est humecté avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ **10ml** d'eau).

28 octobre 2020 :

Plante test : graines de cressons alénois simple, *Lepidium sativum* (UFA, Landi), sont disposées (5/bécher) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 24h dans de l'eau.

Les béchers sont placés sans couvercle dans une chambre climatique à 20°C, temps j/n de 12h/12h, HR 50%.

2 novembre 2020 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicelle). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ». Relever également le % de germination.

**Résultats**

|        |            |           |            |                   |               |               |
|--------|------------|-----------|------------|-------------------|---------------|---------------|
|        | <b>D13</b> | <b>B4</b> | <b>F17</b> | <b>G18</b>        | <b>E15</b>    |               |
| % germ | 100%       | 96%       | 98%        | 98%               | 96%           |               |
|        | <b>H20</b> | <b>A1</b> | <b>C9</b>  | <b>C9 feuille</b> | <b>Prunvu</b> | <b>Témoin</b> |
| % germ | 100%       | 98%       | 98%        | 100%              | 100%          | 100%          |

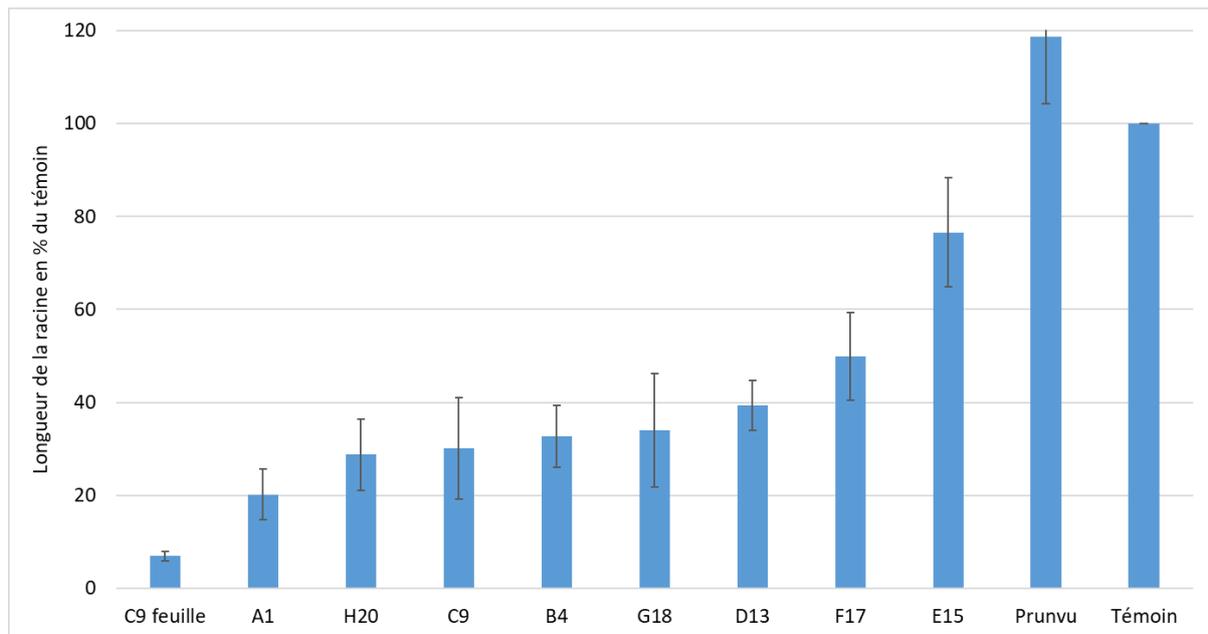


Figure 1 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 1/1) de résidus de feuilles sèches de 8 écotypes de *Medicago lupulina*, sur la longueur des radicelles de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne ± ESM; n=10). Concentration : 0.2g MV/100ml de substrat. Ecotypes : A1, B4, C9/C9 feuille uniquement, D13, E15, F17, G18, H20. Témoins : *Prunella vulgaris*, *Artemisia annua*, substrat seul (Témoin).

### Remarques

- Répétabilité : difficile de confirmer quelques choses,
- Excepté que les écotypes A1 et C9 sont généralement dans les plus allélopathiques,
- Et que l'extrait composé uniquement de feuille, ici pour C9, est beaucoup plus allélopathique que les mélanges feuille, tige et graines.

Annabelle Berthet, le 3 novembre 2020

## Biotest terre végétale multipuits (BTVM), dynamique *Bromus tectorum* en fonction de la phénologie, avec protocole final (20ml, 50% sable...)

Écotypes testés : *Bromus tectorum* à 5 stades phénologiques (print. 2020)

| Code         | n°1      | n°2      | n°3      | n°4      | n°5      |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Stade BBCH   | 29       | 59       | 65       | 79-89    | 97       |
| Date récolte | 05.03.20 | 12.04.20 | 27.04.20 | 17.05.20 | 21.06.20 |

Témoins : terre seule (réf), *Prunella vulgaris* (négatif), *Artemisia annua* (positif)

2 février 2021 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable de quartz (lavé, marque Baunit) à une concentration de sable de 50% (v/v).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Un échantillon de l'écotype C9 est tamisé pour obtenir un extrait composé uniquement de feuille, nommé « C9 feuille ». Les échantillons des différents écotypes sont mélangés au substrat à une concentration de **0.2g/100ml** de terre végétale (21g/m<sup>2</sup>). Le mélange est placé dans des béciers de 25ml à raison de **20ml/bécher**. Le mélange est humecté avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ **10 ml** d'eau).

3 février 2021 :

Plante test : graines de cressons alénois simple, *Lepidium sativum* (UFA, Landi), sont disposées (5/bécher) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 24h dans de l'eau.

Les béciers sont placés sans couvercle dans une chambre climatique à 20°C, temps j/n de 12h/12h, HR 50%.

8 février 2021 :

Ré-imbiber chaque bécher avec un peu d'eau pour faciliter l'extraction des racines du substrat. Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicule). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ». Relever également le % de germination.

### Résultats

|        | n°1 | n°2 | n°3  | n°4 | n°5  | Artannua | Prunvu | Témoin |
|--------|-----|-----|------|-----|------|----------|--------|--------|
| % germ | 98% | 98% | 100% | 96% | 100% | 98%      | 98%    | 98%    |

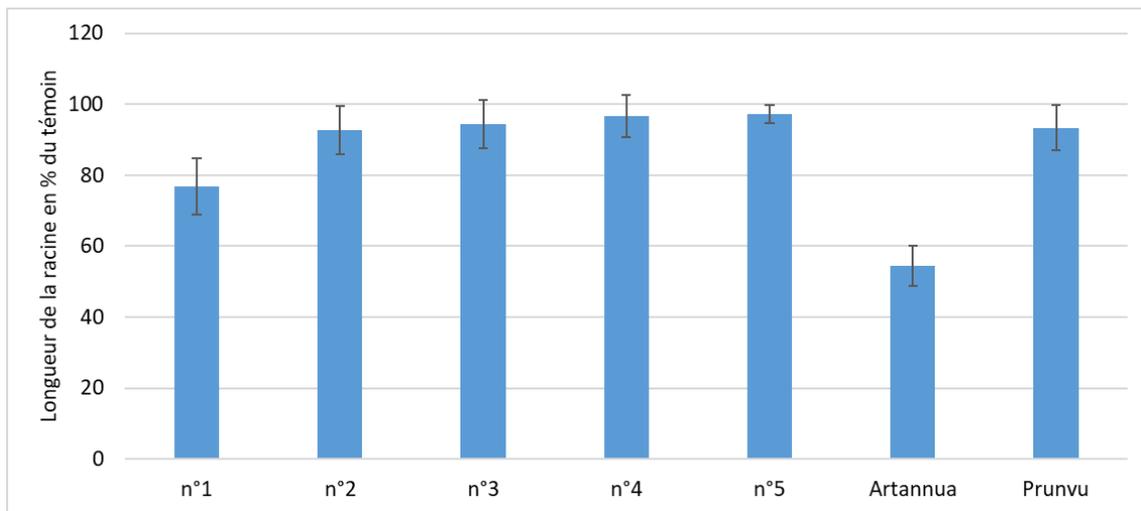


Figure 1 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 1/1) de résidus de feuilles sèches de *Bromus tectorum* à 5 stades phénologiques différents sur la longueur des racines de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne  $\pm$  ESM; n=10). Stades BBCH : n°1 = 29, n°2 = 59, n°3 = 65, n°4 = 79-89, n°5 = 97. Concentration : 0.2g MV/100ml de substrat. Témoins : Prunvu (*Prunella vulgaris* et substrat 0.2g/100ml), Artannua (*Artemisia annua* et substrat 0.2g/100ml), Témoin (substrat seul).

#### Remarques

- il semble que le pouvoir allélopathique soit le plus fort dans les stades les plus précoces, et qu'il s'estompe avec le développement de la plante.

Annabelle Berthet, le 16 février 2021

**Biotest terre végétale multipuits (BTVM), dynamique *Bromus tectorum* en fonction de la phénologie, avec protocole final (20ml, 50% sable...)**

Écotypes testés : *Bromus tectorum* à 5 stades phénologiques (print. 2020)

| Code         | n°1      | n°2      | n°3      | n°4      | n°5      |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Stade BBCH   | 29       | 59       | 65       | 79-89    | 97       |
| Date récolte | 05.03.20 | 12.04.20 | 27.04.20 | 17.05.20 | 21.06.20 |

Témoins : terre seule (réf), *Prunella vulgaris* (négatif), *Artemisia annua* (positif)

9 février 2021 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable de quartz (lavé, marque Baunit) à une concentration de sable de 50% (v/v).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Un échantillon de l'écotype C9 est tamisé pour obtenir un extrait composé uniquement de feuille, nommé « C9 feuille ». Les échantillons des différents écotypes sont mélangés au substrat à une concentration de **0.2g/100ml** de terre végétale (21g/m<sup>2</sup>). Le mélange est placé dans des béciers de 25ml à raison de **20ml/bécher**. Le mélange est humecté avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ **10 ml** d'eau).

10 février 2021 :

Plante test : graines de cressons alénois simple, *Lepidium sativum* (UFA, Landi), sont disposées (5/bécher) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 24h dans de l'eau.

Les béciers sont placés sans couvercle dans une chambre climatique à 20°C, temps j/n de 12h/12h, HR 50%.

15 février 2021 :

Ré-imbiber chaque bécher avec un peu d'eau pour faciliter l'extraction des racines du substrat. Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicule). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ». Relever également le % de germination.

**Résultats**

|        | n°1  | n°2 | n°3  | n°4 | n°5 | Artannua | Prunvu | Témoin |
|--------|------|-----|------|-----|-----|----------|--------|--------|
| % germ | 100% | 98% | 100% | 94% | 98% | 92%      | 96%    | 100%   |

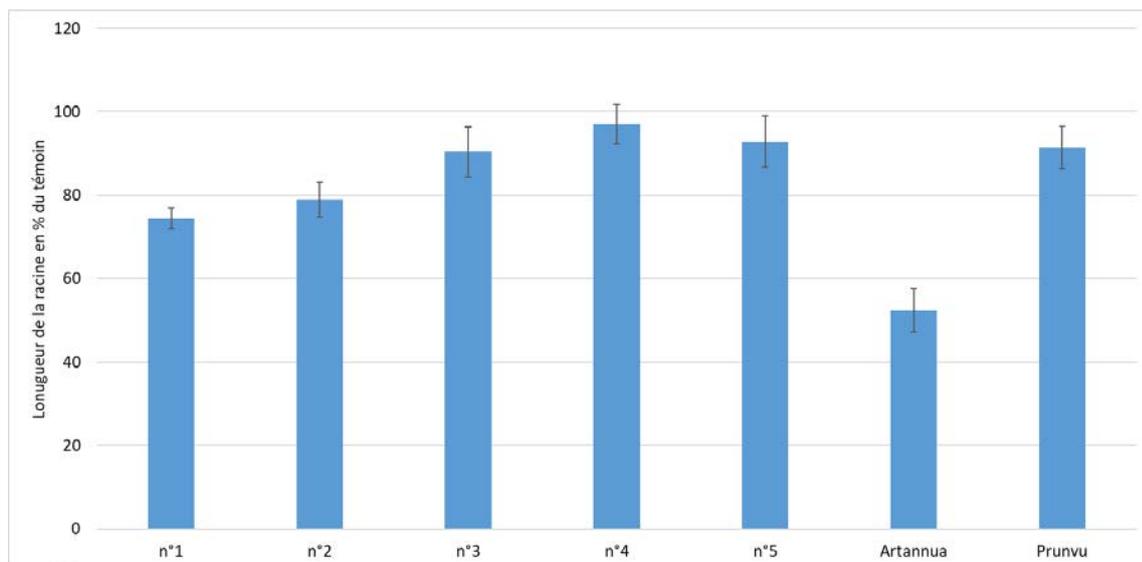


Figure 1 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 1/1) de résidus de feuilles sèches de *Bromus tectorum* à 5 stades phénologiques différents sur la longueur des radicelles de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne ± ESM; n=10). Stades BBCH : n°1 = 29, n°2 = 59, n°3 = 65, n°4 = 79-89, n°5 = 97. Concentration : 0.2g MV/100ml de substrat. Témoins : Prunvu (*Prunella vulgaris* et substrat 0.2g/100ml), Artannua (*Artemisia annua* et substrat 0.2g/100ml), Témoin (substrat seul).

### Remarques

- Dynamique similaire à celle constatée dans B42, l'allélopathie est plus forte dans les stades phénologiques précoces, et s'atténue avec le développement de la plante. Cependant les différences entre les stades phénologiques ne sont sûrement pas statistiquement différents.

Annabelle Berthet, le 16 février 2021

## Biotest terre végétale multipuits (BTVM), écotypes (ISA) *Medicago lupulina* avec protocole final (20ml, 50% sable...)

Écotypes testés : *Medicago lupulina* A1, B4, C9, D13, E15, F17, G18, H20 (ISA)

Témoins : terre seule (réf), *Prunella vulgaris* (négatif), *Artemisia annua* (positif)

16 février 2021 :

Substrat : la terre végétale (TV) est séchée 24h à l'étuve à 50°C, broyée (<2mm), puis mélangée à du sable de quartz (lavé, marque Baunit) à une concentration de sable de 50% (v/v).

Matériel végétal : les extraits de plantes sont séchés à T° ambiante, puis broyés au mixeur (tige de > 2mm retirées). Les échantillons des différents écotypes sont mélangés au substrat à une concentration de **0.2g/100ml** de terre végétale (21g/m<sup>2</sup>). Le mélange est placé dans des bécchers de 25ml à raison de **20ml/bécher**. Le mélange est humecté avec de l'eau du robinet jusqu'à saturation (environ **10ml** d'eau).

17 février 2021 :

Plante test : graines de cressons alénois simple, *Lepidium sativum* (UFA, Landi), sont disposées (5/bécher) sur le substrat humidifié. Les semences sont préalablement imbibées pendant 24h dans de l'eau.

Les bécchers sont placés sans couvercle dans une chambre climatique à 20°C, temps j/n de 12h/12h, HR 50%.

22 février 2021 :

Mesure des racines (prise en compte dès l'émergence de la radicule). Traitement des résultats en % du témoin « terre seule ». Relever également le % de germination.

### Résultats

|        |            |           |            |               |                 |               |
|--------|------------|-----------|------------|---------------|-----------------|---------------|
|        | <b>D13</b> | <b>B4</b> | <b>F17</b> | <b>G18</b>    | <b>E15</b>      | <b>H20</b>    |
| % germ | 98%        | 98%       | 100%       | 98%           | 96%             | 98%           |
|        | <b>A1</b>  | <b>C9</b> | <b>I</b>   | <b>Prunvu</b> | <b>Artannua</b> | <b>Témoin</b> |
| % germ | 96%        | 98%       | 96%        | 100%          | 98%             | 96%           |

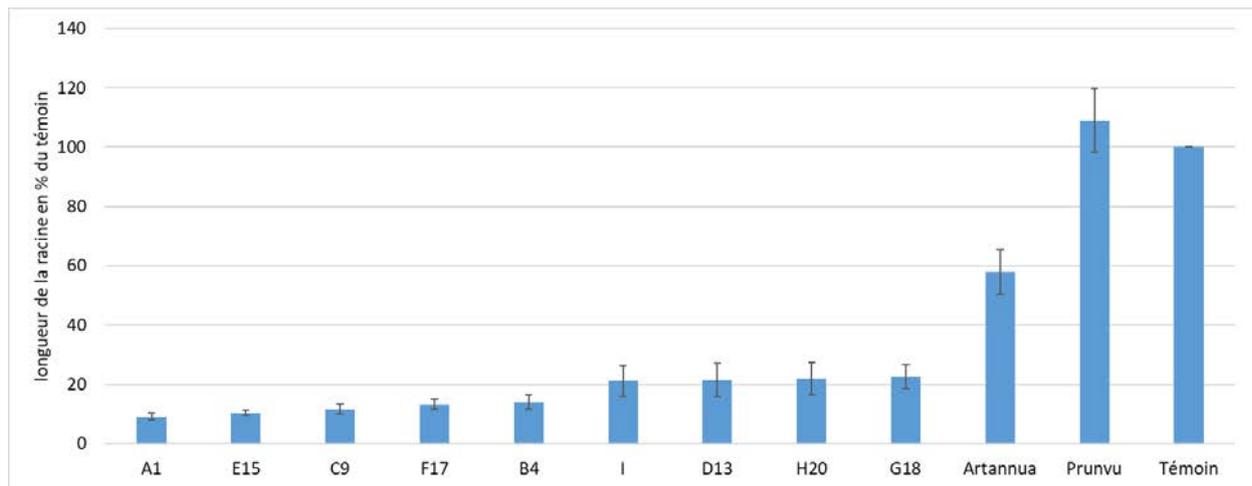


Figure 1 Effet de l'incorporation à un substrat (terre végétale+sable 1/1) de résidus de feuilles sèches de 8 écotypes de *Medicago lupulina*, sur la longueur des racines de cresson alénois (*Lepidium sativum*) (moyenne  $\pm$  ESM; n=10). Concentration : 0.2g MV/100ml de substrat. Ecotypes : A1, B4, C9, D13, E15, F17, G18, H20. Témoins : *Prunella vulgaris*, *Artemisia annua*, substrat seul (Témoin).

### Remarques

- l'écotype A1 semble être toujours dans les écotypes ayant les plus fortes propriétés allélopathiques.
- *Medicago lupulina* semble avoir d'assez fortes propriétés allélopathiques chez tous ces écotypes. Mais attention, pour rappel, attention la luzerne lupuline a tendance à capter les métaux lourds, ce qui peut provoquer une phytotoxicité de ses feuilles sèches.

Annabelle Berthet, le 22 février 2020