

15/2011-M/SN

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene

Faculté des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de **Magister** en Sciences de la Nature

Spécialité : Biologie et Physiologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée par M^{elle} **MANAA Imene**

Thème

Etude *in vivo* et *in vitro* de l'impact de deux antioxydants l' α tocophérol et l'ascorbate sur le stress oxydatif induit par un photobleaching herbicide le norflurazon appliqué à des plantules d'arachide.

Soutenu publiquement le 6 février 2011, devant le jury composé de :

Mr. AMIROUCHE R.	Maître de Conférences/A à l'USTHB	Président
Mme. ABROUS-BELBACHIR O.	Professeur à l'USTHB	Directeur de thèse
Mr. OUNANE S.M.	Professeur à l'ENSA/El Harrach	Examineur
Mr. KACI Y.	Maître de Conférences/A à l'USTHB	Examineur
Mr. DJEBBAR R.	Maître Assistant/A à l'USTHB	Invité

Remerciements

C'est un agréable devoir pour moi d'exprimer mes sentiments de profonde gratitude aux personnes citées ci-dessous. C'est grâce à la collaboration et à l'appui de chacun que mon travail a pu être élaboré.

J'adresse mes remerciements à ma directrice de thèse madame O. ABROUS-BELBACHIR Professeur à l'USTHB pour m'avoir suggéré le sujet et qui m'a soutenu et suivi pour le réaliser.

A Monsieur R. AMIROUCHE Maître de Conférences A à l'USTHB pour l'honneur qu'il nous fait en présidant les membres du jury.

A Messieurs S.M. OUNANE Professeur à l'ENSA/El Harrach et Y. KACI Maître de Conférences A à l'USTHB, qui ont accepté d'examiner notre travail, qu'ils trouvent ici, l'expression de toute notre reconnaissance.

A Monsieur R. DJEBBAR Maître Assistant A à l'USTHB.

Je remercie tout le personnel de l'ITCMI (Institut Technique des Cultures Maraîchère et Industrielles de Staoueli Alger) pour leurs aide.

J'adresse un remerciement particulier à monsieur M. BELKHALFA pour son aide.

Que tous les membres et collègues du laboratoire de physiologie végétale trouvent ici l'expression de toute ma gratitude pour leur aide.

A toute la promotion de la poste graduation 2006, je leur souhaite beaucoup de réussite.

Que toutes ces personnes ainsi que de nombreuses autres qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire reçoivent ici l'expression de mes sincères remerciements.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents, qui ont toujours répondu présents à mes appels, et m'ont encouragée et soutenue tout au long de mes études. Que Dieu les protège.

A ma soeur : Hayet

A mon frère : Billel

Imene

Résumé :

Le norflurazon est un bleaching herbicide, puissant inhibiteur de la phytoène désaturase enzyme clef intervenant dans la biosynthèse des caroténoïdes. Les caroténoïdes sont des importants quenchers de la chlorophylle triplet et de l'oxygène singulet, leur absence induit des processus photooxydatifs et réduit la photoprotection de l'appareil photosynthétique.

Le norflurazon 100 μ M seul ou en association avec l' α tocophérol (0,25mM) ou l'acide ascorbique (50mM) a été appliqué en pré-émergence sur des plantules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.).

Le norflurazon entraîne un photobleaching partiel ou total des plantules qui présentent également une réduction de leur croissance en comparaison avec les plantules témoins (longueur des tiges et des racines, masse sèche des parties aériennes et des parties racinaires, surface foliaire). Du point de vue physiologique, le norflurazon inhibe l'activité photosynthétique en diminuant la teneur en pigments photosynthétiques (caroténoïdes et chlorophylles) ainsi que la teneur en sucres solubles et en amidon. Le dosage du malonyldialdéhyde (MDA) marqueur de la peroxydation des lipides membranaires montre que sa teneur est plus élevée dans les plantules traitées suite à l'augmentation des molécules actives d'oxygène induite par l'herbicide et à la diminution de l' α tocophérol endogène. Le norflurazon diminue l'activité de la glutathion S transférase dans les racines et les feuilles des plantules d'arachide.

L'apport des deux antioxydants n'a pas permis d'atténuer les effets phytotoxiques du norflurazon même si le niveau de MDA a diminué. Par ailleurs l' α tocophérol en réduisant la peroxydation des lipides diminue probablement la formation des oxylipines dont l'acide jasmonique qui joue un rôle clef dans la signalisation.

Mots clés : norflurazon, *Arachis hypogaea*, stress oxydatif, photobleaching, peroxydation des lipides, antioxydants, α tocophérol, ascorbate, glutathion S transférase.

Abréviations

μl : microlitre
 μg : microgramme
ADN : Acide désoxyribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
BHT : Hydroxytoluène butylé
BSA : Sérum albumine de boeuf
C18 : 2 : Acide linoléique
C18 : 3 : Acide linoléique
CAT : Catalase
cm : centimètre
 cm^2 : centimètre carré
DCMU : 3, (3, 4 dichlorophenyl)-1,1-Dimethylurea
DO : Densité optique
DTNB : 5,5' -dithio-bis-2-nitrobenzoate
ERO : Espèces réactives de l'oxygène
 H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance
g : gramme
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé
g/l : gramme par litre
MDA : Malondialdéhyde
mg : milligramme
MGDG : Monogalactosyl diacyl glycerol
mM : millimolaire
ml : millilitre
MVF : Matière Végétale Fraîche
NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NFZ : Norflurazon
nm : nanomètre
nmole : nanomole
NO : Monoxyde d'azote
POX : Peroxydases
PS : Photosystème
 O_2^- : Ion superoxyde
 $^1\text{O}_2$: Oxygène singulet
 OH° : Radical hydroxyle
ROS : Reactive Oxygen Species
San : Sandoz
SH : Groupements sulfhydryles
SOD : Superoxyde dismutase
TBA : Thiobarbituric Acid
TBARS : Thiobarbituric Acid-Reactive Substances
TCA : Acide trichloroacétique
TNB : Acide 5-thio-2-nitrobenzoïque
tr/mn : tour par minute

Sommaire

Résumé

Abréviations

I- INTRODUCTION	1
II- GENERALITES	3
II-1- L'ARACHIDE	3
1-1- Origine	3
1-2- Systématique et botanique	3
1-3- Caractères biologiques	4
1-4- Utilisation	5
1-5- Exigences en sol	5
II-2- LES HERBICIDES	5
2-1- Définition	5
2-2- Classification des herbicides	5
2-2-1- Classification en fonction de la composition chimique	5
* Les herbicides minéraux	5
* Les herbicides organiques	6
2-2-2- Classification en fonction de la voie de pénétration	7
• Les herbicides de contact	7
• Les herbicides systémiques	7
2-3- Les pyridazinones	7
2-3-1- Structure chimique	7
2-3-2- Modes d'action	8
2-4- Métabolisation des herbicides	11
II-3- LE STRESS OXYDANT	12
3-1- Les espèces réactives de l'oxygène et systèmes producteurs	13
3-2- Effet délétères du stress oxydant au niveau moléculaire	14
3-2-1- Peroxydation lipidique	14
Processus de la peroxydation lipidique	15
3-2-2- Oxydation de l'ADN	17
3-2-3- Oxydation des protéines	17
II-4- LES DEFENSES ANTIOXYDANTES	17
4-1- Système antioxydant non enzymatique	17
4-1-1- Les caroténoïdes	17
4-1-2- La vitamine E ou α -tocophérol	18
4-1-3- La vitamine C ou acide ascorbique	21
4-1-4- Le glutathion	23
4-1-5- Les flavonoides	23
4-2- Système antioxydant enzymatique	24
4-3- Synergie entre antioxydants	26
III- MATERIELS ET METHODES	27
III-1- Matériels	27
1-1- Matériel végétal	27
1-2- Produits employés	27

* Norflurazon	27
* Alpha-tocophérol	28
* Acide ascorbique	28
III-2- Méthodes	29
2-1- Mise en culture et traitement des graines	29
2-2- Etude de la croissance	30
2-2-1- Mesure de la longueur de la partie aérienne et des racines	30
2-2-2- Détermination de la masse de matière végétale sèche	31
2-2-3- Mesure de la surface foliaire	31
2-3- Méthodes d'extractions et de dosages	31
2-3-1- Extraction et dosage des pigments foliaires	31
2-3-2- Extraction et dosage des sucres solubles et d'amidon	32
2-3-3- Extraction et dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr-TBA) dont le malondialdéhyde	33
2-3-4- Etude de l'activité de la glutathion s-transférase (GST)	34
2-3-5- Extraction et dosage des molécules anti-oxydantes	35
A- Alpha-tocophérol	35
B- Acide ascorbique	37
C- Glutathion	38
2-4- Analyses statistiques	39
IV- RESULTATS ET INTERPRETATIONS	40
1-Croissance et métabolisme des plantules d'arachide en présence des deux antioxydants	40
a- aspect phénotypique	40
b- croissance	40
c- aspect métabolique	41
2-1- Impact des antioxydants sur la morphologie des plantules d'arachide traitées par le norflurazon	44
2-2- Impact des antioxydants sur la croissance des plantules d'arachide traitées par le norflurazon	45
* Longueur de la partie aérienne	45
* Longueur de la racine principale	46
* Rapport longueur des racines / longueur de la partie aérienne	46
* Surface foliaire	47
* Masse de matière sèche de la partie aérienne et des racines	47
* Rapport masse sèche des racines / masse sèche de la partie aérienne	48
2-3- Impact des antioxydants sur le métabolisme cellulaire des feuilles de plantules d'arachide traitées par le norflurazon	49
2-3-1- Impact des antioxydants sur la teneur en pigments photosynthétiques des feuilles de plantules d'arachide traitées par le norflurazon	49
* Teneur en chlorophylles totales	49
* Teneur en caroténoïdes	50
* Rapport chlorophylles totales / caroténoïdes	51
2-3-2- Impact des antioxydants sur le métabolisme glucidique des feuilles de plantules d'arachide traitées par le norflurazon	51
* Teneur en sucres solubles	51
* Teneur en amidon	52
2-4- Impact des antioxydants sur la teneur en malondialdéhyde des feuilles de plantules d'arachide traitées par le norflurazon	53

2-5- Teneur en α tocophérol	54
2-6- Teneur en acide ascorbique	57
2-7- Teneur en glutathion réduit	58
2-8- Activité de la glutathion s-transférase (GST)	59
V- DISCUSSION	61
VI- CONCLUSION GENERALE	65
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	67
Liste des figures	
Liste des tableaux	

Introduction

I- INTRODUCTION :

Avec le développement de la culture et de l'élevage intensifs, les activités agricoles sont devenues un grand consommateur de pesticides dont les herbicides.

Les herbicides sont des substances chimiques utilisées pour lutter contre les plantes indésirables en vue d'une augmentation du rendement, tout en étant compatibles avec le respect de l'environnement et de la santé du consommateur (Scalla, 1991).

Les herbicides sont également utilisés dans la recherche fondamentale en tant qu'outil biochimique. En effet, l'étude des cibles cellulaires des herbicides représente un domaine de recherche familier aux physiologistes, elle a contribué et contribue encore à une meilleure connaissance de certains métabolismes cellulaires.

Les végétaux supérieurs atteints par les herbicides présentent un ensemble de transformations qui caractérisent plusieurs grands groupes de modes d'action. Ces transformations représentent soit les symptômes visibles d'une action pouvant atteindre en fait toutes les cellules du végétal, soit les manifestations d'un dysfonctionnement concernant seulement certains ensembles de cellules et engendrant ensuite un dérèglement du fonctionnement du végétal.

Un herbicide n'est efficace que lorsqu'il détruit sélectivement les adventices sans affecter la plante cultivée. La recherche de la sélectivité d'action des herbicides demeure une préoccupation des agronomes. Elle résulte d'une sensibilité différentielle à l'herbicide des plantes traitées.

L'arachide *Arachis hypogaea* appelé aussi cacahuète ou peanut est une légumineuse annuelle cultivée dans différentes régions de l'Algérie notamment dans les régions du sud. Elle constitue l'une des plus importantes légumineuses vivrières dans le monde; sa graine contient 40 à 48 % d'huile, et 25 à 30 % de protéine ce qui confère à sa culture une place de choix dans l'alimentation humaine et animale.

De plus, sa capacité à fixer efficacement l'azote atmosphérique lui permet de s'adapter aux conditions climatiques des zones semi-arides et d'assurer des productions non négligeables en gousses sur des sols à faible niveau de fertilité.

Le norflurazon est un bleaching herbicide qui a pour cible primaire la phytoène désaturase, enzyme clef intervenant dans la biosynthèse des caroténoïdes (Bramley, 1994). Les caroténoïdes sont des composés des membranes photosynthétiques impliqués dans la collecte de l'énergie lumineuse et la stabilisation des membranes plastidiales. Cependant, un des rôles les plus importants des caroténoïdes réside dans la protection de l'appareil photosynthétique de la photooxydation en éteignant « Quenching » la chlorophylle triplet évitant ainsi la formation de l'oxygène singulet (Young, 1991).

En inhibant la biosynthèse des caroténoïdes, le norflurazon engendre donc un stress oxydatif en augmentant la production de molécules réactives d'oxygène ou ROS (Jung et al., 2000) ; celles-ci peuvent provoquer une rupture de l'équilibre redox des cellules et être à l'origine de dommages au niveau des structures et des fonctions biologiques par peroxydation des lipides, dégradation des protéines et altération de l'ADN (Ribera, 1990).

Pour lutter contre les effets délétères des ROS, la plante met en place des systèmes de défense variés, chargés de capter et de neutraliser les ROS, mais aussi d'éliminer ou de remplacer les molécules endommagées ; ces systèmes peuvent être non enzymatiques (caroténoïdes, α tocophérol ou vitamine E, acide ascorbique ou vitamine C, flavonoides, le glutathion ou des systèmes enzymatiques tels les superoxydes dismutases (SOD), les catalases (CAT) et les peroxydases (POX)....(Foyer, 1993).

L' α -tocophérol, ou vitamine E fait partie des tocophérols qui sont synthétisés exclusivement par les plantes ou les cyanobactéries, au niveau des membranes plastidiales. Il est souvent considéré comme l'antioxydant le plus efficace, notamment dans la détoxification des radicaux peroxydes et alkoxydes, et donc dans la prévention des réactions en chaîne de la peroxydation lipidique. Il joue également un rôle de désactivateur de l'oxygène singulet (Fath et al., 2002 ; Cvetkovska et al., 2005 ; Kruk et al., 2005).

L'acide ascorbique intervient dans le processus de désactivation des radicaux libres tels que O_2^- , OH et H_2O_2 (Shao et al., 2008). Il possède également une fonction d'antioxydant secondaire, capable de régénérer d'autres antioxydants, tels que l' α - tocophérol et la zéaxanthine (Finckh et Kunert, 1985).

Dans les plantes, les xénobiotiques peuvent être métabolisés par des enzymes dont la glutathion s-transférase qui fixe la molécule herbicide sur le glutathion ; l'herbicide modifié n'est ainsi généralement plus toxique.

De nombreux travaux réalisés sur des mutants sous exprimant ou sur exprimant des molécules ou des enzymes antioxydantes (ou encore un apport exogène d'antioxydants comme l' α -tocophérol ou l'ascorbate) n'ont pas toujours apporté des résultats attendus : la sous expression n'a pas forcément augmenté la sensibilité au stress et la surexpression ou l'apport exogène n'ont pas systématiquement amélioré la tolérance au stress (Smirnoff, 1998 ; Foyer et Noctor, 2000 ; Arora et al., 2002 ; Edreva, 2005).

Notre travail s'est focalisé sur un stress de type chimique, en utilisant un xénobiotique du groupe des herbicides, le norflurazon. Il a pour but de comprendre et de maîtriser les mécanismes de défense et/ou de résistance des plantes vis-à-vis des herbicides. Il consiste à étudier l'impact de l'alpha tocophérol et de l'ascorbate sur le stress oxydatif induit par un herbicide : le norflurazon appliqué sur des plantules de l'arachide (*Arachis hypogaea* L.).

Au cours de cette étude, nous allons étudié les effets du norflurazon sur des plantules d'arachide par des approches physiologiques, biochimiques et métaboliques (mesure des paramètres de croissance, dosage des glucides foliaires sucres solubles et amidon, des pigments photosynthétiques, du MDA (malondialdéhyde) marqueur de la détérioration des membranes, et des molécules anti-oxydantes : α -tocophérol, ascorbate et glutathion).

La métabolisation de l'herbicide par mesure de l'activité de la glutathion s-transférase a été également étudiée.

Afin d'évaluer l'implication de deux antioxydants dans la neutralisation de la toxicité du norflurazon, nous avons étudié les mêmes paramètres en présence de l'herbicide associé à deux antioxydants exogènes l'alpha tocophérol et l'ascorbate.

Synthèse bibliographique

II- GENERALITES :

II-1- L'ARACHIDE :

1-1- Origine :

L'arachide *Arachis hypogaea* appelé aussi cacahuète ou peanut est une légumineuse annuelle cultivée dans toute la zone intertropicale allant jusqu'aux 40^{ème} parallèle nord et sud (Schilling, 2003). C'est une culture très ancienne, provenant de l'Amérique du sud. Ce sont les Portugais qui au début du XVI^e siècle ont apporté l'arachide du Brésil sur le littoral de l'Afrique occidentale (Bezpaly, 1984). Elle présente la particularité d'enterrer ses fruits après la fécondation.

L'arachide est particulièrement cultivé dans les régions arides et semi-arides d'Afrique. Selon les statistiques du ministère de l'agriculture et du développement rural, la production d'arachide en Algérie durant la période de 1995 à 2006 est en fluctuations d'une année à une autre. La plus grande production 47490qx est enregistrée en 1999.

Pour les deux dernières années, on constate une diminution nette de la production, due à un rétrécissement des superficies réservées à cette culture par rapport aux autres années.

Les surfaces dédiées à la culture de l'arachide en Algérie sont principalement localisées au Nord-Est (El-tarf, Skikda), au Sud-Est dans les Oasis (Ghardaïa) et au Sud (Adrar, El-Oued) où la nature des sols et le régime thermique répondent le mieux aux exigences de l'arachide.

1-2- Systématique et botanique :

Règne : Plantae

Embranchement : Spermatophyta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Sous-famille : Faboideae

Genre : Arachis

Espèce : *Arachis hypogaea* L

Population : Niger feuilles jaunes

Le port des plantes d'arachide cultivées est érigé ou rampant. La tige principale et les ramifications primaires peuvent atteindre 20 à 70 cm de long selon les variétés et les conditions du milieu (Clavel et Gautreau, 1997).

Le système racinaire est formé d'un pivot central qui peut s'enfoncer à plus de 1,3 m dans les sols cultivés et des racines latérales qui prennent naissance à diverses hauteurs sur ce pivot en se ramifiant abondamment (Figure 1). Les racines portent plusieurs nodosités siège des bactéries fixant l'azote atmosphérique (Bezpaly, 1984).

Les feuilles sont pennées, avec deux paires de folioles portées par un pétiole de 4 à 9 cm de long. Les folioles sont subsessiles opposées, de forme plus ou moins elliptique, de couleur verte plus ou moins foncée ou plus ou moins jaune selon les variétés.

Les fleurs sont jaunes ou orangées, papilionacées, prenant naissance à l'aisselle des feuilles.

Le fruit est une gousse portant chacune selon les variétés un nombre de graines allant de 1 à 4 (Gillier et Sylvestre, 1969 ; Schilling, 2003).



Figure 1 : Plantule d'arachide âgée de 4 semaines.

1-3- Caractères biologiques :

L'ontogenèse de l'arachide comprend trois périodes : phase végétative ou de croissance ralentie en moyenne de 30 jours ; croissance active et floraison productive de 30 à 50 jours, fructification et maturation des fruits de 30 à 50 jours.

La première phase se distingue par un développement intense du système racinaire et une faible croissance des organes aériens ; au bout de ce stade les feuilles constituent 65 % de matière sèche.

Durant l'étape de croissance active, les quantités de matières nutritives et de l'eau absorbées par les plantes d'arachide augmentent beaucoup.

L'accumulation de matière sèche va aussi en croissant et atteint le maximum 7-8 semaines après la levée.

Les premières fleurs peuvent apparaître dès 26 jours après le semis ; la floraison se poursuit environ jusqu'au 80^e jour de la végétation des plantes. A ce stade l'accroissement des organes végétatifs s'achève définitivement. Après fécondation, l'ovaire est porté en terre par le développement du gynophore (pédoncule de l'ovaire) qui s'allonge en se courbant vers la terre par géotropisme positif. L'ovaire fécondé s'y transforme en gousse de 3 à 4 cm de long, réticulée extérieurement et étranglée entre les graines (Bezpalý, 1984).

1-4- Utilisation :

La multiplicité de l'usage de l'arachide en fait une culture très appréciée dans les pays du Sud. L'arachide, plante alimentaire pour l'homme est cultivée pour ses graines que l'on consomme à l'état sec. Celles-ci constituent une source importante d'huile alimentaire de haute valeur (40-61 %) et des protéines (de 20,2 à 35,3 %).

Le tourteau d'arachide est employé dans l'industrie alimentaire et comme fourrage. Il contient 40,4 % de protéines, 32,2 % de glucides et 7 % de lipides.

Le foin d'arachide est un fourrage très riche en matières nutritives, les feuilles renferment (en % de matière sèche) : 49,6% de glucides, 24% de protéines, 2% de calcium, 0,16% de phosphore.

En tant que légumineuse sarclée, l'arachide est un bon précédent pour d'autres plantes (Bezpal, 1984).

1-5- Exigences en sol :

Les sols doivent être meubles pour permettre une pénétration aisée des gynophores et un arrachage facile à la récolte.

Les conditions les plus favorables, sont réalisées sur des sols légers, bien drainés et bien aérés, à texture grossière ou fine mais structurée. Les sols sableux conviennent le mieux (Gillier et Sylvestre, 1969 ; Schilling, 2003).

II-2- LES HERBICIDES :

2-1- Définition :

Les herbicides ou produits phytosanitaires sont des substances chimiques, minérales ou organiques qui détruisent les adventices (mauvaises herbes) en affectant une ou plusieurs de leurs fonctions vitales (Freyssinet, 1990).

Un herbicide est efficace lorsqu'il détruit spécifiquement ou sélectivement les adventices qui envahissent les cultures sans affecter la plante cultivée (Scalla, 1991).

2-2- Classification des herbicides :

Les herbicides peuvent être classés selon leur composition chimique ou selon leur voie de pénétration.

2-2-1- Classification en fonction de la composition chimique :

Il existe deux grandes classes d'herbicides :

***Les herbicides minéraux :**

Ce sont des herbicides qui ont été surtout utilisés au 19^{ème} et début du 20^{ème} siècle, tels que : Les sels d'ammonium, de cuivre et de fer et l'acide sulfurique. Les plus utilisés actuellement sont : le cyanure de calcium, le sulfate de fer et le chlorate de sodium. Depuis la deuxième guerre mondiale, les herbicides organiques ont pris le dessus.

***Les herbicides organiques :**

Ils sont classés en plusieurs familles selon leurs sites d'action

- Les inhibiteurs de la photosynthèse et de la respiration :

• **Les bipyridiles**, tel que le diquat et le paraquat interfèrent avec le transfert des électrons au niveau du PSI, ils se substituent à la ferrédoxine (Fd) (Dodge, 1982).

• **Les dinitrophénols et nitriles** agissent sur les membranes cellulaires qu'ils perméabilisent aux ions H^+ . Ce sont des découplants bloquant la synthèse d'ATP (Abrous, 1982 ; Tissut et Séverin, 1984).

• **Les triazines, les uraciles et les dérivés de l'urée tels que la DCMU**

Ces herbicides ont comme mode d'action phytotoxique principale la réduction de l'activité photosynthétique des plantes. Ils interviennent dans la réaction de Hill en empêchant les transferts d'électrons au niveau du photosystème II (PSII) en se liant au site de fixation de la quinone B (Qb) sur la protéine D1 (Krieger-Liszky et Rutherford, 1998) empêchant ainsi la réoxydation de la quinone A (Qa).

- Les inhibiteurs de la synthèse des pigments photosynthétiques :

• **Les aminotriazoles (Amitrole)** sont parmi les inhibiteurs de la formation des caroténoïdes (Sandmann et Albrecht, 1990). Ils empêchent la formation du neurosporène, de l' α et du β carotène (Burns et al., 1971).

• **Les pyridazinones** dont le norflurazon entraînent une inhibition de la synthèse des caroténoïdes, en bloquant la phytoène désaturase permettant la désaturation du phytoène en phytofluène (Bramley, 1994).

• **Les diphenyl-éthers (l'oxyfluoren et l'aclofen)** inhibent la protoporphyrinogen IX oxydase (Matringe et al., 1989) catalysant la transformation du protoporphyrinogen IX en protoporphyrin IX lors de la synthèse de la tête porphyrique de la chlorophylle.

- Les inhibiteurs de la division cellulaire :

Les dinitroanilines (Lignowski et Scott, 1972 ; Duke, 1990) les carbamates (Rhubbe-Durant, 1990 ; Lehnen et Vaughn, 1992) et les benzamides (propyzamide) (Ackashi et al., 1988 ; Peeters et Salembier, 1994) sont des herbicides antimitotiques qui inhibent la division des cellules en métaphase par action sur les microtubules au moment de la formation du fuseau.

- Les inhibiteurs de la synthèse des lipides :

• **Les cyclohexanediones** tels que la séthoxydime, les aryoxyphenoxy propionates (fops) bloquent la synthèse des acides gras par inhibition de l'acétyl coenzyme A carboxylase (Duke, 1990 ; Zagnitko et al., 2001 ; Belkebir, 2007).

- **Les thiocarbamates** sont inhibiteurs de la synthèse des acides gras à longue chaîne, et des alcanes (C₂₁ à C₃₇) constitutifs des cires cuticulaires (Kolattukudy et Brown, 1974).

- **Les pyridazinones** inhibent les réactions de désaturation des acides gras (St John, 1982 ; Willemot et al., 1982 ; Murphy et al., 1985 ; Abrous et al., 1998 ; Abrous et al., 2009).

- Les inhibiteurs de la synthèse des acides aminés :

- **Le glyphosate** bloque la synthèse des acides aminés aromatiques (Phénylalanine, tyrosine et tryptophane), par l'inhibition de l'enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase (EPSP synthétase) (Geiger et al., 1986 ; Servaites et al., 1987 ; Duke, 1990).

- **Les sulfonylurées** (le chlorsulfuron et le sulfosulfuron) inhibent la biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (Mourad et King, 1992 ; Khelifa, 2002) en bloquant l'activité de l'acétolactate synthétase (ALS).

- Autres substances à fonction herbicide :

Les herbicides auxiniques ou phytohormones de synthèse prennent la place de l'auxine vraie dans la plante, y créent des troubles et des malformations (Scalla, 1991).

2-2-2- Classification en fonction de la voie de pénétration :

• Les herbicides de contact :

Ces herbicides sont toxiques par contact racinaire tels les dithiocarbamates (Tissut et Séverin, 1984) ou foliaire cas des composés phénoliques (Abrous, 1982 ; Tissut et Séverin, 1984) ; ils sont peu ou pas transportés à l'intérieur de la plante et n'agissent qu'au voisinage de leur point d'application y provoquant l'apparition des nécroses.

• Les herbicides systémiques :

Ce sont des herbicides qui pénètrent dans la plante par voie racinaire ou par voie foliaire ou par les deux à la fois, ils sont capables d'atteindre les sites cellulaires sensibles à distance par le biais des vaisseaux conducteurs.

Le transport est alors apoplastique quand il a lieu de la racine vers les feuilles par le xylème, il s'agit d'herbicides à application racinaire et à action foliaire (triazines, urées, pyridazinones...) ou symplastique quand le transport a lieu par le phloème (amitrole, cyclohexanediones...) (Tissut et Séverin, 1984 ; Scalla, 1991).

Les herbicides qui sont transportés par les deux voies sont les phytohormones de synthèse (Picloram, Dicamba, 2.4 D) (Scalla, 1991).

2-3- Les pyridazinones :

2-3-1- Structure chimique :

Les pyridazinones (Figure 2) constituent une famille importante regroupant un certain nombre de représentants qui varient selon leur(s) substitution(s) :

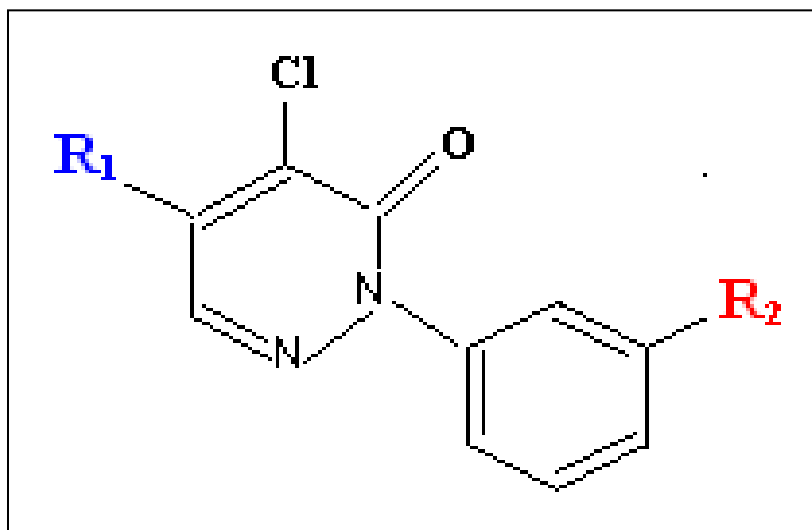


Figure 2 : Structure chimique de la famille des pyridazinones.

Les mécanismes phytotoxiques des pyridazinones dépendent du degré de méthylation de la fonction amine (R_1) et de l'absence ou de la présence d'un groupement trifluorométhyl (R_2) sur leur cycle aromatique (Scalla, 1991).

2-3-2- Modes d'action :

Les pyridazinones peuvent exercer des modes d'action divers :

Une inhibition de la fixation du CO_2 sur le ribulose 1,5 biphosphate et une photodestruction des ribosomes chloroplastiques (Duke, 1985).

Une inhibition du transfert des électrons au niveau du PSII de la chaîne photosynthétique effet analogue à celui de la DCMU (Karrapetyan, 1993), ou un blocage de la réaction de Hill sur les chloroplastes isolés ; les structures les plus actives étant le pyrazon et le metflurazon (Duke, 1985).

Une inhibition de la synthèse des caroténoïdes (Sandmann et al., 1989) et une altération de la structure et du fonctionnement du chloroplaste (Davies et Harwood, 1983) entraînant le blanchiment des feuilles ou "photobleaching".

Une perturbation de la structure des lipides polaires des chloroplastes, se manifestant au niveau de l'insaturation des acides gras liés aux galactolipides (St John, 1982 ; Abrous et al., 2009).

Le mode d'action des pyridazinones dépend de la nature et du degré de substitution (Figure 3). D'après Scalla (1991), la substitution trifluorométhyl (CF_3) sur le noyau aromatique (R_2) conférerait à la molécule chimique son effet inhibiteur sur la biosynthèse des pigments photosynthétiques.

Les pyridazinones agissent donc différemment selon la structure chimique et le degré de substitution de la molécule herbicide : la présence de la fonction amine entraîne l'inhibition de la réaction de Hill, celle de la fonction méthyl provoque le blocage de la désaturation des

acides gras et la substitution par le trifluorométhyl (CF_3) permet à la molécule d'agir sur la biosynthèse des pigments.

Néanmoins une même molécule peut agir simultanément et de façon indépendante suivant les divers types de substitution (Tableau I) et affecter divers mécanismes cellulaires à la fois.

√ Ainsi le pyrazon dont la molécule ne présente que la fonction amine inhibe seulement la réaction de Hill et le transfert des électrons photosynthétiques (Duke, 1985 ; Scalla, 1991).

√ Le San 9785 ou BASF 13 338 doté de la fonction amine inhibe également la réaction de Hill et la présence de deux groupements méthyl sur la fonction amine fait qu'il perturbe le métabolisme lipidique en inhibant la désaturation du C18 :2 en C18 :3 liée au MGDG (St John, 1982 ; Wilkinson, 1991).

√ Le norflurazon et le metflurazon exercent diverses actions du fait qu'ils présentent plusieurs substitutions : ils inhibent la réaction de Hill car ils comportent la fonction amine, ils inhibent la désaturation du C18 :2 en C18 :3 liée au MGDG (Abrous et al., 1998 ; Abrous et al., 2009) du fait de la présence de un ou deux groupements méthyl, et ils inhibent la biosynthèse des caroténoïdes (Wilkinson, 1991 ; Scalla, 1991) car ils contiennent un groupement trifluorométhyl sur le noyau aromatique.

√ Le San 9744 pyridazinone trifluoré et non méthylé inhibe fortement l'activité de l'acide gras synthétase et celle de la sn glycérol 3-P-acyltransférase (Rajasekharan et Sastry, 1987).

Tableau I : Modes d'action de certains pyridazinones selon leur degrés de substitutions.

Nom de l'herbicide	R ₁	R ₂	Effets	Références
Pyrazon ou chloridazon	NH ₂	H	Inhibition de la réaction de Hill.	Scalla, 1991
BASF 13-338 ou San 9785	N (CH ₃) ₂	H	- Métabolisme lipidique : Inhibition de la désaturation du C18: 2 en C18: 3 liée au MGDG.	St John, 1982 ; Wilkinson, 1985 ; Möllers et Albrecht, 1994
San 133 410H	NHCH ₃	H	- Inhibition de la réaction de Hill.	Scalla, 1991
Norflurazon ou San 9789	NHCH ₃	CF ₃	- Biosynthèse des caroténoïdes : inhibition de la phytoène désaturase. - Métabolisme lipidique : Inhibition de la désaturation du C18: 2 en C18: 3 liée au MGDG. - Inhibition de la réaction de Hill.	Wilkinson, 1985 Abrous et al., 1998 ; Abrous et al., 2009 Scalla, 1991
Metflurazon ou San 6706	N (CH ₃) ₂	CF ₃	- Biosynthèse des caroténoïdes : inhibition de la phytoène désaturase. - Métabolisme lipidique : Inhibition de la désaturation du C18: 2 en C18: 3 liée au MGDG. - Inhibition de la réaction de Hill.	Scalla, 1991
San 9774	NH ₂	CF ₃	- Inhibition de la sn glycérol 3-P-acyltransférase et de l'acide gras synthétase.	Rajasekharan et Sastry, 1987

Le norflurazon empêche la biosynthèse des caroténoïdes, en bloquant la "Phytoène désaturase" (Figure 3) enzyme clé de la voie de leur biosynthèse (Bramley, 1994 ; Simkin et al., 2000 ; Breitenbach et al., 2001), cette enzyme située dans l'enveloppe du chloroplaste (Joyard et al., 1998 ; Salvi et al., 2008), permet la désaturation du phytoène en phytofluène.

Les caroténoïdes étant précurseurs de l'acide abscissique, le norflurazon en inhibant la biosynthèse des caroténoïdes, réduit également le taux intracellulaire de cette hormone (Scalla, 1991) ce qui suggère une perturbation généralisée de la synthèse des terpènes (Figure 3).

Le norflurazon inhibe également la désaturation du C18 :2 en C18 :3 liée au MGDG (Abrous et al., 2009) au niveau de l'enveloppe du chloroplaste (Joyard et al., 1998).

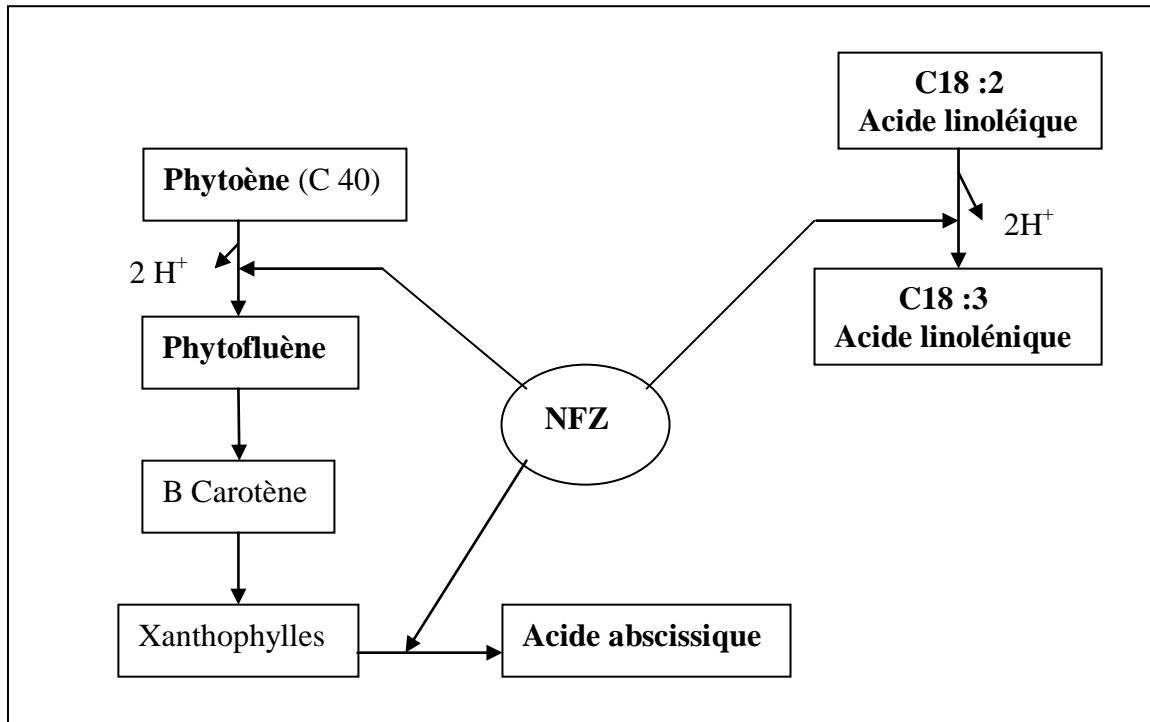


Figure 3 : Sites d'action du norflurazon au niveau de la biosynthèse des caroténoïdes et des acides gras (Abrous, 2004 (modifié)).

2-4- Métabolisation des herbicides :

Dans les plantes, les herbicides sont soumis à des réactions de métabolisation variées ; dans la plupart des cas, ils sont l'objet de toute une cascade de réactions qui vont conduire à l'accumulation d'un ou de plusieurs produits finaux, stockés dans la vacuole ou liés à des structures cellulaires (Scalla, 1991). La métabolisation des herbicides se déroule en deux phases :

Phase I :

Elle est constituée par un ensemble de réactions d'oxydations, de réductions et d'hydrolyses qui vont faire apparaître sur l'herbicide des groupes fonctionnels nouveaux (-OH, -NH₂, -COOH...). Cette phase joue un rôle important dans la mesure où elle diminue la phytotoxicité en fournissant des points d'attaques pour les réactions de la phase II.

Phase II :

Elle est représentée par des réactions de conjugaisons dans lesquelles les produits de la phase I ou bien les produits d'origine sont détoxifiés par conjugaison avec un métabolite endogène (glutathion, glucose, malonate, sulfate...). Ces conjugués sont plus solubles dans l'eau que le produit parental et sont transportés dans la vacuole (Figure 4).

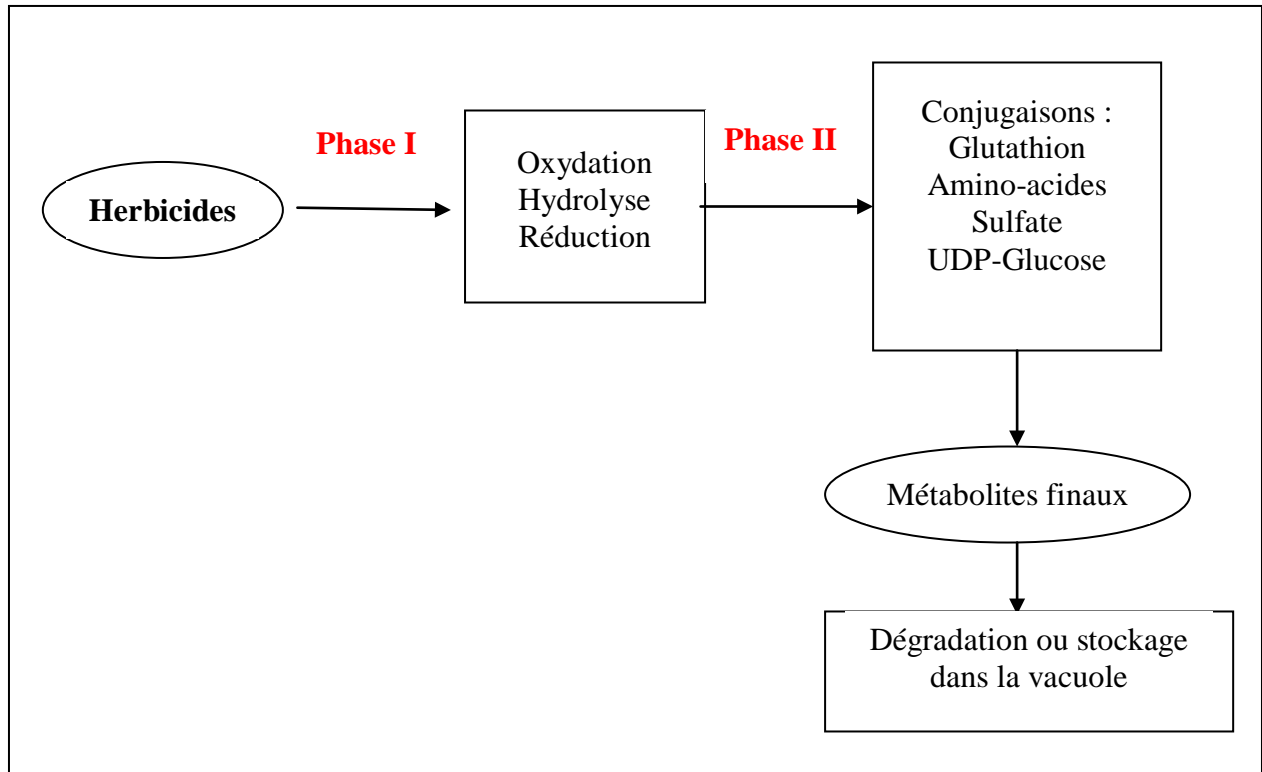


Figure 4 : Schéma de métabolisation d'un herbicide (Scalla, 1991 (modifié)).

Chez les plantes, dans de nombreux cas l'exposition à un herbicide augmente la production du glutathion et l'activité de la glutathion transférase (Fuerst et al., 1993). Cet enzyme fixe une grande quantité d'herbicides sur le glutathion.

Les glutathion S-transférases représentent une famille d'enzymes multifonctionnelles essentiellement cytosoliques, impliquées dans des opérations diverses de transports et de biosynthèses intracellulaires (George et Buchanan., 1990). Mais la fonction des GST la plus étudiée en ce qui concerne la prévention de la pollution dans l'environnement demeure leur activité de catalyse des réactions de conjugaison entre un peptide, le glutathion, et des molécules réactives comportant des sites électrophiles, capables de réagir dangereusement avec des macromolécules comme les acides nucléiques (ARN, ADN). La catalyse de cette conjugaison du glutathion avec certains substrats représente une étape dans la formation de composés qui seront moins toxiques et plus hydrosolubles que les molécules de départ (Chatterjee et Bhattacharya, 1984).

II-3- LE STRESS OXYDANT :

De nombreux herbicides engendrent un stress oxydatif en entraînant la production de molécules réactives d'oxygène, c'est le cas du paraquat ou méthyl viologène (Salin, 1987) des diphenyléther (Matringe et Scalla., 1988) et du norflurazon (Jung et al., 2000).

Le norflurazon en inhibant la biosynthèse des caroténoïdes engendre en effet la formation des molécules réactives d'oxygène (principalement l'oxygène singulet) car l'excès d'énergie de la chlorophylle triplet ne peut être évacué par manque de caroténoïdes.

Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents.

Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant ». Cette rupture d'équilibre, lourde de conséquence, peut avoir de multiples origines (Favier, 2003).

3-1- Les espèces réactives de l'oxygène et systèmes producteurs :

Différentes espèces réactives de l'oxygène sont produites dans les cellules comme l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical hydroxyle OH^{\cdot} et l'oxygène singulet 1O_2 . Ce sont des produits hautement réactifs et toxiques dérivant de l'oxygène. D'autres espèces dérivent de l'azote tels le monoxyde d'azote NO^{\cdot} (Yoshikawa et al., 2000) et le nitroperoxyde $ONOOH$ (Figure 6).

Chez les végétaux le chloroplaste est souvent considéré comme étant la principale source des ERO.

L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ est produit en faible concentration dans les mitochondries et les chloroplastes au cours du transfert des électrons.

Lors de la saturation de la chaîne de transfert des électrons dans les chloroplastes, la chlorophylle excitée peut transmettre son énergie à l'oxygène à l'état triplet (3O_2), ce qui conduit à la formation de l'oxygène singulet (1O_2) (Ait Ali, 2008 ; Bertrand, 2008).

Une autre source de radicaux oxygénés est l'activation du complexe NADPH oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anion superoxydes au niveau de la membrane cellulaire.

D'autres enzymes peuvent être la source des FAO comme certaines peroxydases, oxalate oxidases et amine oxydase (Pang et Wang, 2008).

L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ (durée de vie de l'ordre de la seconde) est très réactif et ce avec la plupart des molécules des tissus vivants. Il est rapidement dismuté par la superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 plus stable que l'anion superoxyde. H_2O_2 est éliminé par l'action de différentes enzymes comme les catalases ou diverses peroxydases (glutathion peroxydase). Le radical hydroxyle OH^{\cdot} est formé par la réaction de Fenton à partir du peroxyde d'hydrogène (Figure 5 a). C'est un radical libre extrêmement réactif, c'est également l'oxydant le plus puissant connu. Il a une durée de vie très courte, de l'ordre de la nanoseconde.

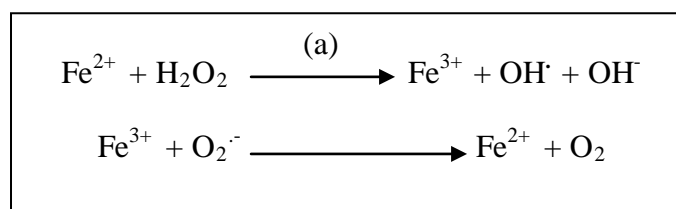


Figure 5 : Réaction d'Haber-Weiss.

L'oxyde nitrique est produit essentiellement par l'oxyde nitrique synthétase (NOS) qui catalyse la formation de NO et de L-Citrulline à partir de O_2 et de la L-Arginine.

L'association de NO et de $O_2^{\cdot-}$ aboutit à la formation d'une molécule très oxydante et réactive, d'une durée de vie assez longue, $ONOO^{\cdot-}$, le peroxyde nitrique.

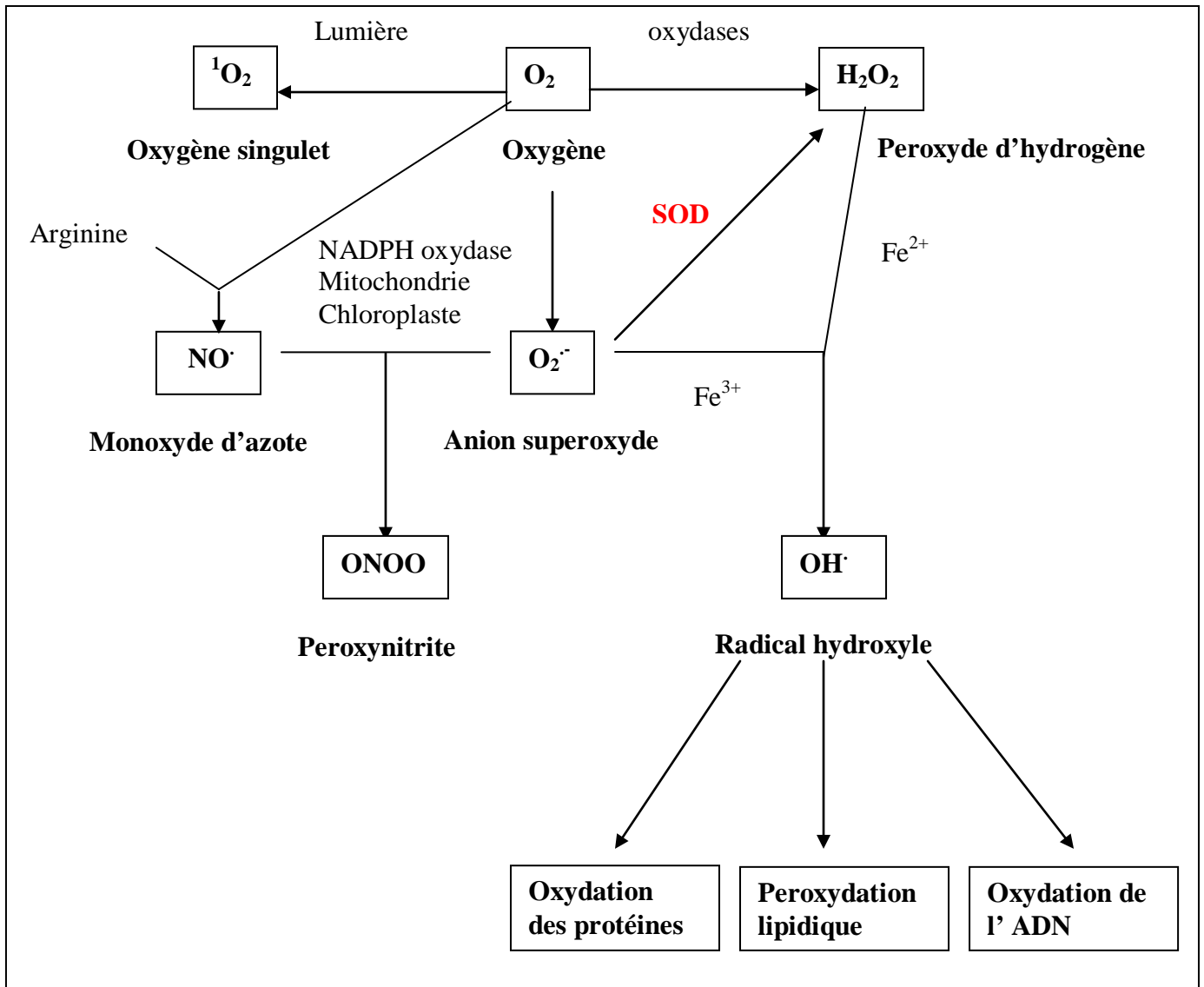


Figure 6 : Origine des différentes espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003 (modifié)).

3-2- Effets délétères du stress oxydant au niveau moléculaire :

La production de radicaux libres dans une cellule entraîne différentes conséquences cytotoxiques, dont l'inactivation des systèmes enzymatiques, la dégradation des protéines, l'altération de l'ADN et surtout la détérioration de la membrane cellulaire par attaque de ses acides gras constitutifs, ce qui se traduit par des phénomènes de peroxydation lipidique.

3-2-1- Peroxydation lipidique :

L'un des effets négatifs des molécules actives d'oxygène est la peroxydation des acides gras des lipides membranaires. Ces radicaux sont très réactifs sur les doubles liaisons lipidiques et sont à l'origine de réactions en chaîne auto catalytiques (Landrieu, 1987).

Ce phénomène est dû soit à une réaction non enzymatique (auto-oxydation) initiée par les formes réactives d'oxygène, soit à une réaction enzymatique catalysée par des lipoxygénases (LOX) (Brash, 1999 ; Feussner et Wasternack, 2002 ; Blee, 2002 ; Liavonchanka et Feussner, 2006).

Processus de la peroxydation lipidique

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, ce qui aboutit à un réarrangement intramoléculaire des liaisons insaturées. La peroxydation des lipides se fait en trois étapes distinctes : l'initiation, la propagation et la terminaison.

La phase d'initiation est le résultat de l'attaque d'un AGPI (LH) par un radical (le plus souvent due à un radical hydroxyle), conduisant à la formation d'un radical lipidique (L•). La propagation de la peroxydation lipidique commence par la formation au contact de l'oxygène d'un radical peroxyde (LOO•). Ce radical réagit avec un autre AGPI (LH), et engendre la formation d'un hydroperoxyde lipidique (LOOH) et d'un nouveau radical lipidique (L•) assurant ainsi la propagation du processus.

La réaction de peroxydation se termine lorsque deux radicaux lipidiques se rencontrent (Landrieu, 1987) (Figure 7).

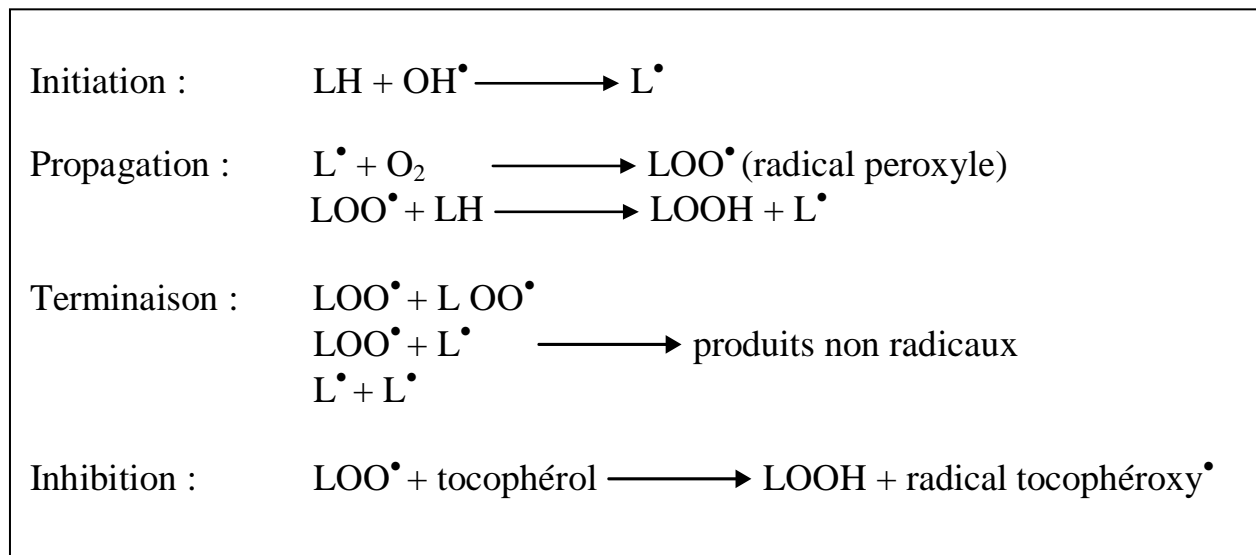


Figure 7 : Peroxydation lipidique.

L'hydroperoxyde est relativement instable et peut, en présence de fer, participer à la réaction de Fenton responsable de la formation du radical hydroxyle (OH•).

Les hydroperoxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution : être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (malondialdéhyde), acides et en alcanes (éthane, éthylène, pentane), 4-hydroxy-2-nonanal, ou les phytoprostanes, entraînant des perturbations de la micro-architecture des membranes.

La transmission en chaîne de la réaction de peroxydation lipidique peut être stoppée par la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes. Le mécanisme par lequel elle protège les lipides membranaires fait souvent appel à d'autres composés, tels que l'ascorbate et le glutathion (GSH) (Karleskind, 1992).

Les hydroperoxydes formés par la voie de la lipoxygénase peuvent être transformés par des enzymes en une vaste classe de composés appelés oxylipines telles que l'acide jasmonique qui joue le rôle de second messager dans la cascade de signalisation de la réponse de la plante à un stress.

La méthode d'évaluation de phénomène de peroxydation lipidique consiste alors à doser un des produits finaux de dégradation des acides gras, le malondialdéhyde (MDA), dont la teneur est en relation étroite avec les dégradations de la membrane cellulaire et, d'une manière générale, avec le stress oxydant subi par les cellules.

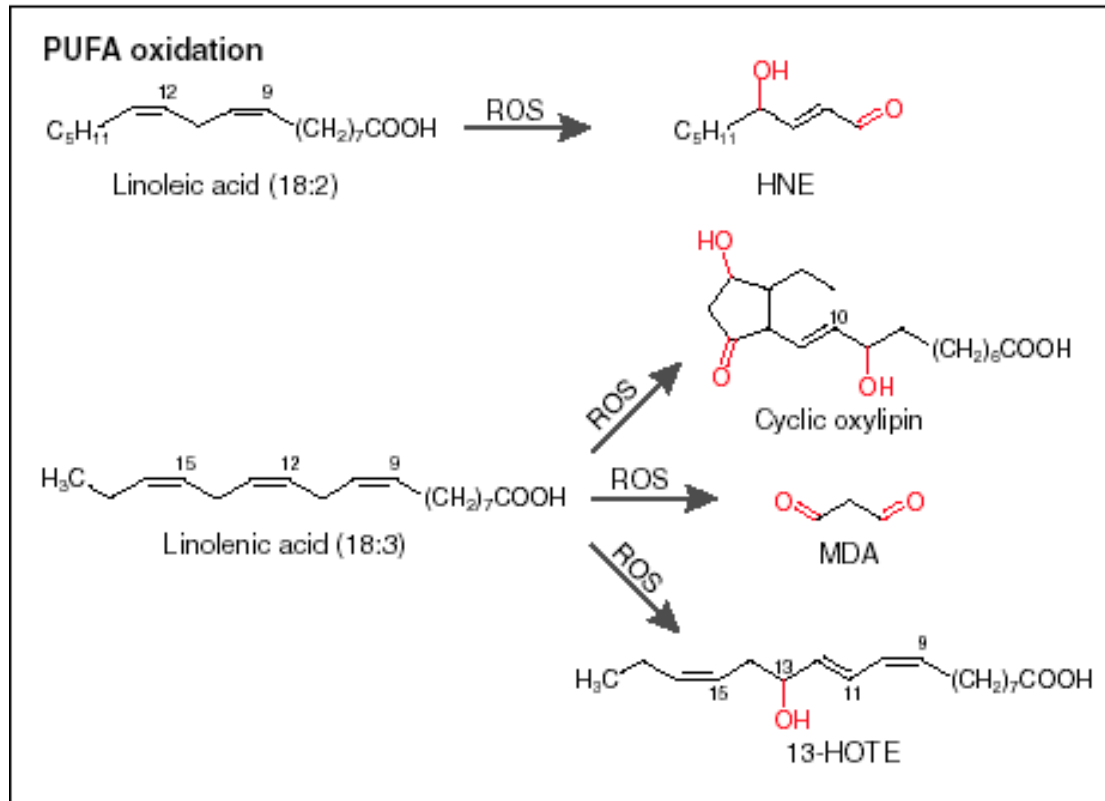


Figure 8 : Peroxydation de l'acide linoléique et linolénique (Moller et al., 2007).
 HNE : 4-hydroxy-2-nonenal ; MDA : malondialdéhyde ; 13-HOTE : acide hydroxyoctadecatriénoïque.

Les conséquences de la peroxydation des lipides membranaires sont nombreuses. Les membranes deviennent rigides, perdent leur perméabilité sélective, et sous conditions extrêmes, peuvent perdre leur intégrité. Les produits de la peroxydation (particulièrement les aldéhydes) peuvent diffuser à travers les membranes, atteindre d'autres compartiments cellulaires et interagir avec les protéines et les acides aminés. Ces interactions ont un impact important sur la dégradation des propriétés fonctionnelles des protéines.

Rappelons tout de même que la peroxydation lipidique - lorsqu'elle n'est pas induite par un élément exogène anormal - est un phénomène physiologique naturel qui intervient dans la dégradation de nombreux métabolites cellulaires (hormones, acides gras, etc.). Certains produits de la peroxydation contribuent même à l'activité des cellules, à l'adaptation des organismes aux conditions de l'environnement ou encore à la différenciation cellulaire (Ribera, 1990).

3-2-2- Oxydation de l' ADN :

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation par le OH \cdot . L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées, mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine (Favier, 2003).

3-2-3- Oxydation des protéines :

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celle qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Favier, 2003).

II-4- LES DEFENSES ANTIOXYDANTES :

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable ; mais la production peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes et l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants.

4-1- Système antioxydant non enzymatique :

Les cellules utilisent des composés antioxydants pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène comme les vitamines E (tocophérol), la vitamine C (ascorbate), les caroténoïdes, le glutathion et les flavonoïdes.

4-1-1- Les caroténoïdes :

Les caroténoïdes sont des pigments végétaux lipophiles qui possèdent plusieurs rôles au sein des membranes plastidiales. Dans les photosystèmes, ils jouent le rôle de pigments accessoires de l'antenne collectrice participant à la collecte de l'énergie lumineuse. Ils participent également à la détoxification des molécules actives d'oxygène ; en effet, ces pigments possèdent la capacité de capter l'énergie de la chlorophylle triplet ou de l'oxygène singulet (Telfer et al., 1994 ; Mozzo et al., 2008), ce qui les convertit en état triplet. Ils ont également un rôle clef dans la photoprotection en facilitant la dissipation thermique de l'énergie avec le cycle des xanthophylles (Figure 9) et en participant à la stabilisation des membranes biologiques (Tardy et Havaux, 1997 ; Havaux, 1998).

La fonction protectrice des caroténoïdes est essentielle à la survie de la plante, puisque l'interruption de la voie de biosynthèse des caroténoïdes par des bleaching herbicides (Abrous et al., 2009) conduit à un blanchiment des plantes et à terme à leur destruction (Carol et al., 1999 ; Simkin et al., 2000).

En dehors du cycle des xanthophylles, la zéaxanthine peut être présente sous forme libre dans les membranes du thylacoïde. Dans ce cas, elle semble être impliquée dans la protection des

membranes en diminuant la peroxydation des lipides membranaires et en neutralisant les ERO (Morosinotto et al., 2003).

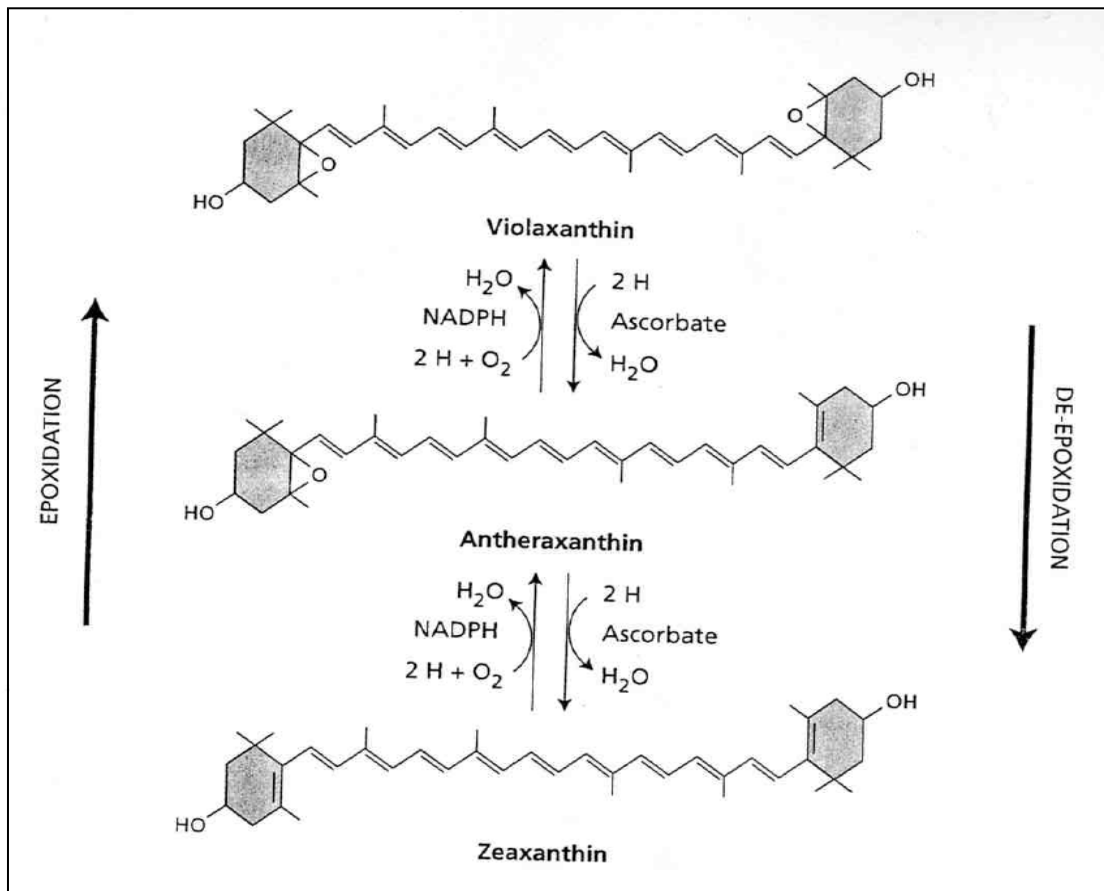


Figure 9 : Cycle des xanthophylles : La violaxanthine de-époxydase participe à la photoprotection des plantes. Sous haute intensité lumineuse, la violaxanthine est rapidement convertie en zéaxanthine, via la formation d'antheraxanthine. Cette de-époxydation est catalysée par la violaxanthine de-époxydase. Dans des conditions de faible intensité lumineuse, la réaction inverse est observée catalysée par la zéaxanthine époxydase. Ces deux réactions, constituent le cycle des xanthophylles. L'interconversion violaxanthine en zéaxanthine permet la dissipation de l'excès d'énergie empêchant ainsi la formation de l'oxygène singulet (O_2^1) (Liotenberg et al., 1999).

4-1-2- La vitamine E ou α -tocophérol :

La vitamine E a été isolée par Evans et Emerson en 1936, sa structure chimique a été établie en 1937 par Fernholz et sa synthèse a été réalisée en 1938 par Karrer (Derot et Rathery, 1972).

Le terme de vitamine E désigne un groupe de composés lipophiles possédant l'activité biologique de l' α -tocophérol. Ce groupe comprend les α -, β -, γ -, et δ -tocophérols et les α -, β -, γ -, et δ -tocotrienols. Des huit molécules composant le groupe de la vitamine E, l' α -tocophérol possède la plus grande activité biologique (Weiser et Vecchi, 1982).

La biosynthèse de la vitamine E s'effectue dans les plantes et les algues (Munné-Bosch et Alegre, 2002a).

Dans les feuilles, l' α -tocophérol a été trouvé en abondance dans l'enveloppe des plastes où il est synthétisé (Soll et al., 1985 ; Grusak et DellaPenna, 1999), dans les particules lipoprotéiques du stroma des chloroplastes où il est stocké (Vidi et al., 2005) et dans les membranes thylacoïdales (Havaux et al., 2003).

Les sources naturelles les plus importantes de l' α -tocophérol sont les germes de céréales, les légumes verts (salades, choux, épinards), certains fruits et graines oléagineuses ainsi que les huiles qui en sont issues (arachide, olive, tournesol) (Frenot et Vierling, 1996).

Structure chimique :

La structure chimique des tocophérols se compose d'un cycle chromanol mono-, di-, ou tri-méthylé auquel se trouve rattachée une chaîne carbonée latérale (chaîne phytyle) saturée de 16 carbones. Les tocophérols diffèrent entre eux seulement par le nombre et l'arrangement des groupements méthyles autour du cycle benzène du noyau chromanol (Figure 10).

La structure chimique des tocotriénols se compose également d'un cycle chromanol mono-, di- ou tri-méthylé avec chaîne carbonée latérale, mais celle-ci contient 3 doubles liaisons (Figure 10).

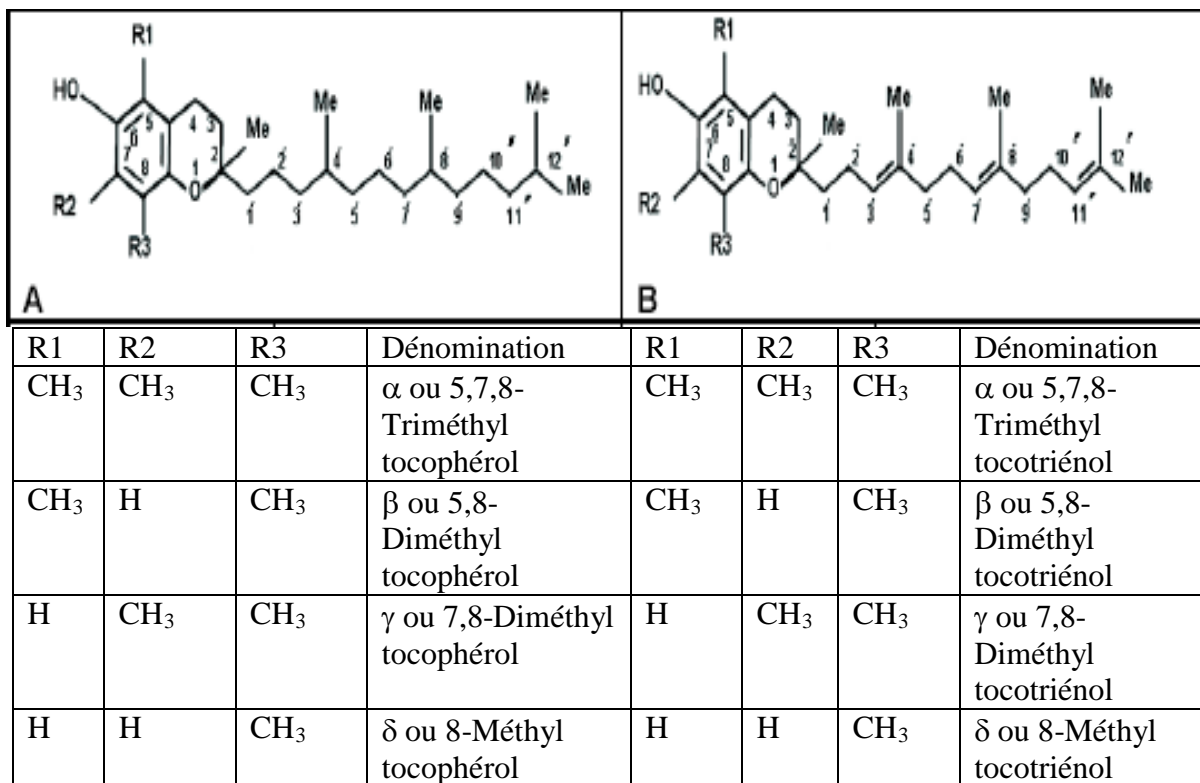


Figure 10 : Structure générale des tocophérols (A) et des tocotriénols (B) (Abbasi, 2007).

Au niveau cellulaire, ces molécules sont associées aux différentes membranes biologiques. Dans ces membranes, le tocophérol est orienté, le noyau chromanol à la surface de la membrane et la chaîne phytyle incrustée dans la bicouche lipidique. L' α -tocophérol prédomine dans les feuilles, où elle est présente à forte concentration dans les membranes du chloroplaste tandis que le γ -tocophérol est souvent la forme principale dans les graines (Grusak et DellaPenna, 1999 ; Munné-Bosch et Alegre, 2002).

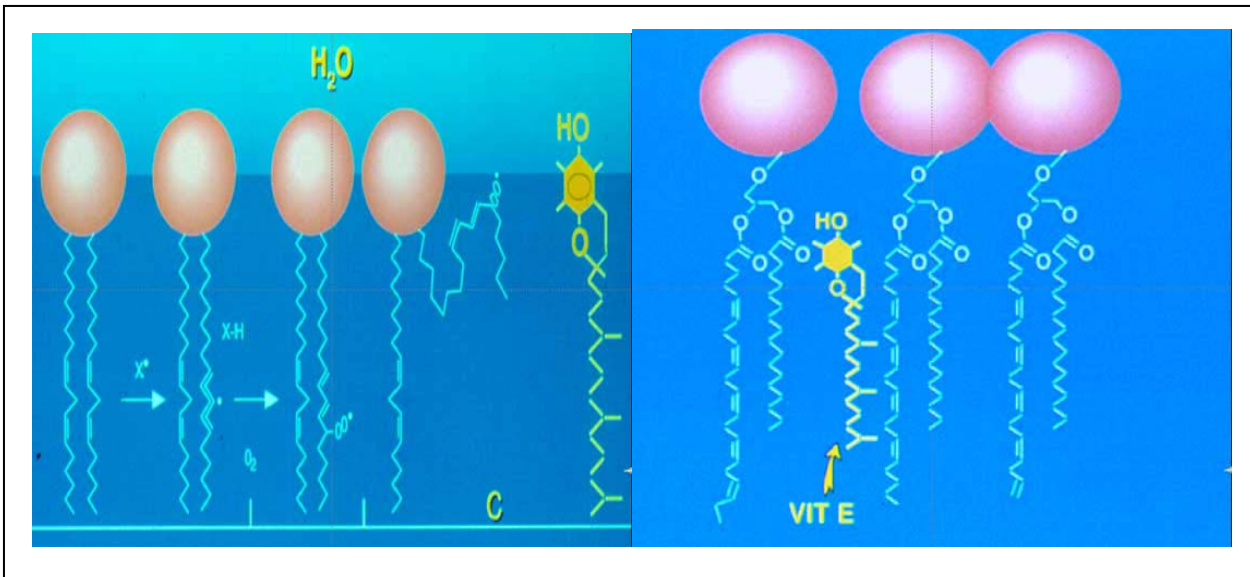


Figure 11 : Destruction membranaire et insertion de la vitamine E (Pincemail, 2003).

A- Effet stabilisateur des membranes :

La présence de la vitamine E stabilise les membranes en diminuant leur perméabilité aux ions (Quinn, 1998). La chaîne phytol de la vitamine E peut se lier aux acides gras libres et minimiser leur effet perturbateur sur la membrane (Kagan, 1989). En outre, la vitamine E dans la membrane stabilise la membrane lors des changements de température (Wassal et al., 1986).

B- Effet antioxydant :

La fonction anti-oxydante de la vitamine E chez les plantes a été démontré pour la première fois grâce à l'étude in vivo de mutants d'*Arabidopsis thaliana* exposés à des conditions de stress photo-oxydant (Havaux et al., 2005).

La vitamine E, est un antioxydant très efficace capable de piéger l'oxygène singulet et le radical hydroxyle (Krieger-Liszkay et Trebst, 2006). Sa localisation, au niveau des membranes, en fait l'antioxydant le plus important dans la prévention de la peroxydation des lipides membranaires (Fryer, 1992) protégeant ainsi l'intégrité des membranes, en particulier celles des chloroplastes ; il peut en effet réduire les peroxydes lipidiques en réagissant avec les radicaux peroxy ; la vitamine E devient alors à son tour un radical, moins réactif que le radical lipidique peroxyde (LOO^\bullet), qui pourra être pris en charge par une autre molécule antioxydante (vitamine C) et bloquer la réaction en chaîne de peroxydation lipidique (Collin et al., 2008) (Figure 12).

Il participe également à la protection de l'appareil photosynthétique en protégeant les pigments photosynthétiques (Fryer, 1992) ; tout comme il protège les protéines membranaires, en particulier leur fonction thiol contre l'oxydation par les radicaux libres (Karleskind, 1992).

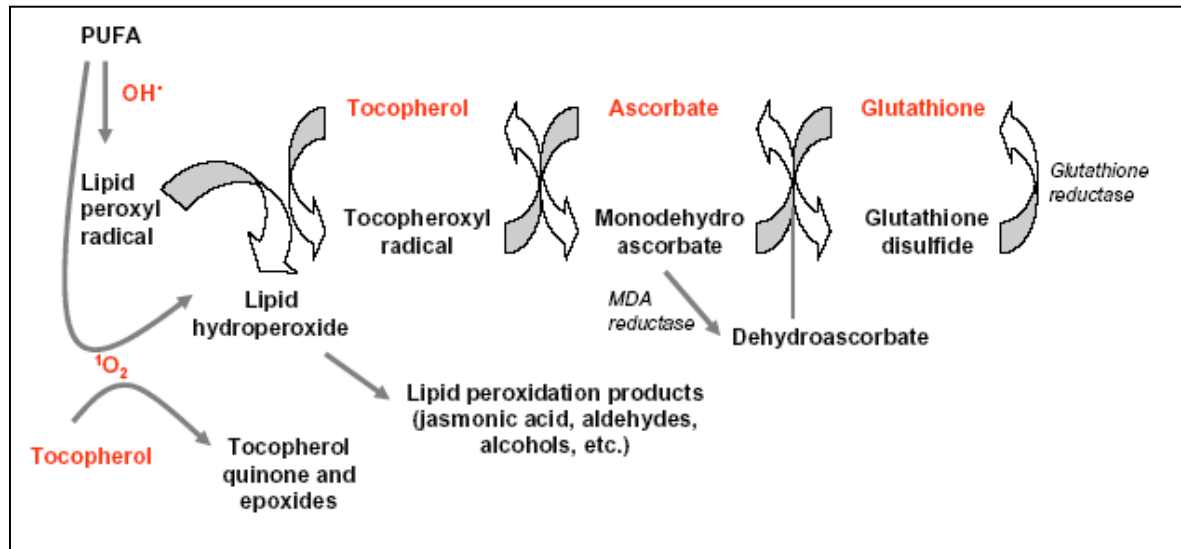


Figure 12 : Elimination des ROS et interruption de la chaîne de peroxydation des lipides par l' α tocophérol (Munné-Bosch, 2005).

Cependant, à forte concentration la vitamine E peut faire office de molécule pro-oxydante.

4-1-3- La vitamine C ou acide ascorbique :

L'isolement sous forme cristalline d'un acide ayant une activité antiscorbutique, l'acide hexuronique, fut réalisé à partir du jus d'orange, de chou et des glandes surrénales par Albert von Szent-Gyorgyi dès 1928. Cet acide fut alors nommé « acide ascorbique » ou « vitamine C » (De Tullio et al., 2004).

L'acide ascorbique comporte une fonction γ lactone, une fonction ènediol (HO-C=C-OH) support de son activité biologique qui confère à la molécule des propriétés acides (formation de sels sodique, plombique) et enfin deux fonctions alcool, l'une primaire et l'autre secondaire.

La vitamine C, ou acide ascorbique, peut être considérée comme un dérivé cyclique des hexoses. Sa caractéristique essentielle est d'exister sous trois degrés d'oxydoréduction différents : la forme réduite ou acide ascorbique, la forme semi réduite ou mono-oxydée, appelée acide mono-déhydro-ascorbique et la forme oxydée ou acide déhydro-ascorbique (Figure 13).

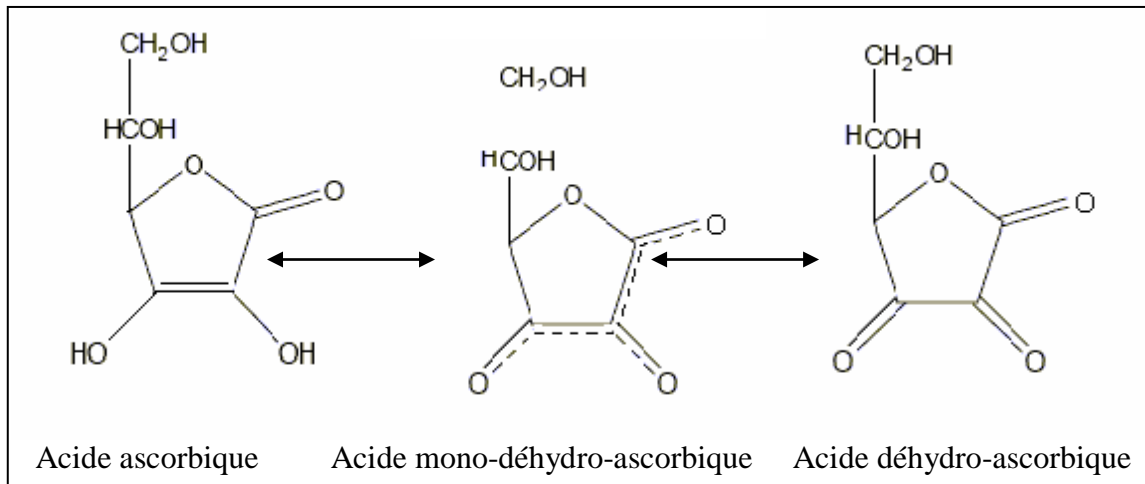


Figure 13 : Forme radicalaire, forme réduite et forme oxydée de la vitamine C (Lemerini, 2005).

Les proportions relatives d'acide ascorbique et d'acide déhydro-ascorbique sont de 90% et 10%. La forme réduite prédomine parce qu'elle est protégée par le glutathion et les composés à groupe SH.

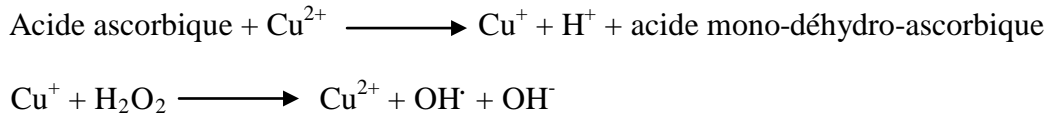
La vitamine C est présente dans pratiquement tous les végétaux. On la rencontre dans le persil, le piment, le poivron et surtout dans les agrumes et dans de nombreux autres fruits.

L'ascorbate est présent dans tous les compartiments cellulaires. Contrairement aux cellules animales, la concentration en ascorbate est très élevée dans les cellules végétales (plusieurs millimolaires) ; les chloroplastes contiennent jusqu'à 40% du pool d'ascorbate cellulaire, avec des concentrations de l'ordre de 20mM (Polle, 1997) ce qui en fait un composant incontournable chez les plantes. De nombreux travaux suggèrent que la vitamine C participerait dans de nombreux processus tels que le développement des plantes, la signalisation hormonale, l'activation du cycle cellulaire et dans l'extension de la paroi (Horemans et al., 2000).

L'ascorbate est toutefois beaucoup plus connu pour ses propriétés antioxydantes (Foyer et Noctor, 2005). En effet, il réagit rapidement avec l'anion superoxyde et l'oxygène singulet, ou encore avec le peroxyde d'hydrogène, mais cette dernière réaction est catalysée par l'ascorbate peroxydase (APX). L'ascorbate est indispensable par sa capacité à réduire d'autres antioxydants oxydés comme la vitamine E ou les caroténoïdes (Asada, 1994).

L'ascorbate (ou la vitamine C) a un rôle central dans les processus de détoxication cellulaire. L'acide ascorbique agit généralement comme anti-oxydant ; C'est un donneur d'atome d'hydrogène H qui réagit avec les radicaux libres OH^\cdot , $\text{O}_2^{\cdot-}$ les transformant en molécules non toxiques (Noctor et Foyer, 1998). Elle désactive l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ et régénère la vitamine E (Thomas et al., 1992) tout comme elle intervient dans le cycle des xanthophylles (Smirnov, 2000).

L'ascorbate peut avoir un effet prooxydant. En effet, en présence de cuivre et de fer, il favorise la formation de radicaux hydroxyls.



4-1-4- Le glutathion :

Le glutathion est un tripeptide constitué de glutamate, cystéine et glycine dont la concentration intracellulaire est importante. La fonction thiol confère au glutathion un rôle d'antioxydant, qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses espèces oxydées, et en particulier vis-à-vis de l'eau oxygénée (réaction 1) et des radicaux hydroxyles (réaction 2) (Larson, 1988). Toutefois, le rôle protecteur du glutathion semble provenir de sa capacité à réagir avec les radicaux alkoxytes, peroxytes et radicaux d'acides gras (R^\cdot) (réaction 3). Le radical thiyle GS^\cdot est ensuite dimérisé pour former le GSSG (réaction 4).



Le GSH joue aussi un rôle important dans la régénération de l'acide ascorbique via le cycle glutathion-ascorbate (Foyer et Halliwell, 1976 ; Noctor et Foyer, 1998).

Le glutathion agit comme un puissant détoxifiant des xénobiotiques par des réactions de conjugaison catalysé par l'enzyme glutathion S-transferase (May et al., 1998).

4-1-5- Les flavonoides :

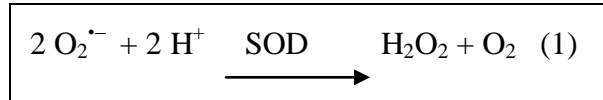
Les flavonoides sont des composés naturels qui peuvent être rencontrés dans une large variété de fruits et de légumes. Certains flavonoides présentent des actions anti-radicalaires et antioxydantes.

Les flavonoides peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène comme les radicaux superoxide, hydroxyle, peroxyte, et alkoxyte, par chélation de métaux de transition comme le fer (empêchant ainsi la réaction de Fenton) (Nikkels et al., 2005 ; Cillard et Cillard, 2006) et par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production d'ERO.

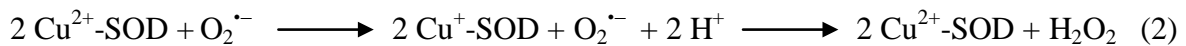
4-2- Système antioxydant enzymatique :

Trois activités enzymatiques clefs occupent une place centrale dans les mécanismes de détoxification des ROS : il s'agit des superoxydes dismutases (SOD), des catalases (CAT) et des peroxydases (POX).

Les **superoxydes dismutases**, SODs, sont responsables de la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), selon la réaction (1) :

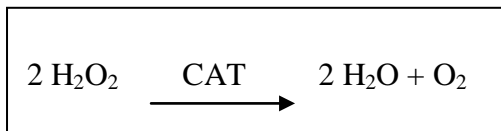


L'équation (2) décrit la chaîne catalytique typique avec le cuivre :



Ce sont des métalloprotéines existant sous différentes isoformes dont la structure est bien conservée au cours de l'évolution; le repliement tridimensionnel forme un puit hydrophobe au centre de la protéine dans lequel va se glisser l'anion superoxyde. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal divalent situé au cœur de l'enzyme. Selon la nature de ce métal on distingue plusieurs SOD dans divers compartiments cellulaires : les superoxyde-dismutases à manganèse (Mn-SOD) localisées dans les mitochondries, les superoxyde-dismutases à cuivre-zinc (Cu/Zn-SOD) localisées dans le cytosol, le chloroplaste, le peroxysome et l'apoplaste (Bowler et al., 1992 ; Soares, 2005) et enfin, les superoxyde-dismutases à fer ferreux (Fe-SOD), localisées dans le chloroplaste.

Les **catalases**, CATs, sont contenues dans les peroxysomes. Leur rôle est de catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



Les **peroxydases**, POX, permettent, comme les catalases, la réduction de H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire. Cependant, à la différence des catalases, les POX nécessitent la présence d'un substrat particulier pour réaliser leurs activités. Deux types principaux de « molécules anti-oxydantes » sont utilisés comme substrat par les peroxydases : l'acide ascorbique (AA) et le glutathion (GSH). Ces deux molécules participent au cycle « ascorbate/glutathion » (Noctor et Foyer, 1998 ; Foyer et Noctor, 2000), dont la première étape consiste en une réduction du peroxyde d'hydrogène en H_2O , couplée à une oxydation de l'ascorbate en monodéhydroascorbate (MDHA) ; cette étape est catalysée par l'ascorbate peroxydase (APX). Pour permettre la poursuite de cette réaction, l'ascorbate oxydé doit être à nouveau réduit. Pour cela, deux voies (directe et indirecte) de régénération de l'ascorbate coexistent : La réduction directe du MDHA par la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) via l'oxydation d'une molécule de NAD(P)H. Le MDHA est une molécule

relativement instable qui a tendance à se dismuter spontanément en déhydroascorbate (DHA) et ascorbate.

La seconde voie de régénération de l'ascorbate consiste donc en une réduction du DHA par la déhydroascorbate réductase (DHAR), couplée à une oxydation du GSH. Enfin, le glutathion oxydé, produit au cours de cette dernière réaction, est régénéré en GSH grâce à la glutathion réductase (GR).

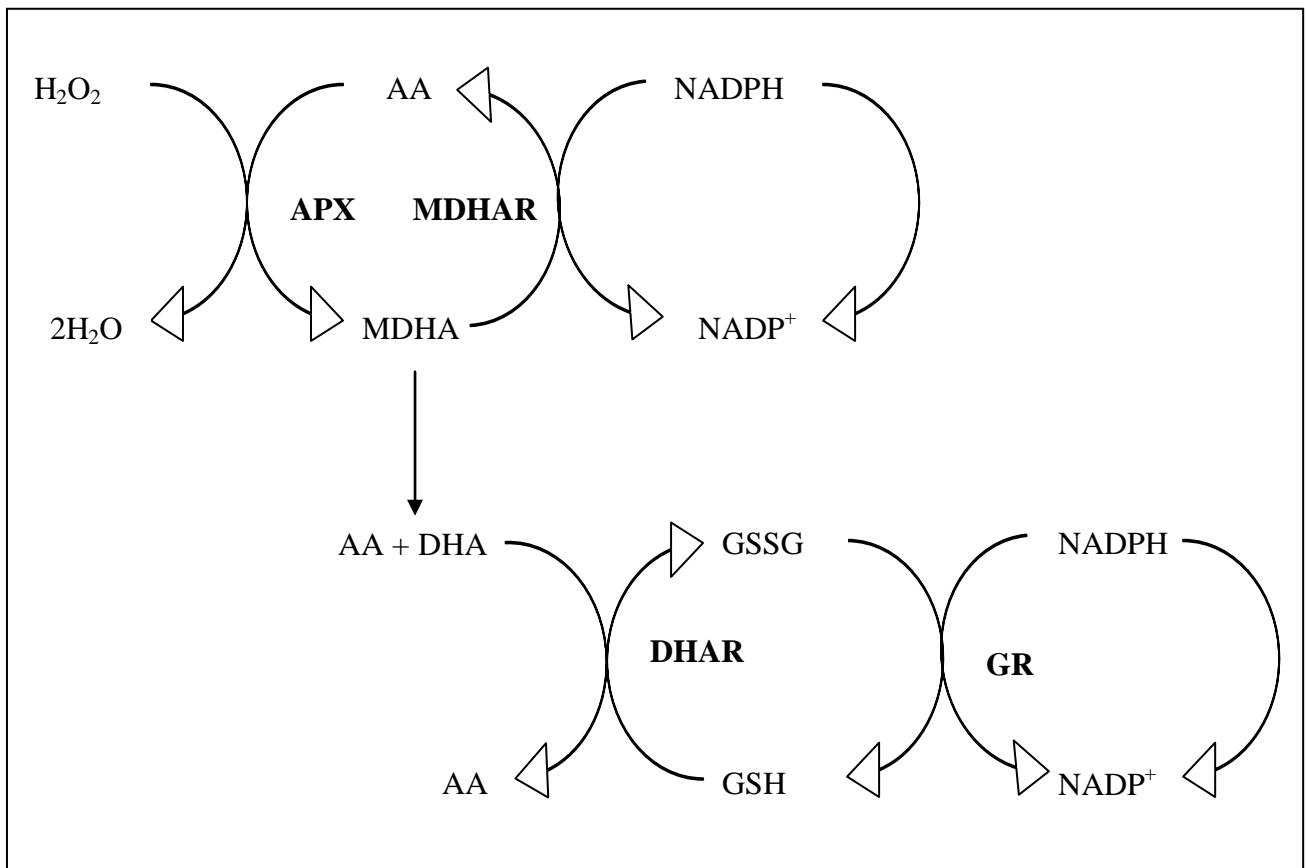


Figure 14 : Cycle Ascorbate-glutathion. APX, ascorbate-péroxydase ; MDHAR, monodehydroascorbate réductase ; DHAR, déhydroascorbate réductase ; GR, glutathion réductase (May et al., 1998 (modifié)).

La **glutathion peroxydase** lutte contre le peroxyde d'hydrogène ou catalyse la réaction de transformation des hydroperoxydes de lipide en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur.

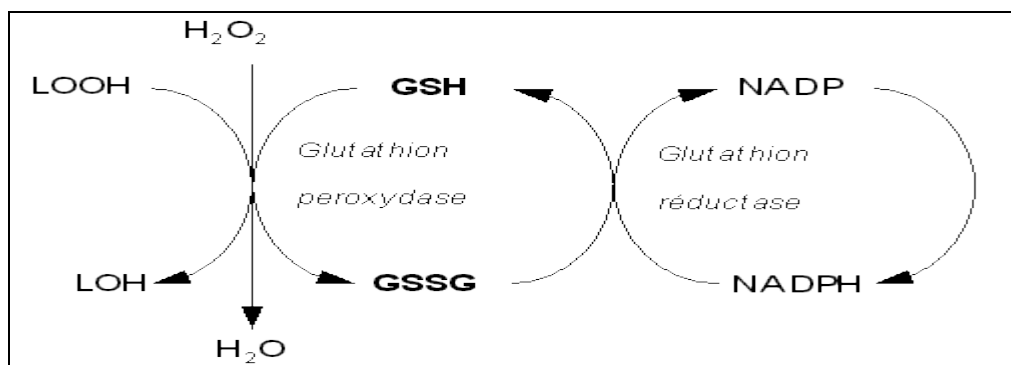


Figure 15 : Mécanisme fonctionnel de la glutathion peroxydase.

4-3- Synergie entre antioxydants :

Il existe des interactions synergiques entre les caroténoïdes, les tocophérols et l'ascorbate dans la protection contre la peroxydation lipidique (Krinsky et Yeum, 2003 ; Wrona et al., 2004).

Les caroténoïdes (CAR) peuvent réagir avec les radicaux peroxydes (ROO^\bullet) pour produire des hydroperoxydes et des radicaux caroténoïdes (CAR^{++}). Le radical caroténoïdes (CAR^{++}) pourrait alors être régénéré soit par le tocophérol (TocOH) ou l'ascorbate (Asc). Le radical tocophéryl (Toc^\bullet) est réduit par l'ascorbate (Asc) avec production de monodehydroascorbate (MDHA) (Figure 16).

L'interaction entre les caroténoïdes et les tocophérols dépend de la capacité de la tête chromanol située à la surface de la membrane à interagir avec les radicaux caroténoïdes.

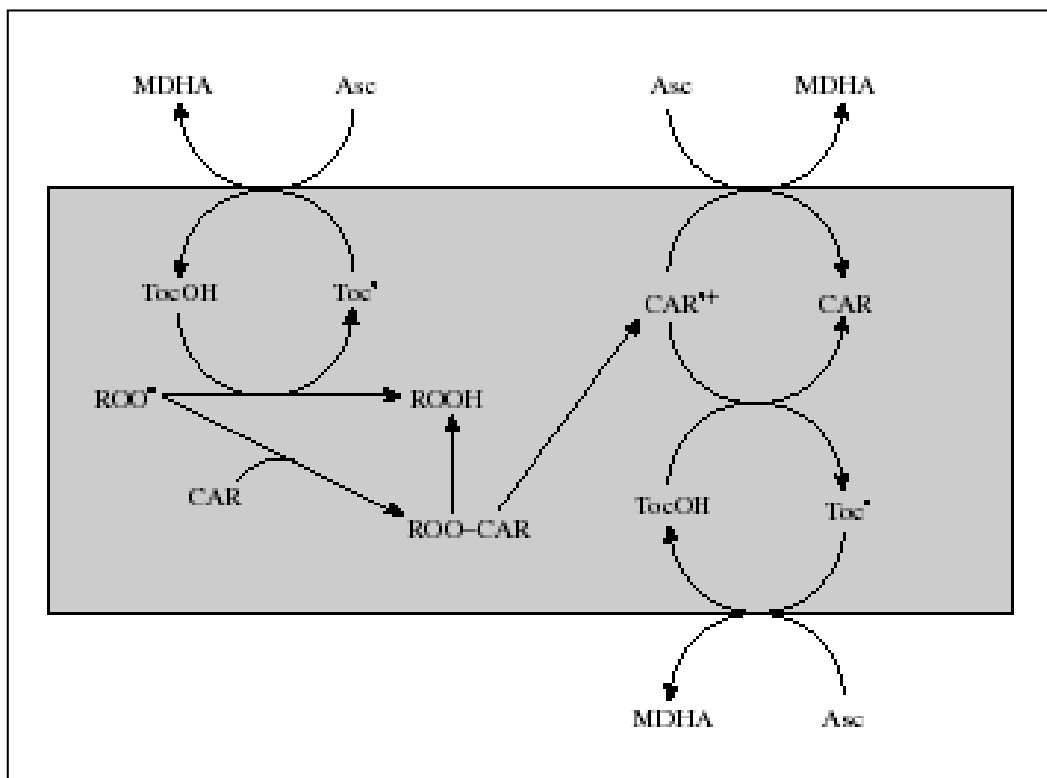


Figure 16 : Interactions entre les caroténoïdes, les tocophérols et l'ascorbate (Smirnoff, 2005).

Matériels et méthodes

III- MATERIELS ET METHODES :

III-1- Matériels :

1-1- Matériel végétal :

L'étude effectuée a porté sur l'arachide (*Arachis hypogaea* L.), population Niger feuilles jaunes, plante herbacée annuelle de la famille des Fabaceae (légumineuses).

Les gousses ont été fournies par l'ITCMI (Institut Technique des Cultures Maraîchère et Industrielles de Staoueli Alger).



Figure 17 : Graines de la population Niger feuilles jaunes de l'arachide.

1-2- Produits employés :

* Norflurazon :

Le norflurazon : 4-chloro-5-méthylamino 2 α, α, α , trifluoro-méthyl-phényl 3-(2H) pyridazinone appelé encore SAN 9789 est un bleaching herbicide d'origine suisse (SANDOZ) commercialisé sous le nom de "ZORIAL".

Formule chimique et quelques propriétés du norflurazon	
Formule chimique	
Formule brute	$C_{12} H_9 Cl F_3 N_3 O$
Poids moléculaire	303,7 g
Solubilité dans l'eau (23°C)	28 mg/l

Cet herbicide qui appartient à la famille des pyridazinones, est un produit agropharmaceutique, phytosanitaire non inflammable, il se présente sous forme d'une poudre cristalline, de couleur marron, soluble dans l'eau, dans l'alcool éthylique ainsi que dans l'acétone.

Il est efficace sur les graminées et un certain nombre de dicotylédones annuelles (soja, vigne, coton, arachide,...) et biennuelles, sa durée de vie et sa stabilité au stockage sont approximativement 4 ans, lorsqu'il est conservé dans son emballage d'origine, dans un endroit sec et à une température de 25°C (INPV, Index phytosanitaire, 1993).

La dose préconisée au champ est de 2000g/ha.

*** Alpha-tocophérol :**

L' α -tocophérol ou 2-5-7-8 tétra-méthyl 2 (4' 8' 12' triméthyl tridécyl) chromane 6 ol, encore appelé 5,7,8 triméthyl tocol, de formule chimique brute $C_{29} H_{50} O_2$, possède la plus abondante distribution naturelle et la plus grande activité biologique (Landrieu, 1987 ; Ouarkoub et Mamou, 2000).

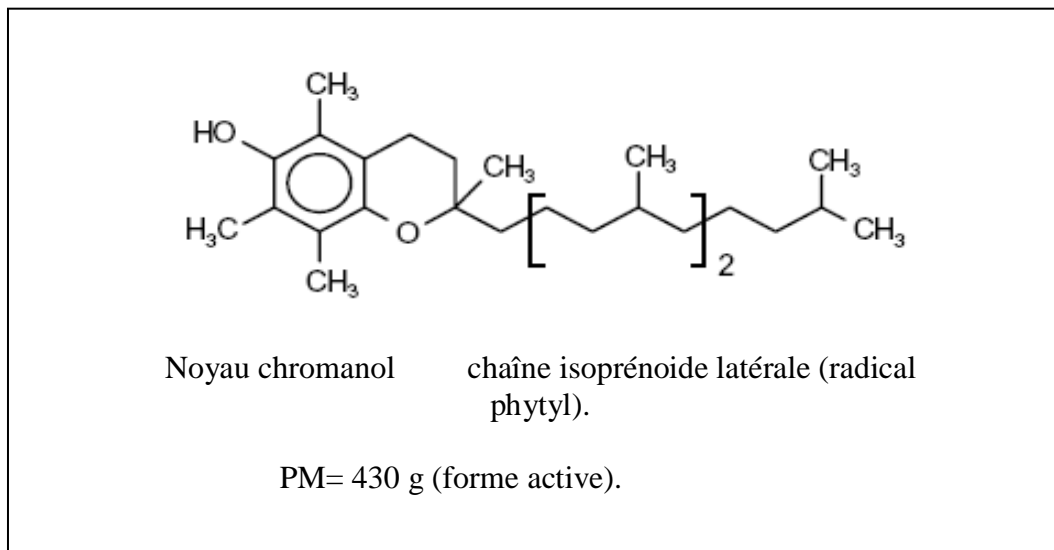


Figure 18 : Structure de l' α -tocophérol.

C'est un liquide huileux, limpide, incolore ou brun-jaune, visqueux, pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'acétone, l'éthanol, l'éther, le dichlorométhane et les huiles (British pharmacopoeia, 1986).

Les tocophérols, en absence d'oxygène, sont stables à la chaleur et à la lumière, mais, en présence d'oxygène, malgré leurs propriétés anti-oxydantes, ils s'oxydent pour former une quinone.

Les tocophérols sont produits à des concentrations allant de 1 μ g/g de poids sec à > 1mg/g de poids sec (Munné-Bosch et Alegre, 2002a).

*** Acide ascorbique :**

L'acide L-ascorbique ou oxo-3-gulofuranolactone a une structure apparentée à celle des hexoses. De formule brute $C_6H_8O_6$, avec un poids moléculaire de 176,13 g/mol.

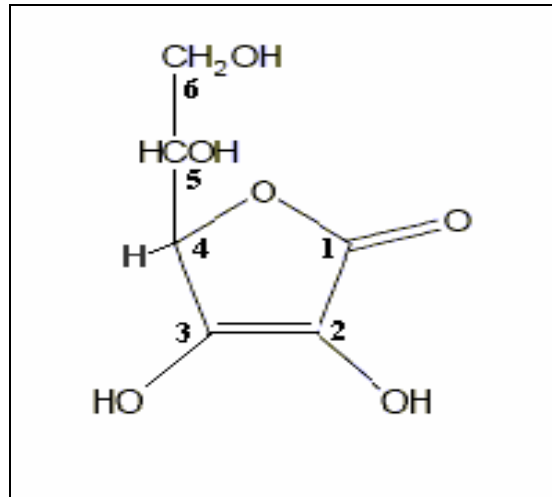


Figure 19 : Structure de l'acide ascorbique.

L'acide ascorbique est une poudre cristalline, blanche à légèrement jaune, inodore, très sensible à la lumière et à la chaleur, s'oxyde facilement, de saveur légèrement acide et qui se décompose à température élevée.

Il est facilement soluble dans l'eau, moins soluble dans l'alcool (Marez et al., 2004).

La concentration en acide ascorbique est très élevée dans les cellules végétales (plusieurs millimolaires), dans le stroma des chloroplastes il appartient à la gamme de concentrations (20-300mM) (Foyer et Lelandais, 1996 ; Patricia et al., 1996 ; Bertrand, 2008).

III-2- Méthodes :

2-1- Mise en culture et traitement des graines :

Les graines d'arachide sont désinfectées avec l'hypochlorite de sodium à 12° pendant dix minutes, rincées plusieurs fois à l'eau, puis imbibées dans de l'eau distillée pendant trois heures.

Les graines sont ensuite mises à germer dans des bacs doublement tapissés de papier absorbant et arrosées avec de l'eau distillée.

Les bacs sont recouverts d'un film plastique afin de maintenir une humidité saturante.

Dès la percée de la radicule, elles sont transférées dans des pots contenant la terre, à raison de trois plantules par pot.

Six lots sont ainsi constitués

Lot T : Les pots sont arrosés avec 20 ml d'eau distillée

Lot N : Les pots sont arrosés avec 20 ml de la solution aqueuse de Norflurazon 10^{-4} M

Lot NE : Les pots sont arrosés avec 20 ml de la solution aqueuse de Norflurazon 10^{-4} M contenant l' α tocophérol 0,25mM

Lot NC : Les pots sont arrosés avec 20 ml de la solution aqueuse de Norflurazon 10^{-4} M contenant l'acide ascorbique 50mM. Ces doses ont été choisies sur la base de l'aspect morphologique des plantules soumises à des concentrations variables d' α tocophérol et d'acide ascorbique. Et la dose de l'acide ascorbique utilisé appartient à la gamme de concentrations présente dans le stroma des chloroplastes (20-300mM) (Foyer et Lelandais, 1996).

Lot TE : Les pots sont arrosés avec 20 ml de la solution aqueuse d' α tocophérol 0,25mM

Lot TC : Les pots sont arrosés avec 20 ml de la solution aqueuse d'acide ascorbique 50mM
A partir du 2^{ième} jour les pots témoins et essais sont arrosés avec un volume d'eau.
La croissance a lieu dans une chambre de culture à 27°C.
Les différentes analyses sont réalisées sur des plantules âgées de 4 semaines.

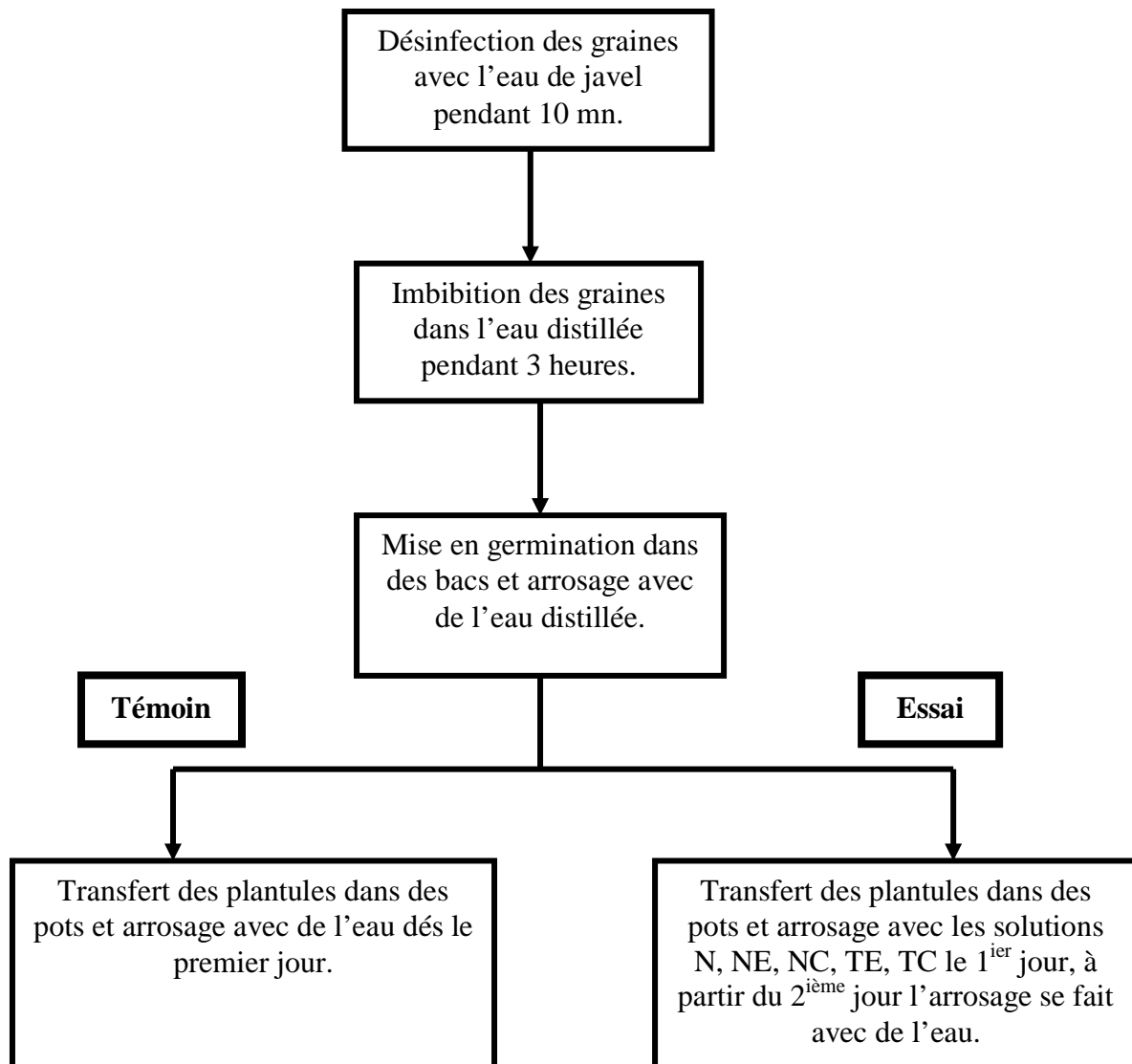


Figure 20 : Mise en culture des graines d'arachide et mode de traitement.

2-2- Etude de la croissance :

2-2-1- Mesure de la longueur de la partie aérienne et des racines:

La longueur des racines et des tiges a été mesurée soigneusement à l'aide d'un papier millimétré. Les mesures des racines ont été réalisées après avoir déterré les plantules et laver les racines.

Chaque donnée représente la moyenne de 12 individus, elle est exprimée en centimètres.

2-2-2- Détermination de la masse de matière végétale sèche :

La masse de matière sèche est obtenue après dessiccation totale des parties aériennes et des racines dans l'étuve réglée à 60°C. Les parties aériennes et les racines desséchées sont par la suite pesées à l'aide d'une balance de précision 0,1mg.

2-2-3- Mesure de la surface foliaire :

La surface foliaire est calculée comme suit :

- 1 cm² d'un papier calque est pris, puis pesé à l'aide d'une balance de précision (0,1mg).
- La forme de la feuille est dessinée sur le même type de papier, découpée puis pesée.
- La surface foliaire (X) est déduite par la formule suivante :

$X = \frac{mf}{mp}$	<p>mf : masse du papier découpé mp : masse de 1 cm² du papier</p>
---------------------	--

Une moyenne de 3 surfaces foliaires est établie et les résultats sont exprimés en cm².

2-3- Méthodes d'extractions et de dosages :

Les différentes extractions sont réalisées à partir des feuilles des différents lots de plantules : plantules témoins, plantules mises en contact de l'herbicide seul et en présence d'α tocophérol ou d'acide ascorbique, plantules témoins en présence d'alpha tocophérol et plantules mises en présence de vitamine C. Chaque extraction est répétée trois fois.

2-3-1- Extraction et dosage des pigments foliaires :

La matière végétale fraîche (M V F) (un foliole) est broyée à sec puis dans 10 ml d'acétone à 80 % ajoutés par petite quantités. Le broyat est centrifugé à 4500 tr/mn pendant 10 mn. Le surnageant qui contient les pigments est récupéré, l'absorbance est lue au spectrophotomètre aux longueurs d'ondes suivantes : 647 nm et 663 nm pour les chlorophylles a et b et 470 nm pour les caroténoïdes.

La teneur en chlorophylles et en caroténoïdes est déterminée selon les équations de Lichtenthaler (1987).

• Chl a = 12,25 . DO (663) – 2,79 . DO (647)	µg / ml
• Chl b = 21,50 . DO (647) – 5,10 . DO (663)	µg / ml
• Chl (a+b) = 7,15 . DO (663) + 18,71 . DO (647)	µg / ml
• Caroténoïdes = $\frac{1000 \cdot \text{DO} (470) - 1,82 \cdot \text{Chl a} - 85,02 \cdot \text{Chl b}}{198}$	µg / ml

Les teneurs en pigments foliaires sont exprimées en mg/g de MVF (feuille) pour les chlorophylles et en µg/g de MVF pour les caroténoïdes.

2-3-2- Extraction et dosage des sucres solubles et d'amidon :

Les sucres solubles et l'amidon sont dosés selon la méthode de Mc Ready et al (1950), qui consiste à utiliser l'acide sulfurique à 91% lequel transforme à chaud les glucides en furfural et dérivés furfuriques. L'anthrone en milieu sulfurique et à chaud se condense avec le furfural et ses dérivés pour donner des complexes colorés en vert-bleu en présence des hexoses.

Les sucres solubles sont extraits à partir de 0,5 g de matière végétale fraîche. Les feuilles sont broyées à sec puis dans 5 ml d'éthanol bouillant à 80%, après agitation, le broyat est centrifugé pendant 20 mn à 5000 tr/mn et le surnageant récupéré. Cette opération est répétée deux fois en lavant le culot à chaque fois avec 5 ml d'éthanol bouillant à 80%. Les deux surnageants sont mélangés et ajustés à 20ml avec de l'eau distillée.

L'amidon est extrait à partir du culot auquel sont rajoutés 2 ml d'eau distillée froide et 3 ml d'acide perchlorique à 65%. Après incubation pendant 24 heures à l'obscurité et au froid, le mélange obtenu est centrifugé à 5000 tr/mn pendant 20 minutes, et le surnageant est récupéré. Le culot est resuspendu dans 2 ml d'eau distillée froide et 3 ml d'acide perchlorique à 65%, l'incubation est de 30 mn dans la glace et à l'obscurité. Une autre centrifugation est réalisée. Les deux surnageants sont mélangés et ajustés à 20 ml avec de l'eau distillée.

Le dosage est réalisé sur 0,5 ml d'extrait glucidique auquel sont rajoutés 0,5 ml d'eau distillée et 2 ml de réactif à l'anthrone. Les tubes sont agités puis placés au bain – Marie à 100°C pendant 7 minutes. Après refroidissement, les densités optiques sont lues au spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 630 \text{ nm}$, le spectrophotomètre est préalablement étalonné grâce à un blanc préparé à partir de 1 ml d'éthanol et 2 ml de réactif.

La courbe étalon (Figure 21) est réalisée à partir d'une solution mère de glucose de 0,2 mg/ml.

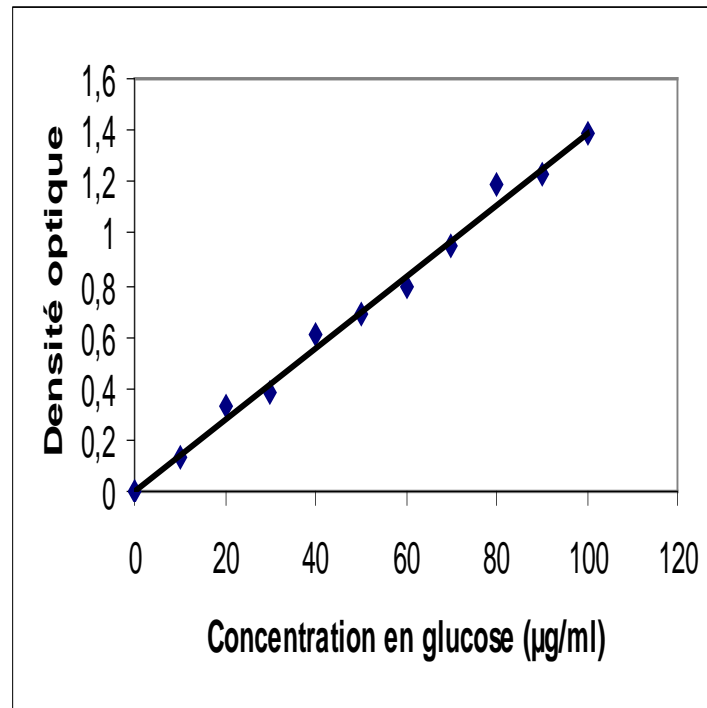


Figure 21 : Courbe d'étalonnage du dosage des sucres solubles.

La quantité d'amidon est obtenue en multipliant la quantité de sucres solubles, issue de l'hydrolyse, par un facteur de correction qui est 0,9 (Facteur de Mc Ready), les teneurs sont exprimées en mg/g de MVF (feuille).

2-3-3- Extraction et dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr-TBA) dont le malondialdéhyde :

Le dosage du MDA, malondialdéhyde, ou des substances thiobarbituriques acides réactives (TBARS) est utilisé depuis les années cinquante pour estimer la peroxydation des lipides dans les membranes et les systèmes biologiques (Sinnhuber et Yu, 1958).

L'acide thiobarbiturique (TBA) réagit avec le malondialdéhyde (MDA) pour former un complexe de couleur rose possédant un maximum d'absorption à une longueur d'onde de 532 nm.

Extraction :

L'extraction a été effectuée à froid en broyant 100mg de feuilles dans 300µl du mélange (tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ à 0,2 M et pH 6,5 + 1 % triton x100 + 0,01 % hydroxytoluène butylé ou BHT), après homogénéisation, le broyat est centrifugé pendant 20 mn à 13000 tr/mn et à 4°C.

Dosage :

Un volume du surnageant (120µl) est repris dans 300µl d'acide trichloroacétique (TCA) à 10 % additionné de 450µl d'acide 2-thiobarbiturique (TBA) 0,67 % préparé dans du TCA 10 % ; Les échantillons sont bouillis à 95°C pendant 15 mn puis refroidis 5 mn dans la glace. Après

centrifugation pendant 10 mn à 13000 tr/mn à 4°C, le surnageant est récupéré et le MDA est dosé par spectrophotométrie à 532 nm.

Une gamme étalon a été réalisée à partir d'une solution mère à 1 μM d'un précurseur du MDA, le 1, 1, 3, 3 tétraméthoxypropane (TMP).

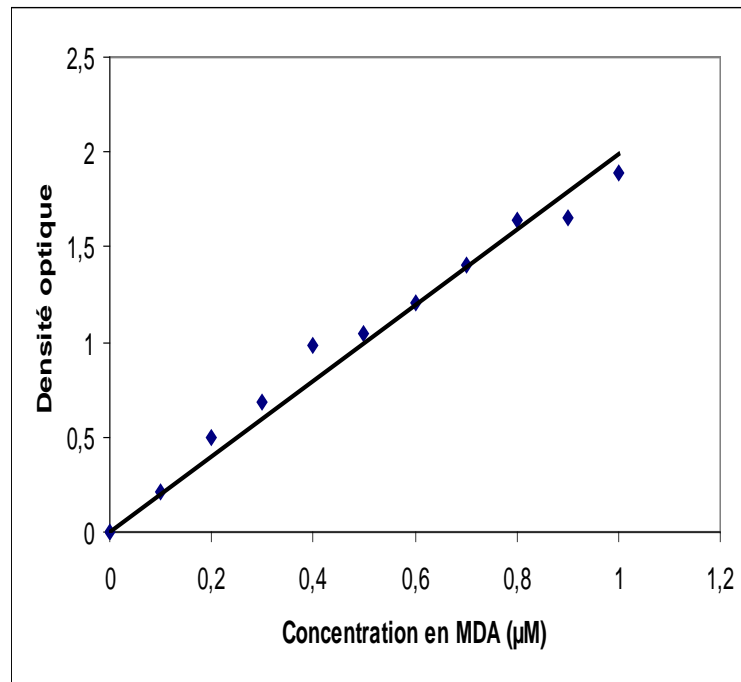


Figure 22 : Courbe d'étalonnage du dosage du malondialdéhyde.

2-3-4- Etude de l'activité de la glutathion s-transférase (GST) :

Le principe du dosage repose sur la conjugaison entre le chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) et le glutathion catalysée par la GST, conduisant à la formation d'un complexe, qui absorbe la lumière à 340 nm. La valeur de densité optique est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formée, elle-même liée à l'intensité de l'activité GST (Habig et al., 1974).

Extraction de l'enzyme :

500 mg de matière végétale fraîche (feuilles ou racines) sont broyées dans des tubes Eppendorf 2ml maintenus au froid. On ajoute 0,5ml de tampon Tris-EDTA et quelques gouttes d'un antioxydant le polyvinylpyrrolidone (PVP) 50mg/ml.

Après mélange au vortex et incubation 15 mn dans la glace, l'extrait ainsi obtenu est centrifugé à 13000 tr/mn, à 4°C pendant 15 mn. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et centrifugé à 13000 tr/mn, à 4°C pendant 10 mn. Le surnageant est récupéré, puis conservé jusqu'au dosage.

Sur cet extrait un dosage des protéines totales est réalisé par la méthode de Bradford (1976), en utilisant une gamme étalon de BSA.

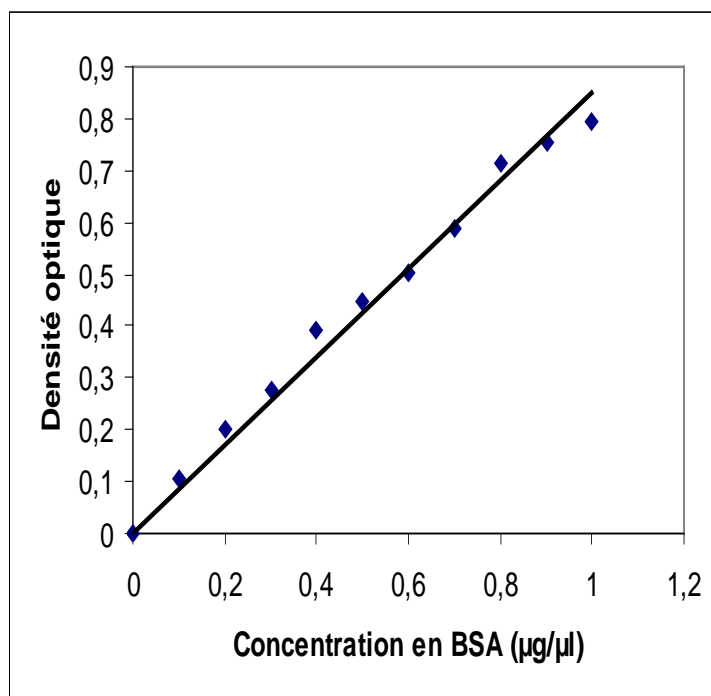


Figure 23 : Courbe d'étalonnage du dosage des protéines.

Mesure de l'activité de la glutathion s-transférase (GST) :

Dans une cuve de spectrophotomètre sont mis :

100 µl du surnageant, 30 µl de CDNB 100 mM et 2,84 ml de tampon phosphate 100 mM pH 6,5, la solution est mélangée.

Au temps zéro sont ajoutés 30 µl de GSH 100 mM, les valeurs de DO sont notées toutes les 15 ou 30 secondes selon la vitesse de la réaction. L'activité enzymatique est exprimée en [mmoles de complexe formé]·min⁻¹·mg⁻¹ de protéines.

2-3-5- Extraction et dosage des molécules anti-oxydantes :

A- Alpha-tocophérol :

Extraction :

L'évaluation de la vitamine E a été faite sur HPLC selon une modification de la méthode décrite par Szymańska et Kruk (2008).

Les échantillons de feuilles (80mg) sont broyés à froid dans des tubes eppendorf dans un mélange de solvants (Acétonitrile/dichlorométhane/méthanol, 70/20/10, v/v/v). Les extraits obtenus sont centrifugés à 13000 tr/mn, à 4°C, pendant 60 secondes. Le surnageant est récupéré et stocké jusqu'aux analyses.

La chromatographie est réalisée en utilisant un appareil pour HPLC de type Perkin Elmer Series 200 composé de :

- Colonne d'une longueur de 220 mm et de diamètre interne de 4,6 mm, contient la phase stationnaire apolaire constituée de gel de silice greffée.
- Phase mobile polaire à un débit de 1ml/minute, constituée d'un mélange d'Acétonitrile/dichlorométhane/méthanol (70 : 20 : 10, v/v/v).
- Détecteur UV/VIS Series 200
- Interface : 600 Series LINK
- Pompe Series 200
- Dégazeur membrane vacuum Degasser Series 200
- Logiciel TOTALCHROM
- Volume injecté : 25 µl

L'étalon est réalisée par la concentration d'alpha-tocophérol (0,4 g/l dans la solution d'extraction).

Tableau II : Paramètres d'analyse en HPLC de l'α tocophérol.

Phase stationnaire	gel de silice greffée (220 mm x 4,6 mm)
Phase mobile	d'Acétonitrile/dichlorométhane/méthanol (70 : 20 : 10, v/v/v)
Détecteur	UV/VIS Series 200
Volume injecté	25 µl
Débit	1ml/minute

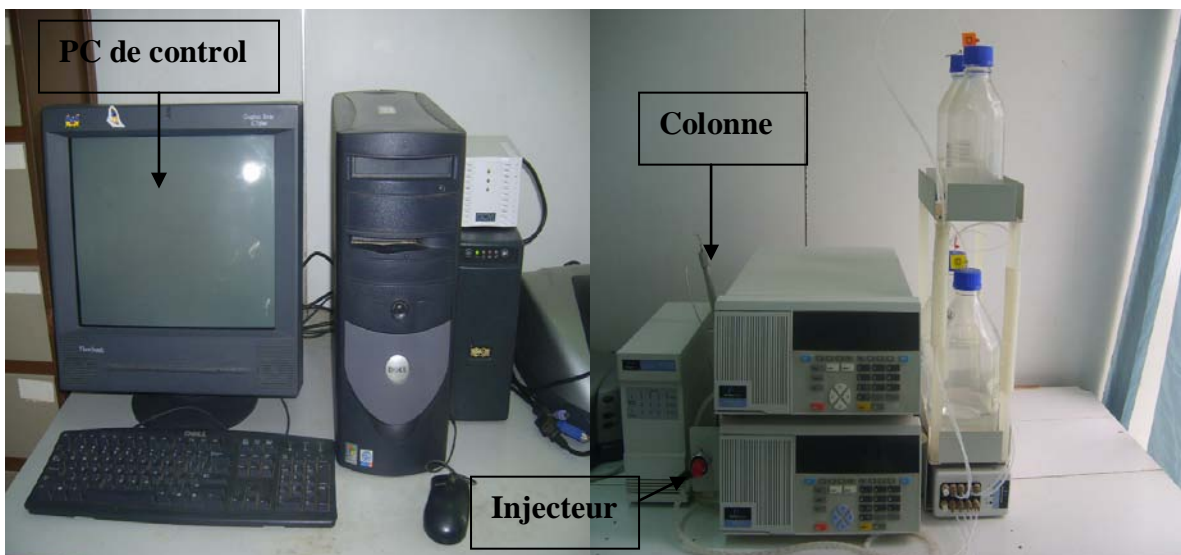


Figure 25 : Photo montrant un chromatogramme liquide à haute performance HPLC.

B- Acide ascorbique :

Le dosage de l'ascorbate réduit a été effectué par la méthode de Hodges et al. (1996).

Extraction :

Les feuilles sont broyées dans des tubes Eppendorf 2ml maintenu au froid. Les extractions sont ensuite réalisées dans 4 volumes d'une solution d'acide sulfosalicylique (5%) contenant 6,3 mM d'acide diéthylentriaminepenta-acétique (DTPA). Les extraits obtenus sont centrifugés à 13000 tr/mn, à 4°C, pendant 10 mn. Le surnageant est récupéré et stocké jusqu'aux analyses.

Dosage :

L'ascorbate réduit le Fe^{3+} en Fe^{2+} qui se complexe alors avec le 2,2'-dipyridyl. Le composé ainsi formé absorbe à 525 nm.

Le milieu réactionnel est constitué de 200 μl de surnageant, 500 μl de tampon K-phosphate (150 mM, pH 7,4) contenant 5 mM d'EDTA, et 100 μl d'eau distillée. Après 10 mn d'incubation à température ambiante, 100 μl d'eau distillée sont ajoutées. Une coloration rose apparaît après ajout de 400 μl de TCA à 10 %, 400 μl d'acide ortho-phosphorique à 44 %, 400 μl de 2,2'-dipyridyl à 4 % (dans éthanol 70°), et 200 μl de FeCl_3 à 30mg/l. Après une heure d'incubation à 40°C, l'absorbance est mesurée à 525 nm.

La courbe étalon est réalisée par des concentrations croissantes d'ascorbate (0 à 1 mM dans la solution d'extraction).

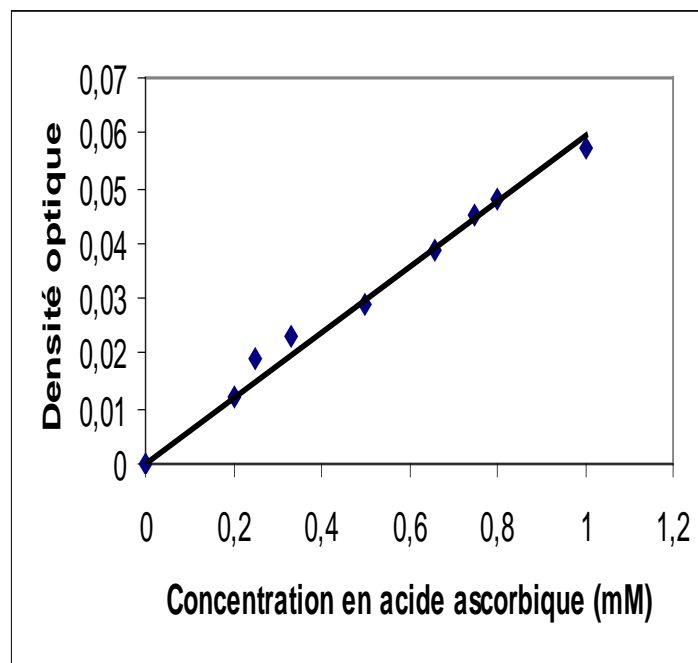


Figure 24 : Courbe d'étalonnage du dosage de l'acide ascorbique.

C- Glutathion :

Grâce à la fonction thiol de la cystéine, le glutathion est un composé important pour le maintien de l'état réduit de la cellule.

Le principe repose sur la réaction du 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate DTNB (réactif d'Ellman) avec deux molécules de glutathion permettant la formation d'un composé de couleur jaune vive le 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB) absorbant à 412 nm (Ellman, 1959).

Extraction :

Les feuilles sont broyées dans des tubes Eppendorf 2ml maintenu au froid. Les extractions sont ensuite réalisées dans 4 volumes d'une solution d'acide sulfosalicylique (5%) contenant 6,3 mM d'acide diethylenetriaminepenta-acétique (DTPA). Les extraits obtenus sont centrifugés à 13000 tr/mn, à 4°C, pendant 10 mn. Le surnageant est récupéré et stocké jusqu'aux analyses.

Dosage :

A 200 µl du surnageant sont ajoutés 1 ml de tampon phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ à 0,2 M et PH=8), et 100 µl de réactif d'Ellman (0,04 %) préparé dans du tampon phosphate. Le mélange ainsi obtenu est incubé à température ambiante pendant 10 minutes. L'absorbance de la solution est ensuite lue au spectrophotomètre à 412 nm.

Une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution mère de glutathion à 1 mg/ml. Les teneurs en glutathion réduit sont exprimées en mg/g de MVF.

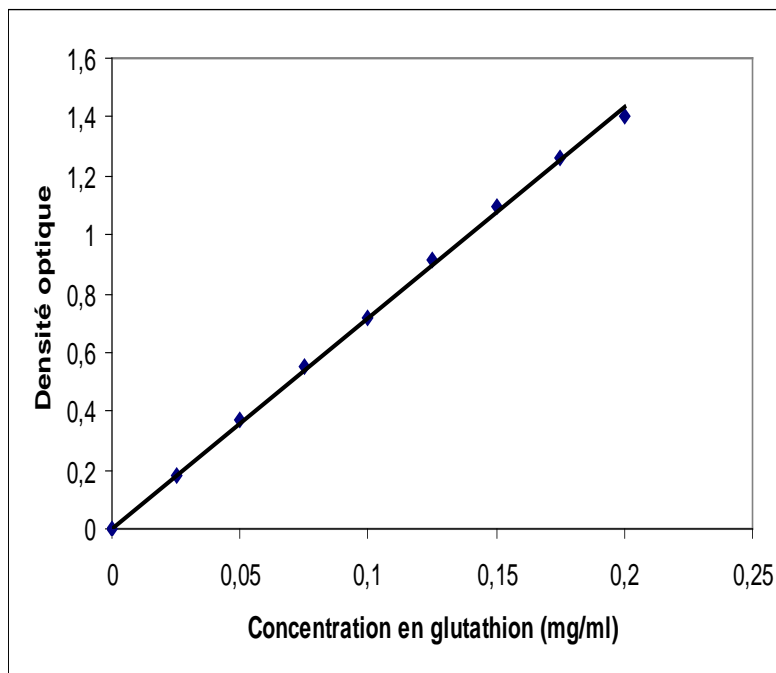


Figure 26 : Courbe d'étalonnage du dosage de glutathion.

2-4- Analyses statistiques :

Les résultats obtenus sont soumis à l'analyse de la variance, et à chaque fois qu'il existe des différences significatives, les moyennes de différents essais ont été comparées par rapport au témoin en utilisant le test t de Student.

Les moyennes diffèrent significativement dans leur ensemble si t dépasse la limite lue dans la table de t « point 5%, 1%, 1‰ »

Les degrés de signification sont étudiés aux seuils : $P=0,05$; $P=0,01$ et $P=0,001$

* différence significative par rapport au témoin ($P=0,05$).

** différence très significative par rapport au témoin ($P=0,01$).

*** différence hautement significative par rapport au témoin ($P=0,001$).

Résultats
et
interprétations

IV- Résultats et interprétations :

Le but de ce mémoire consistait à investiguer l'effet protecteur de deux antioxydants vis-à-vis de dommages engendrés par le traitement par un bleaching herbicide. Nous avons étudié la toxicité, du norflurazon au travers de plusieurs marqueurs d'impact et de stress : teneurs en pigments photosynthétiques, en glucides, peroxydation lipidique, de même que nous avons évalué les niveaux des antioxydants habituellement exprimés dans des situations de stress à savoir l' α tocophérol, l'acide ascorbique le glutathion ainsi qu'une activité enzymatique impliquée dans la métabolisation des xénobiotiques.

Ces études ont été effectuées dans des conditions d'apport exogène d' α tocophérol et d'ascorbate.

1-Croissance et métabolisme des plantules d'arachide en présence des deux antioxydants :

a- aspect phénotypique :

Les plantules témoins sont bien développées et vertes. L'apport de l'alpha tocophérol (TE) et de l'ascorbate (TC), ne modifie pas le phénotype des plantules d'arachide : celles-ci sont vertes et aussi développées que les plantules témoins (Figure 27).

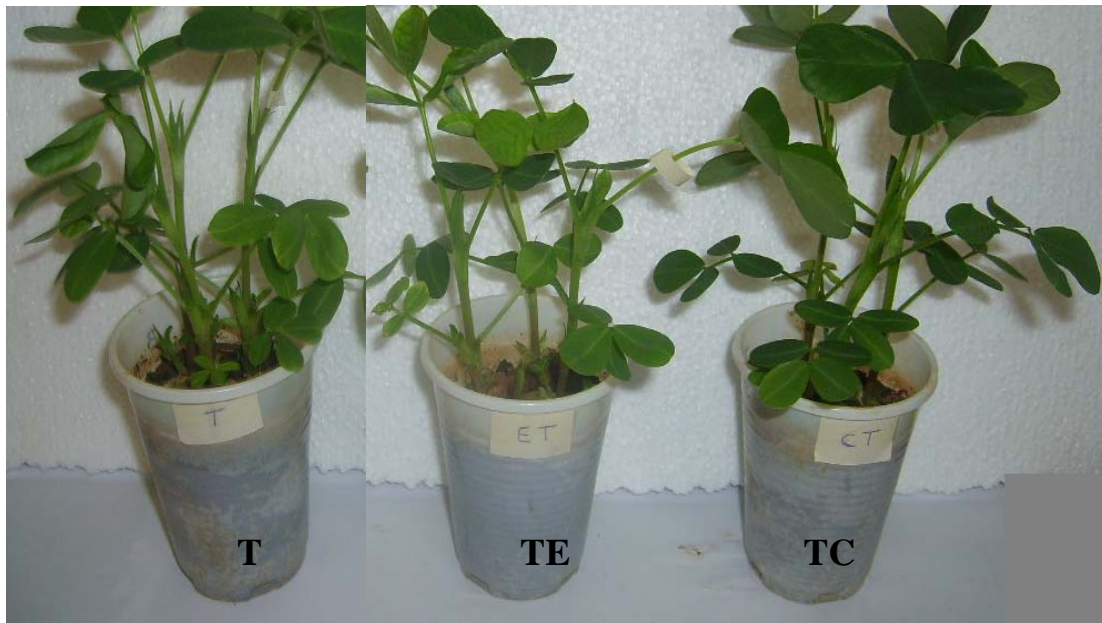


Figure 27 : Morphologie des plantules d'arachide en présence des deux antioxydants après 4 semaines de culture (T= témoin ; TE= α tocophérol 0,25 mM ; TC= acide ascorbique 50 mM).

b- croissance :

La comparaison des données de certains paramètres mesurés (longueur des parties aériennes, longueur des racines, surface foliaire, masse de matière sèche de la partie aérienne et des racines) montre que la croissance des plantules traitées par l'alpha tocophérol ou par l'ascorbate ne diffère pas de celle des plantules témoins.

Tableau III : Mesures de paramètres de croissance chez les plantules d'arachide témoin, plantules en présence d' α tocophérol 0,25 mM et plantules mises en présence de l'acide ascorbique 50 mM âgées d'un mois.

Paramètre de croissance	Témoin	α tocophérol 0,25 mM	Acide ascorbique 50 mM
Longueur des parties aériennes (cm)	10,65 \pm 1,05	10,61 \pm 1,35	10,72 \pm 1,40
Surface foliaire (cm ²)	22,85 \pm 6,36	25,09 \pm 5,52	24,57 \pm 0,75
masse de matière sèche de la partie aérienne (g)	0,53 \pm 0,13	0,45 \pm 0,04	0,48 \pm 0,01
Longueur des racines (cm)	15,95 \pm 3,62	14,39 \pm 3,15	13,92 \pm 3,84
masse de matière sèche des racines (g)	0,07 \pm 0,02	0,07 \pm 0,005	0,09 \pm 0,009
rapport longueur des racines / longueur de la partie aérienne	1,35 \pm 0,37	1,42 \pm 0,37	1,34 \pm 0,39
rapport masse sèche des racines / masse sèche de la partie aérienne	0,12 \pm 0,009	0,17 \pm 0,006	0,19 \pm 0,01

c- aspect métabolique :

Les caroténoïdes :

Chez les plantules exposées à l' α tocophérol ou à l'acide ascorbique, la teneur en caroténoïdes ne varie que très légèrement comparativement aux plantules témoins : dans les plantules témoins la quantité de caroténoïdes est de 423,57 \pm 6,80 μ g/g MVF elle diminue à 414,76 \pm 16,83 μ g/g MVF sous l'effet de l' α tocophérol, soit une réduction de 2,08% et augmente à 469,02 \pm 11,52 μ g/g MVF sous l'effet de l'acide ascorbique (tableau IV) correspondant à une augmentation de 10,73%.

L'analyse statistique révèle que la différence dans la teneur en caroténoïdes sous l'effet des deux antioxydants n'est pas significative.

Les chlorophylles totales (a+b) :

Les teneurs en chlorophylles totales augmentent légèrement avec l'application des deux antioxydants.

Dans les feuilles des plantules témoins, la quantité de chlorophylles totales est de 2,77 \pm 0,37 mg/g MVF, celle-ci augmente de 3,79% sous l'effet de l' α tocophérol et de 17,68% sous l'effet de l'acide ascorbique.

La différence observée entre les plantules traitées à l' α tocophérol et le témoin est non significative, alors qu'elle est significative en présence de l'acide ascorbique.

Sucres solubles et amidon :

La teneur en sucres solubles dans les feuilles des plantules témoins est de $1,46 \pm 0,21$ mg/g MVF, cette teneur diminue respectivement chez les plantules traitées par l' α tocophérol et l'acide ascorbique pour atteindre $0,98 \pm 0,12$ mg/g MVF et $1,09 \pm 0,22$ mg/g MVF correspondant aux pourcentages respectifs de diminution de 33,01% et 25,22%.

Les résultats du dosage de l'amidon ont révélé une teneur moyenne en amidon de $1,18 \pm 0,19$ mg/g MVF chez les plantules témoins, cette teneur s'est abaissée à $0,83 \pm 0,08$ mg/g MVF et $0,89 \pm 0,09$ mg/g MVF aux doses respectives de l' α tocophérol et l'acide ascorbique, correspondant à des taux de réduction de 28,95% et 23,96%.

L'analyse statistique révèle une différence très significative pour les sucres solubles et l'amidon après traitement à l' α tocophérol.

La différence observée entre les plantules traitées à l'acide ascorbique et le témoin est significative pour la teneur en sucres solubles et la teneur en amidon.

Malondialdéhyde :

Le niveau de peroxydation lipidique a été évalué en mesurant le malondi-aldéhyde ou MDA avec le test TBARS (Thiobarbituric reactive species). Le test TBARS est le test le plus couramment utilisé pour déterminer indirectement la peroxydation des lipides, en mesurant le MDA (Hodges et al., 1999).

Le dosage du MDA montre qu'au niveau des plantules témoins la teneur moyenne est de $0,09 \pm 0,005$ nmole/g MVF, cette teneur diminue en présence d' α tocophérol à $0,07 \pm 0,005$ nmole/g MVF, ce qui correspond à une réduction de 22,22%.

Cette teneur s'accroît avec l'acide ascorbique atteignant $0,12 \pm 0,01$ nmole/g MVF, soit un pourcentage d'augmentation de 41,11%.

La différence notée est très significative pour l' α tocophérol et hautement significative pour l'acide ascorbique par comparaison au témoin.

α tocophérol :

L' α -tocophérol, ou vitamine E, est souvent considéré comme l'antioxydant le plus efficace ; Sa localisation, au niveau des membranes, en fait l'antioxydant le plus important dans la prévention de la peroxydation des lipides membranaires (Karleskind, 1992 ; Fryer, 1992), en bloquant la réaction en chaîne de peroxydation lipidique s'initiant après la peroxydation d'acides gras polyinsaturés (Landrieu, 1987 ; Ricour et Navarro, 1993).

Dans les feuilles des plantules témoins, une teneur moyenne en α tocophérol de $0,43 \pm 0,00$ mg/g est enregistrée. Cette quantité augmente pour atteindre $0,80 \pm 0,21$ mg/g après l'apport exogène d' α tocophérol, le pourcentage d'augmentation est de 87%.

Au contraire, l'apport de l'acide ascorbique exogène provoque une baisse de la teneur en α tocophérol atteignant la valeur de $0,13 \pm 0,01$ mg/g, ce qui correspond à 69,60% de diminution par rapport au témoin.

En comparaison avec le témoin, la différence observée est très significative sous l'effet de l' α tocophérol et de l'acide ascorbique.

Acide ascorbique :

L'acide ascorbique, ou vitamine C, agit comme antioxydant et contribue au maintien de l'état rédox de la cellule.

Au niveau des feuilles des plantules témoins la teneur en acide ascorbique est de $1,90 \pm 0,25$ $\mu\text{mol/g}$ MVF, cette valeur augmente en présence de l' α tocophérol et de l'acide ascorbique. Elle passe à $3,70 \pm 0,23$ $\mu\text{mol/g}$ MVF et $2,30 \pm 0,38$ $\mu\text{mol/g}$ MVF pour l' α tocophérol et l'acide ascorbique. Les pourcentages d'augmentation correspondent respectivement à 94,23% et 20,60% pour l' α tocophérol et l'acide ascorbique.

La différence de la teneur en acide ascorbique entre les plantules témoins et celles traitées par l'acide ascorbique n'est pas significative tandis que cette différence est significative pour les plantules soumises à l' α tocophérol.

Glutathion réduit :

En présence d' α tocophérol la teneur en glutathion réduit est de $0,11 \pm 0,01$ mg/g MVF, cette valeur est inférieure à celle enregistrée chez les plantules témoins ($0,16 \pm 0,04$ mg/g MVF) soit 29,81% de réduction.

L'acide ascorbique entraîne par contre une augmentation de la teneur en glutathion réduit atteignant ainsi $0,19 \pm 0,01$ mg/g MVF soit 19,87% d'augmentation par rapport au témoin.

L'analyse statistique montre qu'en présence de l' α tocophérol, la teneur en glutathion réduit varie de manière très significative par rapport au témoin et de manière significative pour l'acide ascorbique comparativement au témoin.

Activité glutathion s-transférase (GST) :

Les résultats de l'activité de la glutathion s-transférase montrent que cette activité au niveau des racines varie de $0,09 \pm 0,01$ mmoles de complexe/min/mg de protéines chez les plantules témoins à $0,08 \pm 0,01$ et $0,07 \pm 0,004$ mmoles de complexe/min/mg de protéines chez les plantules soumises respectivement à l' α tocophérol et l'acide ascorbique, soient des taux de réduction de 13,68% et 24,21% par rapport au témoin.

Dans les feuilles l'activité de la glutathion s-transférase des plantules témoins est de $0,38 \pm 0,06$ mmoles de complexe/min/mg de protéines, en présence de l' α tocophérol et l'acide ascorbique, celle-ci atteint les valeurs respectives de $0,17 \pm 0,08$ et $0,10 \pm 0,05$ mmoles de complexe/min/mg de protéines correspondant à 53,42% et 73,15% de réduction par rapport au témoin.

La différence de l'activité de la GST des racines enregistrée sous l'effet de l'acide ascorbique est significative, tandis que la différence de l'activité de la GST des feuilles est hautement significative entre les plantules témoins et celles soumises à l' α tocophérol et l'acide ascorbique.

Tableau IV : Mesures des paramètres métaboliques dans les feuilles des plantules d'arachide témoins, plantules en présence d' α tocophérol 0,25 mM (TE) et plantules mises en présence de l'acide ascorbique 50 mM (TC) âgées d'un mois. Chaque valeur est la moyenne de 3 mesures indépendantes. *** différence hautement significative par rapport au témoin (P=0,001) ; ** différence très significative par rapport au témoin (P=0,01) ; * différence significative par rapport au témoin (P=0,05).

Paramètre métabolique	Témoin	α tocophérol 0,25 mM (TE)	Acide ascorbique 50 mM (TC)
Caroténoïdes (μ g/g MVF)	423,57 \pm 6,80	414,76 \pm 16,83	469,02 \pm 11,52
Chlorophylles totales (a+b) (mg/g MVF)	2,77 \pm 0,37	2,87 \pm 0,07	3,26 \pm 0,10 *
Sucres solubles (mg/g MVF)	1,46 \pm 0,21	0,98 \pm 0,12 **	1,09 \pm 0,22 *
Amidon (mg/g MVF)	1,18 \pm 0,19	0,83 \pm 0,08 **	0,89 \pm 0,09 *
Malondialdéhyde (nmole/g MVF)	0,09 \pm 0,005	0,07 \pm 0,005 **	0,12 \pm 0,01 ***
α tocophérol (mg/g)	0,43 \pm 0,00	0,80 \pm 0,21 **	0,13 \pm 0,01 **
Acide ascorbique (μ mol/g MVF)	1,90 \pm 0,25	3,70 \pm 0,23 *	2,30 \pm 0,38
Glutathion réduit (mg/g MVF)	0,16 \pm 0,04	0,11 \pm 0,01 **	0,19 \pm 0,01 *
Activité GST racines (mmoles de complexe/min/mg de protéines)	0,09 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,07 \pm 0,004 *
Activité GST feuilles (mmoles de complexe/min/mg de protéines)	0,38 \pm 0,06	0,17 \pm 0,08 ***	0,10 \pm 0,05 ***

2-1- Impact des antioxydants sur la morphologie des plantules d'arachide traitées par le norflurazon :

La figure 28, montre la morphologie de la partie aérienne des plantules d'arachide témoins et celles des plantules traitées par le norflurazon seul et en présence d' α tocophérol ou d'acide ascorbique.

Les plantules traitées avec le norflurazon sont partiellement dépigmentées, cette dépigmentation débute par la base des feuilles et se propage au reste du limbe foliaire. C'est le phénomène de bleaching entraînant la formation de plantes albinos (Figure 28).

En présence d' α tocophérol et d'acide ascorbique associé au norflurazon les plantules d'arachide sont également partiellement dépigmentées. Cependant Cette dépigmentation est

moins importante en présence surtout de l'acide ascorbique associé au norflurazon par rapport au norflurazon seul (Figure 28).

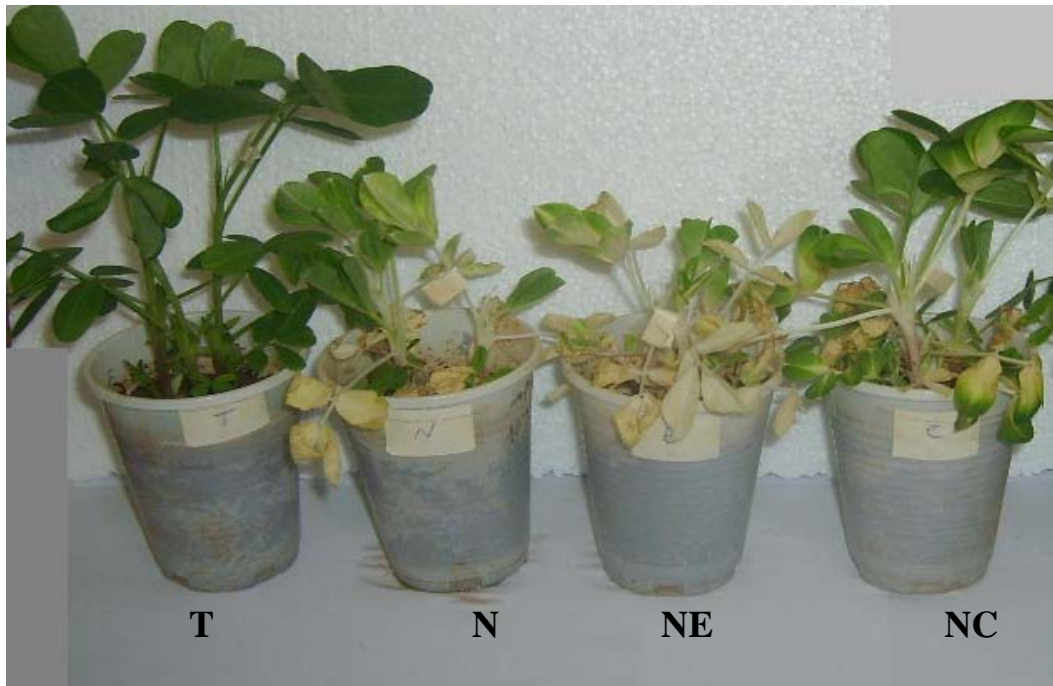


Figure 28 : Impact des antioxydants sur la morphologie des plantules d'arachide traitées par le norflurazon après 4 semaines de culture (T= témoin ; N= norflurazon 10^{-4} M ; NE= norflurazon 10^{-4} M + α tocophérol 0,25 mM ; NC= norflurazon 10^{-4} M + acide ascorbique 50 mM).

2-2- Impact des antioxydants sur la croissance des plantules d'arachide traitées par le norflurazon :

La croissance des plantules d'arachide a été évaluée par la mesure de la longueur de la partie aérienne, de la racine, de la surface foliaire et de la masse de matière sèche de la partie aérienne et des racines après un mois de mise en culture.

* Longueur de la partie aérienne :

Le norflurazon réduit la croissance des tiges des plantules d'arachide (Figure 29 A). Celle-ci passe de $10,65 \pm 1,05$ cm chez les plantules témoins à $3,51 \pm 0,79$ cm chez les plantules traitées par le norflurazon, soit une réduction de 67,02% par rapport au témoin.

En présence des deux antioxydants la longueur de la partie aérienne est diminuée de 68,63% en présence de l' α tocophérol et de 53,88% en présence de l'acide ascorbique comparativement aux plantules témoins.

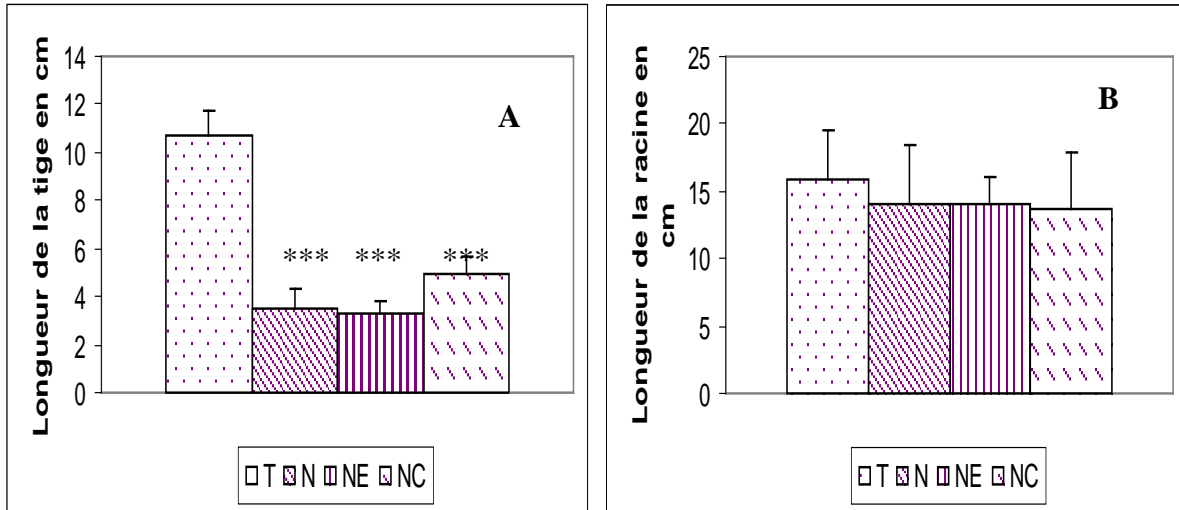


Figure 29 : Impact des antioxydants sur la longueur des tiges et de la racine principale des plantules d'arachide traitées par le norflurazon (T= témoin ; N= norflurazon 10⁻⁴ M ; NE= norflurazon 10⁻⁴ M + α tocophérol 0,25 mM ; NC= norflurazon 10⁻⁴ M + acide ascorbique 50 mM). A : Partie aérienne, B : Partie racinaire.

*** différence hautement significative par rapport au témoin (P=0,001).

*** Longueur de la racine principale :**

La croissance de la racine principale des plantules traitées par le norflurazon diminue légèrement ; en effet nous notons des valeurs de 15,95 ± 3,62 cm pour les plantules témoins et de 14,13 ± 4,28 cm pour les plantules traitées au norflurazon, soit 11,39% de réduction (Figure 29 B).

Aussi bien en présence d'α tocophérol que de l'acide ascorbique la longueur de la racine est sensiblement la même que celle des plantules traitées par le norflurazon vu que le pourcentage de réduction est de 11,91% pour l'α tocophérol et 13,74% pour l'acide ascorbique comparativement aux plantules témoins (Figure 29 B).

L'analyse statistique révèle que les variations de la longueur de la racine observées sous les différents traitements ne sont pas significatives.

*** Rapport longueur des racines / longueur de la partie aérienne :**

La baisse de la longueur causée par le norflurazon sur les racines est moins importante que sur les tiges.

Chez les plantules témoins, le rapport longueur des racines / longueur des parties aériennes est de 1,35 ± 0,37 ; ce rapport augmente pour atteindre 4,63 ± 1,06 pour le norflurazon (tableau V), soit une augmentation de 242,96%. Cette variation est statistiquement hautement significative.

La même observation est faite en présence de l'α tocophérol et de l'acide ascorbique, ce rapport marque une augmentation hautement significative comparativement au témoin atteignant des valeurs de 4,30 ± 0,89 et 3,42 ± 0,91 correspondant aux augmentations de 218,518% et 153,33% respectivement (tableau V).

Tableau V : Rapport longueur des racines / longueur de la partie aérienne des plantules d'arachide témoins et traitées (T= témoin ; N= norflurazon 10^{-4} M ; NE= norflurazon 10^{-4} M + α tocophérol 0,25 mM ; NC= norflurazon 10^{-4} M + acide ascorbique 50 mM). *** différence hautement significative par rapport au témoin (P=0,001).

	T	N	NE	NC
Long. racines	1,35 ± 0,37	4,63 ± 1,06	4,30 ± 0,89	3,42 ± 0,91
long. partie aérienne		***	***	***

*** Surface foliaire :**

Le norflurazon entraîne une réduction de la surface foliaire, en effet la surface foliaire des plantules témoins est de $22,85 \pm 6,36 \text{ cm}^2$, elle passe à $11,57 \pm 1,81 \text{ cm}^2$ chez les plantules traitées, soit une réduction très significative de 49,37% (Figure 30).

En présence d' α tocophérol, la réduction de la surface foliaire est pratiquement la même que celle des plantules traitées par le norflurazon. Cette réduction est moins importante en présence de l'acide ascorbique associé au norflurazon (34,21%) par rapport au norflurazon seul (Figure 30).

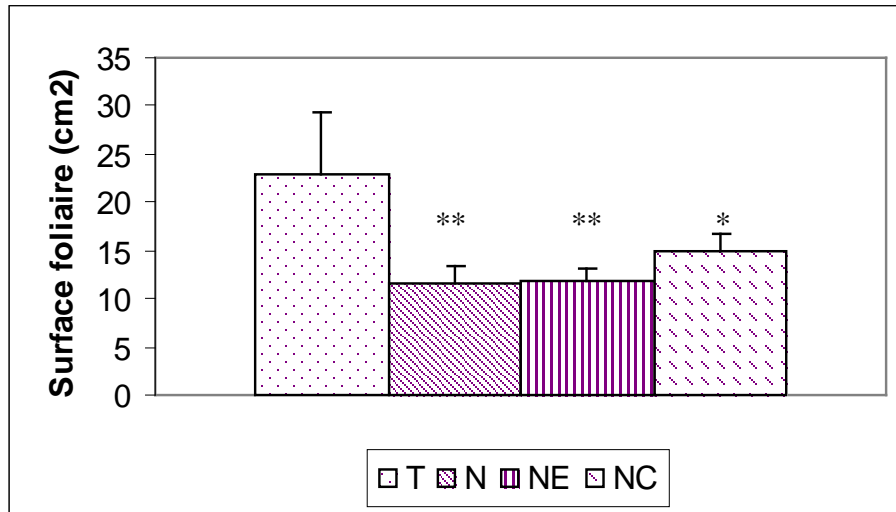


Figure 30 : Impact des antioxydants sur la surface foliaire des plantules d'arachide traitées par le norflurazon (T= témoin ; N= norflurazon 10^{-4} M ; NE= norflurazon 10^{-4} M + α tocophérol 0,25 mM ; NC= norflurazon 10^{-4} M + acide ascorbique 50 mM). ** différence très significative par rapport au témoin (P=0,01) ; * différence significative par rapport au témoin (P=0,05).

*** Masse de matière sèche de la partie aérienne et des racines :**

La masse sèche de la partie aérienne des plantules témoins est de $0,53 \pm 0,13 \text{ g}$; celle-ci diminue avec le norflurazon, l' α tocophérol et l'acide ascorbique pour atteindre $0,27 \pm 0,06 \text{ g}$; $0,31 \pm 0,02 \text{ g}$ et $0,27 \pm 0,05 \text{ g}$ soient des réductions de 47,84%, 41,46% et 49,15% (Figure 31 A).

En comparaison avec les plantules témoins, l'écart observé sous l'effet du norflurazon, de l' α tocophérol et de l'acide ascorbique est hautement significatif.

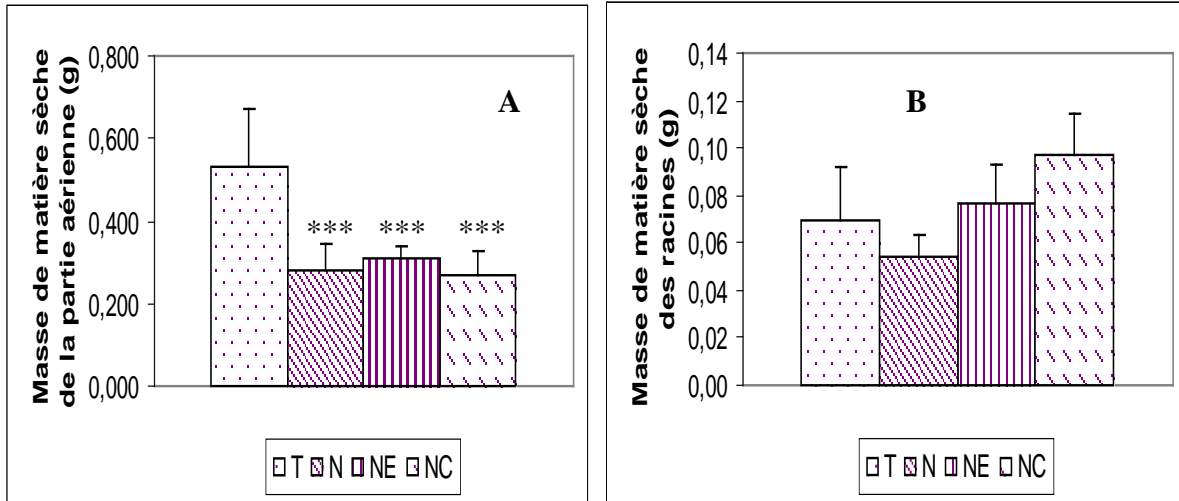


Figure 31 : Impact des antioxydants sur la masse de matière sèche de la partie aérienne et des racines des plantules d'arachide traitées par le norflurazon (T= témoin ; N= norflurazon 10⁻⁴ M ; NE= norflurazon 10⁻⁴ M + α tocophérol 0,25 mM ; NC= norflurazon 10⁻⁴ M + acide ascorbique 50 mM). *** différence hautement significative par rapport au témoin (P=0,001).
A : Partie aérienne, **B** : Partie racinaire.

La masse de matière végétale sèche des racines chute de 21,42% sous l'effet du norflurazon. Au contraire en présence de l'α tocophérol et de l'acide ascorbique elle augmente respectivement de l'ordre de 10% et 38,57% (Figure 31 B). Les différences de la masse de matière sèche des racines notées ne sont pas significatives.

*** Rapport masse sèche des racines / masse sèche de la partie aérienne**

En présence du norflurazon le rapport masse sèche des racines / masse sèche de la partie aérienne varie de manière significative marquant ainsi une augmentation de l'ordre de 60,46% par rapport au témoin. En présence d'α tocophérol le rapport augmente d'une manière très significative par rapport au témoin. L'augmentation est de 92,24%. Chez les plantules soumises au norflurazon associé à l'acide ascorbique la valeur du rapport augmente de 182,94% comparativement au témoin. Cette différence est hautement significative. Cette différence reflète en fait une plus grande sensibilité de la partie aérienne relativement aux racines.

Tableau VI : Rapport masse sèche des racines / masse sèche de la partie aérienne des plantules d'arachide témoins et traitées (T= témoin ; N= norflurazon 10⁻⁴ M ; NE= norflurazon 10⁻⁴ M + α tocophérol 0,25 mM ; NC= norflurazon 10⁻⁴ M + acide ascorbique 50 mM). *** différence hautement significative par rapport au témoin (P=0,001) ; ** différence très significative par rapport au témoin (P=0,01) ; * différence significative par rapport au témoin (P=0,05).

	T	N	NE	NC
masse sèche des racines	0,12 ± 0,009	0,20 ± 0,07 *	0,24 ± 0,06 **	0,36 ± 0,08 ***
masse sèche de la partie aérienne				

Le pourcentage de diminution a été déterminé sur la base de l'écart entre la production de matière sèche totale (partie aérienne et partie racinaire) sur milieu témoin et celle produite sur milieu traité, exprimé en pour cent de la production de matière sèche sur milieu témoin (Saadallah et al., 2001).

Chez les plantules traitées par le norflurazon ce pourcentage est de l'ordre de 44,68%; en présence des deux antioxydants le pourcentage de réduction diminue à 35,38% chez les plantules traitées par l' α tocophérol et 38,87% chez les plantules traitées par l'acide ascorbique. Les plantules d'arachide semble donc légèrement moins sensible au norflurazon en présence des deux antioxydants.

Tableau VII : Pourcentage de diminution des plantules d'arachide traitées (PD= MS témoin – MS traité)/MS témoin x 100) (N= norflurazon 10^{-4} M ; NE= norflurazon 10^{-4} M + α tocophérol 0,25 mM ; NC= norflurazon 10^{-4} M + acide ascorbique 50 mM).

	N	NE	NC
Pourcentage de diminution des plantules (%)	44,68	35,38	38,87

2-3- Impact des antioxydants sur le métabolisme cellulaire des feuilles de plantules d'arachide traitées par le norflurazon :

2-3-1- Impact des antioxydants sur la teneur en pigments photosynthétiques des feuilles de plantules d'arachide traitées par le norflurazon :

Suite aux dépigmentations observées sous l'effet de l'herbicide, nous avons évalué la teneur en pigments photosynthétiques dans les feuilles des plantules d'arachide témoins, plantules mises en contact de l'herbicide seul et en présence d' α tocophérol ou d'acide ascorbique.

* Teneur en chlorophylles totales

Sous l'effet du norflurazon, la teneur en chlorophylles totales diminue d'une manière hautement significative par rapport au témoin, elle passe de $2,77 \pm 0,37$ mg/g MVF à $1,16 \pm 0,43$ mg/g MVF, soit un pourcentage de réduction de 57,90% (Figure 32).

L' α tocophérol accentue la diminution des chlorophylles totales (64,18% de réduction) chez les plantules traitées par le norflurazon.

L'acide ascorbique par contre augmente légèrement la teneur en chlorophylles totales par rapport à celle des plantules traitées par le norflurazon.

La différence de la teneur en chlorophylles totales entre les plantules témoins et celles traitées par le norflurazon associé à l' α tocophérol ou à l'acide ascorbique est hautement significative.

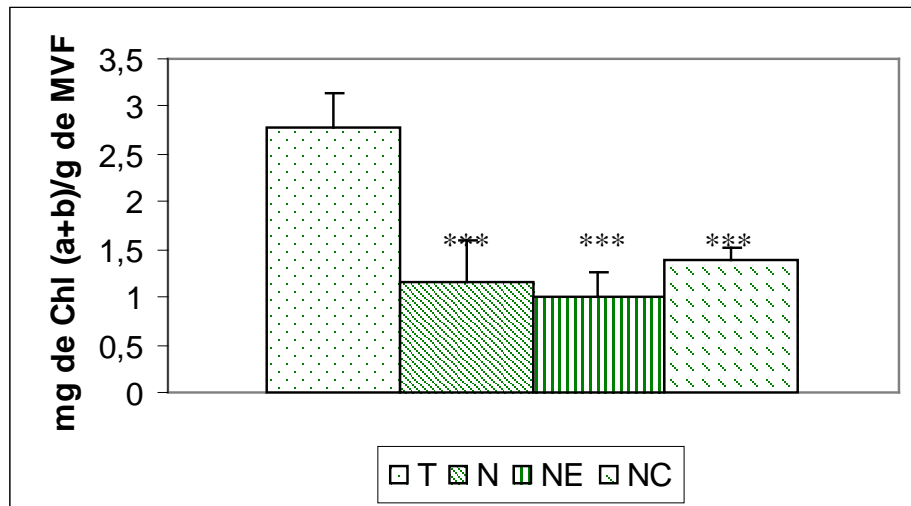


Figure 32 : Impact des antioxydants sur la teneur en chlorophylles totales des feuilles des plantules d'arachide traitées par le norflurazon (T= témoin ; N= norflurazon 10⁻⁴ M ; NE= norflurazon 10⁻⁴ M + α tocophérol 0,25 mM ; NC= norflurazon 10⁻⁴ M + acide ascorbique 50 mM). *** différence hautement significative par rapport au témoin (P=0,001).

* Teneur en caroténoïdes

La teneur en caroténoïdes dans les feuilles des plantules témoins est de 423,57 ± 6,80 µg/g de MVF. Sous l'effet du norflurazon, il est observé une chute de 52,30% de ces pigments dans les feuilles des plantules traitées.

La teneur en caroténoïdes est un peu plus réduite (59,30%) sous l'effet de l'α tocophérol alors que sous l'effet de l'acide ascorbique le pourcentage de diminution (46,62%) est légèrement moins important qu'en présence du norflurazon seul (Figure 33).

Les différences observées entre les plantules témoins et les plantules traitées par l'herbicide seul ou en association avec l'un ou l'autre des deux antioxydants sont hautement significatives.

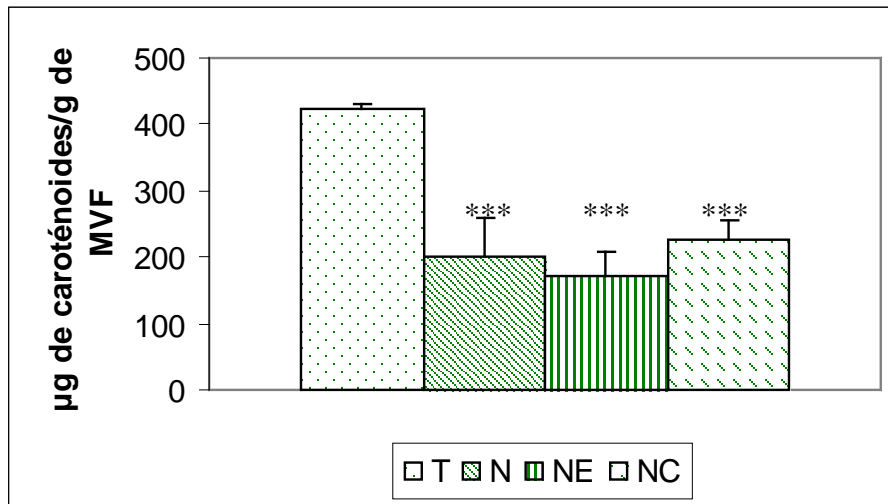


Figure 33 : Impact des antioxydants sur la teneur en caroténoïdes des feuilles des plantules d’arachide traitées par le norflurazon (T= témoin ; N= norflurazon 10⁻⁴ M ; NE= norflurazon 10⁻⁴ M + α tocophérol 0,25 mM ; NC= norflurazon 10⁻⁴ M + acide ascorbique 50 mM). *** différence hautement significative par rapport au témoin (P=0,001).

*** Rapport chlorophylles totales / caroténoïdes**

Dans les plantules traitées par le norflurazon le rapport chlorophylles totales / caroténoïdes se rapproche de celui des plantules témoins (6,53 et 6,28 respectivement) ce qui traduit une réduction de même intensité des caroténoïdes et des chlorophylles totales. En présence d’α tocophérol et d’acide ascorbique ce rapport diminue à 5,70 et 5,77 respectivement ce qui signifie que la teneur en chlorophylles totales est relativement plus affectée que celle des caroténoïdes (tableau VIII).

Tableau VIII : Rapport chlorophylles totales/caroténoïdes des feuilles des plantules d’arachide témoins et traitées (T= témoin ; N= norflurazon 10⁻⁴ M ; NE= norflurazon 10⁻⁴ M + α tocophérol 0,25 mM ; NC= norflurazon 10⁻⁴ M + acide ascorbique 50 mM). * différence significative par rapport au témoin (P=0,05).

	T	N	NE	NC
Chlor. totales / caroténoïdes	6,53 ± 0,78	6,28 ± 0,46	5,70 ± 0,44 *	5,77 ± 0,11

2-3-2- Impact des antioxydants sur le métabolisme glucidique des feuilles de plantules d’arachide traitées par le norflurazon :

L’effet du norflurazon et l’impact des antioxydants sur le métabolisme glucidique peuvent être évalués par la teneur en sucres solubles et en l’amidon.

*** Teneur en sucres solubles**

La figure 35 montre que la teneur en sucres solubles dans les feuilles des plantules témoins est de 1,46 ± 0,21 mg/g de MVF. Sous l’effet du norflurazon, cette quantité s’abaisse pour atteindre 0,47 ± 0,00 mg/g de MVF.

En présence d' α tocophérol ou d'acide ascorbique associé au norflurazon les teneurs en sucres solubles sont respectivement $0,25 \pm 0,07$ mg/g de MVF et $0,45 \pm 0,05$ mg/g de MVF correspondant aux pourcentages de réduction respectifs de l'ordre de 67,25, 82,57 et 69,24% par rapport aux plantules témoins (Figure 34).

En comparaison avec les plantules témoins, l'écart observé sous l'effet des différents traitements du norflurazon est hautement significatif.

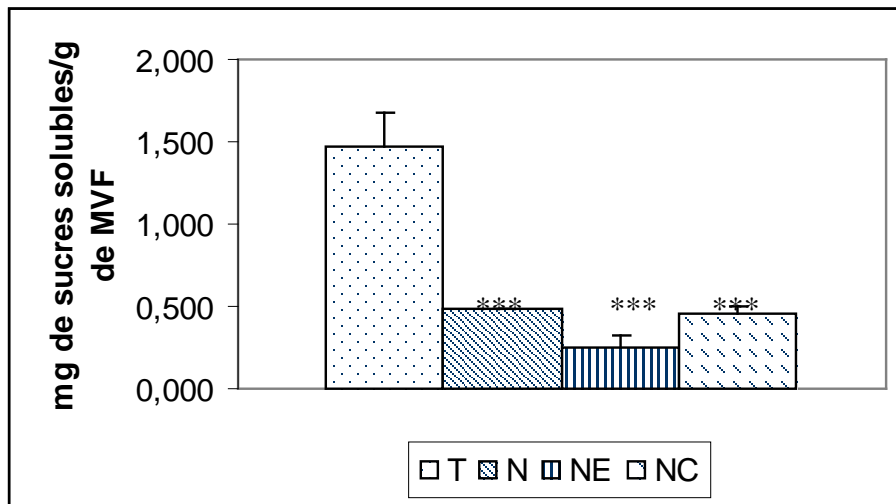


Figure 34 : Impact des antioxydants sur la teneur en sucres solubles des feuilles des plantules d'arachide traitées par le norflurazon (T= témoin ; N= norflurazon 10^{-4} M ; NE= norflurazon 10^{-4} M + α tocophérol 0,25 mM ; NC= norflurazon 10^{-4} M + acide ascorbique 50 mM). *** différence hautement significative par rapport au témoin (P=0,001).

* Teneur en amidon

Les résultats présentés dans la figure 35 montrent que la teneur en amidon diminue chez les plantules stressées par rapport au témoin.

La teneur en amidon passe de $1,18 \pm 0,19$ mg/g de MVF chez les plantules témoins à $0,65 \pm 0,21$ mg/g de MVF chez les plantules traitées avec le norflurazon, soit un pourcentage de réduction de 44,62%.

La chute de la teneur en amidon est de l'ordre de 54,86 et 48,85% respectivement pour l' α tocophérol et l'acide ascorbique.

L'étude statistique révèle que la différence de la teneur en amidon est hautement significative entre les plantules témoins et celles soumises au norflurazon seul ou en association avec l'un ou l'autre des deux antioxydants.

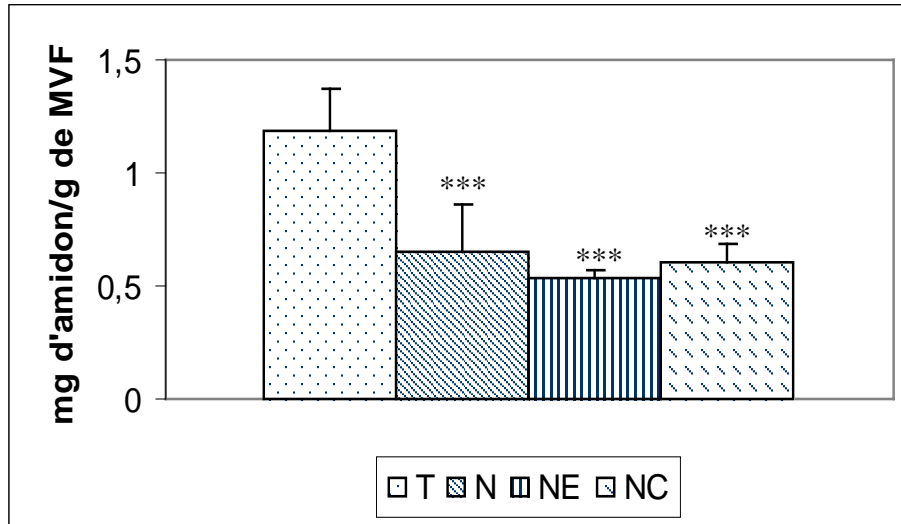


Figure 35 : Impact des antioxydants sur la teneur en amidon des feuilles des plantules d'arachide traitées par le norflurazon (T= témoin ; N= norflurazon 10⁻⁴ M ; NE= norflurazon 10⁻⁴ M + α tocophérol 0,25 mM ; NC= norflurazon 10⁻⁴ M + acide ascorbique 50 mM). *** différence hautement significative par rapport au témoin (P=0,001).

2-4- Impact des antioxydants sur la teneur en malondialdéhyde des feuilles de plantules d'arachide traitées par le norflurazon :

Le norflurazon engendre un stress oxydatif en augmentant la production de molécules réactives d'oxygène (Jung et al., 2000). Il s'ensuit entre autres dommages une peroxydation des lipides membranaires (Ribera,1990).

Le MDA est formé à partir d'une auto-oxydation ou d'une dégradation enzymatique des acides gras polyinsaturés dans les cellules, lors d'un stress oxydatif. Le dosage permet donc de mettre en évidence une variation de ce niveau d'oxydation des lipides.

Le dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr- TBA) dont le malondialdéhyde montre qu'au niveau des plantules témoins la teneur moyenne en malondialdéhyde est de 0,09 ± 0,005 nmole/g MVF, cette teneur s'élève de manière hautement significative chez les plantules traitées avec le norflurazon pour atteindre 0,14 ± 0,03 nmole/g MVF (Figure 36), ce qui correspond à une élévation de 64,44%.

L'ajout d'α tocophérol ou d'acide ascorbique, réduit les dommages occasionnés par l'herbicide au niveau membranaire vu que la teneur en malondialdéhyde est moins importante que dans les plantules traitées par le norflurazon.

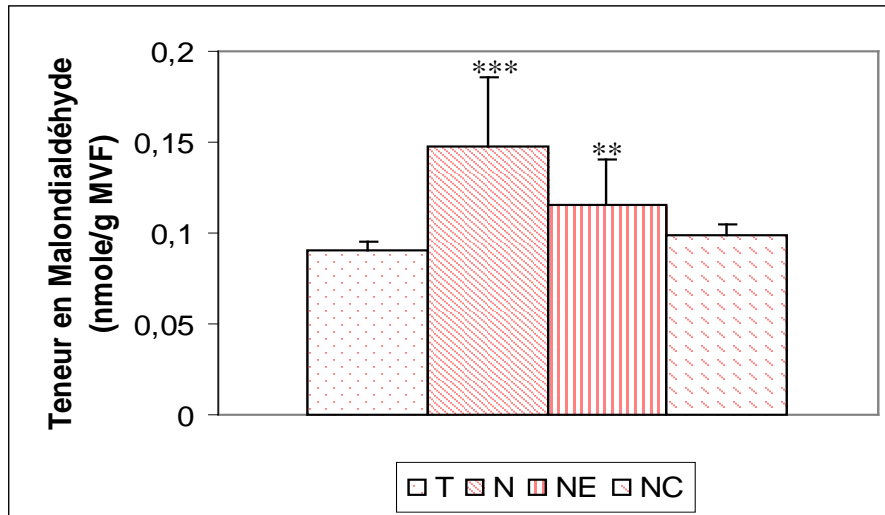


Figure 36 : Impact des antioxydants sur la teneur en malondialdéhyde des feuilles des plantules d'arachide traitées par le norflurazon (T= témoin ; N= norflurazon 10⁻⁴ M ; NE= norflurazon 10⁻⁴ M + α tocophérol 0,25 mM ; NC= norflurazon 10⁻⁴ M + acide ascorbique 50 mM).*** différence hautement significative par rapport au témoin (P=0,001) ; ** différence très significative par rapport au témoin (P=0,01).

2-5- Teneur en α tocophérol

L'évaluation de l'α tocophérol a été faite par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). L'analyse chromatographique est réalisée sur un étalon «standard» de l'α tocophérol qui a montré l'apparition d'un seul pic (Figure 37)., ainsi que sur un extrait foliaire de plantules d'arachide témoins et traitées obtenues après un mois de culture.

L'analyse des chromatogrammes de l'extrait foliaire d'arachide montre la présence de l'α tocophérol pour tous les traitements. Elle correspond à un temps de rétention de 8,79 minutes en moyenne (Figure 38).

Il est noté une apparition d'un deuxième pic à un temps de rétention de 8,17 minutes pour les traitements N, NE, et NC (Figure 38). Ce deuxième pic correspondrait à une autre forme de tocophérols ou à un dérivé de l'α tocophérol provenant de la dégradation ou du recyclage de l'alpha tocophérol suite au stress chimique imposé (Munné-Bosch, 2005).

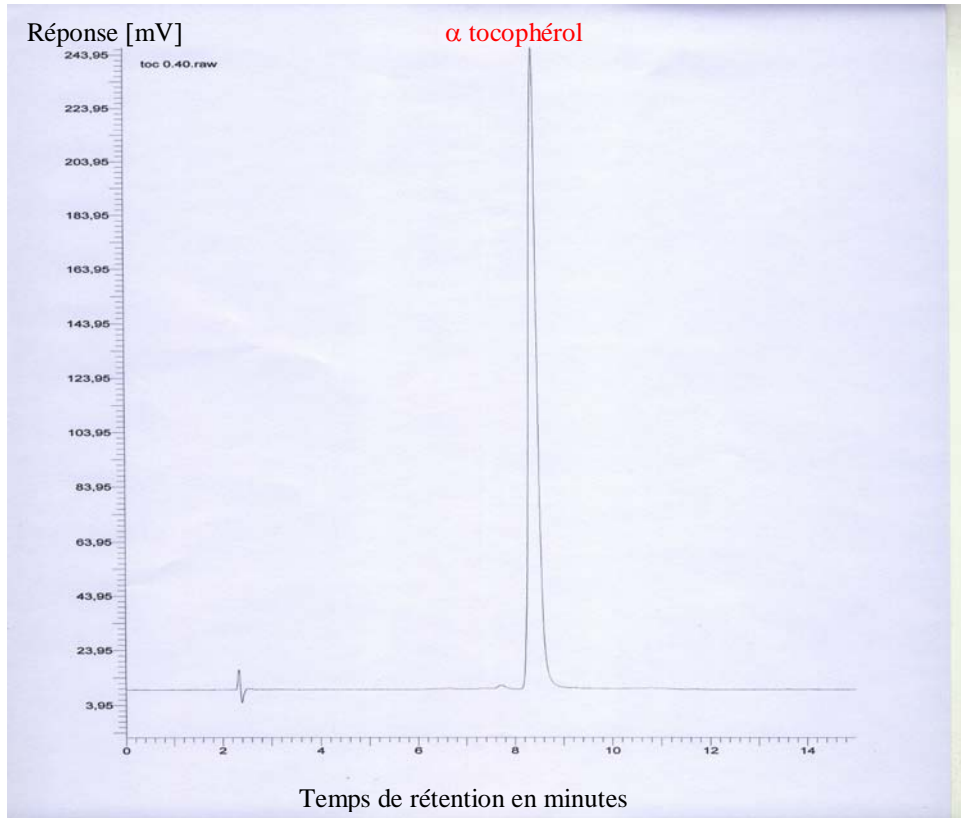


Figure 37 : Chromatogramme standard d'α tocophérol 0,4 g/l obtenu en HPLC.

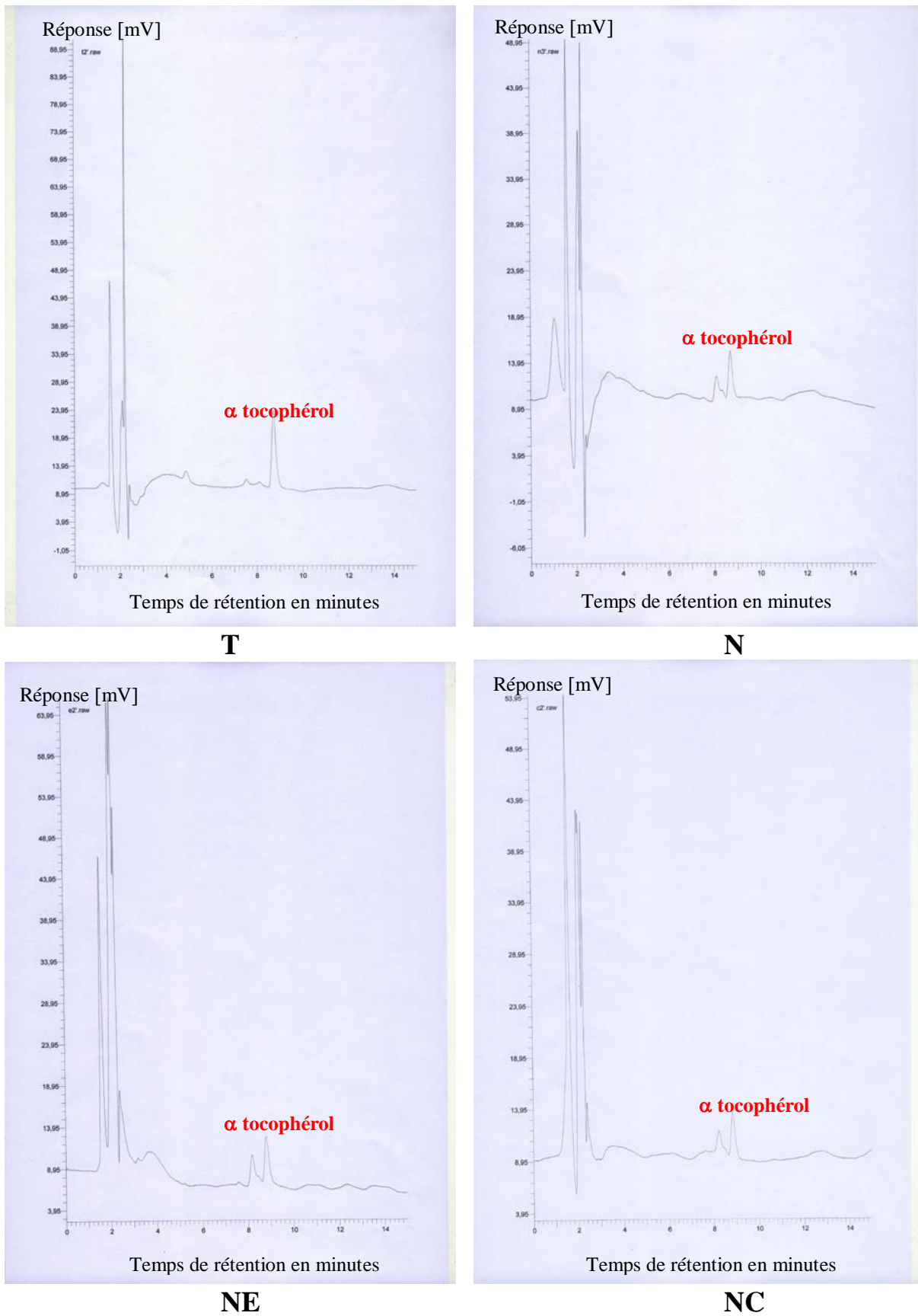


Figure 38 : Chromatogramme des feuilles des plantules d'arachide obtenu par HPLC (T= témoin ; N= norflurazon 10^{-4} M ; NE= norflurazon 10^{-4} M + α tocophérol 0,25 mM ; NC= norflurazon 10^{-4} M + acide ascorbique 50 mM).

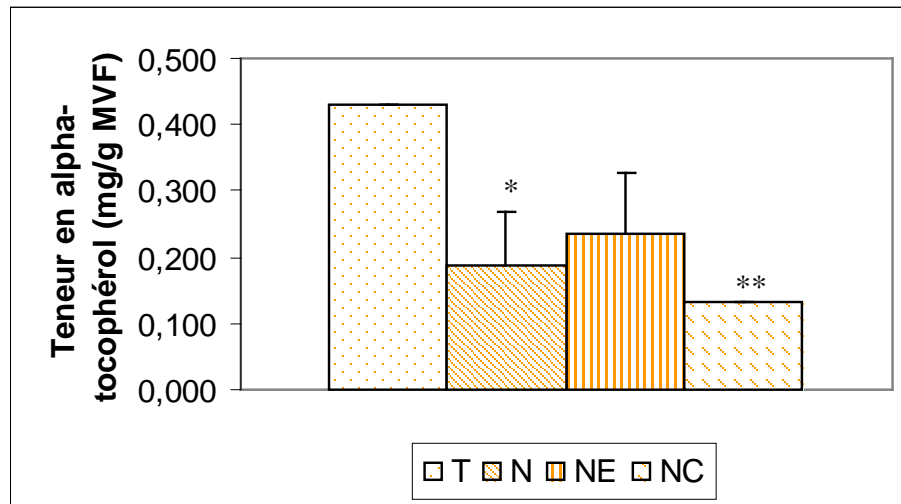


Figure 39 : Impact des antioxydants sur la teneur en α tocophérol des feuilles des plantules d'arachide traitées par le norflurazon (T= témoin ; N= norflurazon 10^{-4} M ; NE= norflurazon 10^{-4} M + α tocophérol 0,25 mM ; NC= norflurazon 10^{-4} M + acide ascorbique 50 mM). ** différence très significative par rapport au témoin (P=0,01) ; * différence significative par rapport au témoin (P=0,05).

L' α tocophérol est réduit de 56,61% sous l'effet du norflurazon, cette baisse devient moins importante (45,70% comparativement au témoin) avec l'apport exogène de l' α tocophérol. (Figure 39).

Dans les feuilles des plantules auxquelles a été ajouté l'acide ascorbique il est noté la plus faible quantité d' α tocophérol (69,60% comparativement aux plantules témoins) (Figure 39).

En comparaison avec les plantules témoins, l'écart observé est significative sous l'effet du norflurazon et très significative pour le traitement avec l'acide ascorbique.

2-6- Teneur en acide ascorbique

L'acide ascorbique est une molécule antioxydant qui participe à de nombreux mécanismes de détoxification : elle régénère l' α tocophérol et participe au cycle ascorbate glutathion ainsi qu'au cycle des xanthophylles.

Dans les feuilles des plantules témoins, une teneur moyenne en acide ascorbique de $1,90 \pm 0,25$ $\mu\text{mol/g}$ de MVF est enregistrée. Cette quantité augmente pour atteindre $2,58 \pm 0,92$ $\mu\text{mol/g}$ de MVF chez les plantules traitées par le norflurazon. Cette différence est non significative comparativement au témoin.

En présence d' α tocophérol et d'acide ascorbique les pourcentages d'augmentation sont respectivement 100,10% et 50,07%. En comparaison avec le témoin la variation observée est significative pour l' α tocophérol et non significative pour l'acide ascorbique.

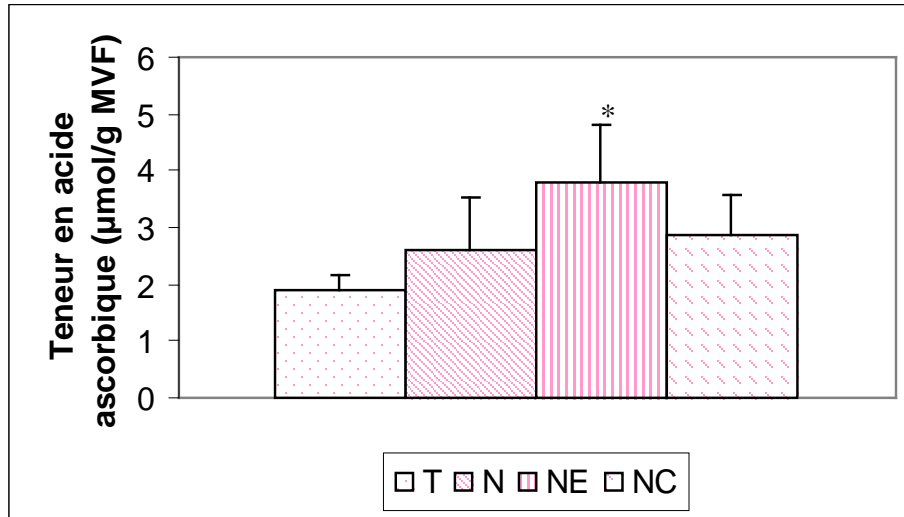


Figure 40 : Impact des antioxydants sur la teneur en acide ascorbique des feuilles des plantules d'arachide traitées par le norflurazon (T= témoin ; N= norflurazon 10⁻⁴ M ; NE= norflurazon 10⁻⁴ M + α tocophérol 0,25 mM ; NC= norflurazon 10⁻⁴ M + acide ascorbique 50 mM). * différence significative par rapport au témoin (P=0,05).

2-7- Teneur en glutathion réduit

Le glutathion réduit figure parmi les systèmes antioxydants mis en place par les plantes ; celui-ci est indispensable à la régénération de l'ascorbate.

Les teneurs en glutathion réduit sont données par la figure 41. Chez les plantules témoins la teneur en glutathion réduit est de $0,16 \pm 0,04$ mg/g de MVF, cette teneur s'élève pour atteindre $0,31 \pm 0,02$ mg/g de MVF chez les plantules traitées par le norflurazon, soit une augmentation de 98,13%. La différence observée est hautement significative comparativement au témoin. Sous l'effet de l'α tocophérol et de l'acide ascorbique la teneur en glutathion réduit est de $0,19 \pm 0,03$ mg/g de MVF et $0,19 \pm 0,02$ mg/g de MVF respectivement, soit des taux d'augmentation de 21,11% et 19,25% comparativement au témoin. En comparaison avec les plantules témoins, les différences observées sous l'effet de l'α tocophérol et l'acide ascorbique sont significatives.

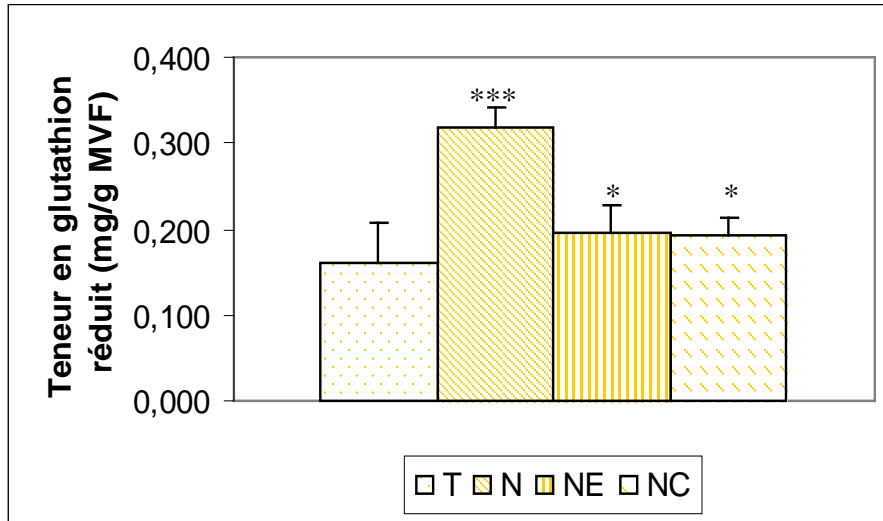


Figure 41 : Impact des antioxydants sur la teneur en glutathion réduit des feuilles des plantules d'arachide traitées par le norflurazon (T= témoin ; N= norflurazon 10^{-4} M ; NE= norflurazon 10^{-4} M + α tocophérol 0,25 mM ; NC= norflurazon 10^{-4} M + acide ascorbique 50 mM). *** différence hautement significative par rapport au témoin ($P=0,001$) ; * différence significative par rapport au témoin ($P=0,05$).

2-8- Activité de la glutathion s-transférase (GST)

Dans les plantes, les herbicides sont soumis à des réactions de métabolisation variées. La glutathion s-transférase est une enzyme importante impliquée dans la détoxification de nombreux herbicides. Elle permet la réaction de conjugaison de l'herbicide sur la molécule de glutathion. L'herbicide modifié est ainsi généralement moins toxique.

* Au niveau des racines :

L'activité Glutathion S Transférase au niveau des racines, diminue légèrement (11,57%), dans les plantules traitées par le norflurazon par rapport à celles des plantules témoins. Cette valeur passe de $0,09 \pm 0,01$ mmoles de complexe/min/mg de protéines pour le témoin à $0,08 \pm 0,01$ mmoles de complexe/min/mg de protéines pour le norflurazon (Figure 42 A).

L'addition d' α tocophérol et d'acide ascorbique accentue la diminution de cette activité qui est réduite de moitié (52,63% et 55,78% respectivement) par rapport à celle des plantules témoins.

L'étude statistique a montré que la diminution de l'activité de l'enzyme est non significative pour le norflurazon et hautement significative pour les deux antioxydants.

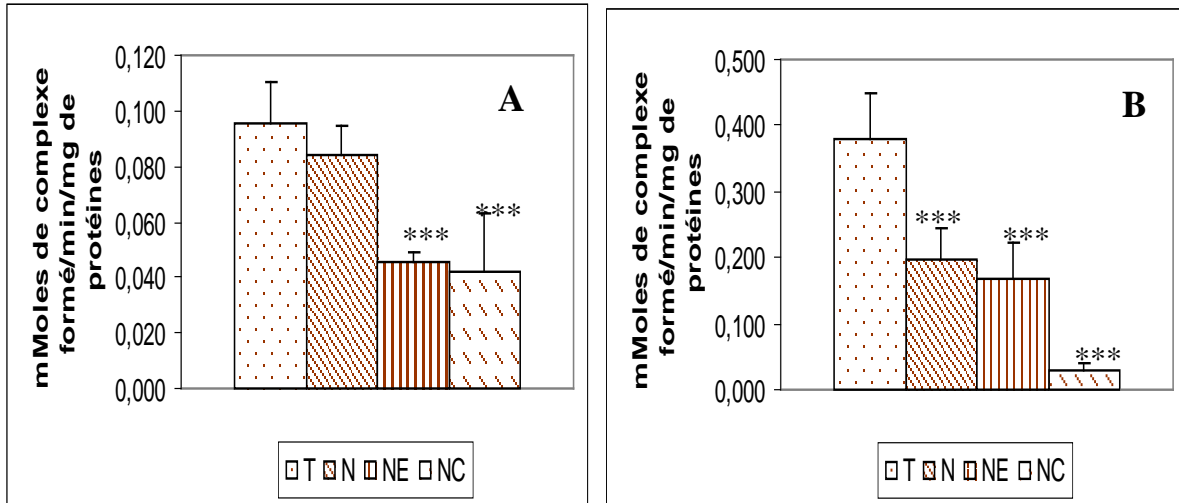


Figure 42 : Impact des antioxydants sur l'activité de la glutathion s-transférase des racines (A) et des feuilles (B) des plantules d'arachide traitées par le norflurazon (T= témoin ; N= norflurazon 10^{-4} M ; NE= norflurazon 10^{-4} M + α tocophérol 0,25 mM ; NC= norflurazon 10^{-4} M + acide ascorbique 50 mM). *** différence hautement significative par rapport au témoin (P=0,001).

*** Au niveau des feuilles (B) :**

L'activité GST dans les feuilles des plantules témoins est plus élevée (0,38) que celle des racines. Sous l'effet du norflurazon elle diminue de 47,63%. Cette activité diminue encore plus avec l'apport d' α tocophérol (55,52%) et avec l'ascorbate pour lequel le pourcentage de réduction est le plus important (91,84%).

L'étude statistique a révélé une différence hautement significative pour les trois traitements.

Discussion

V- Discussion :

Ce travail a pour but de comprendre les mécanismes de défense et/ou de résistance des plantes vis-à-vis des herbicides. Il consiste à étudier l'impact de l'apport de deux antioxydants l' α tocophérol et l'acide ascorbique sur la toxicité du norflurazon appliqué sur des plantules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.).

L'impact des deux antioxydants sur l'effet du norflurazon sur la croissance des plantules d'arachide a été évalué par la mesure de la longueur des parties aérienne et racinaire, la masse de matière sèche des parties aérienne et racinaire ainsi que la surface des feuilles.

Les paramètres métaboliques utilisés dans cette étude sont associés au mécanisme de la photosynthèse (les chlorophylles totales, les caroténoïdes, les sucres solubles et l'amidon), d'autres sont le reflet des dommages causés par le norflurazon au niveau des lipides membranaires (substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr-TBA) dont le malondialdéhyde) ou encore le reflet des mécanismes de protection des plantules (l' α tocophérol, l'acide ascorbique, le glutathion).

Nous avons par ailleurs évalué la capacité des plantules traitées à métaboliser l'herbicide par le biais de la glutathion s Transférase.

L'herbicide (norflurazon) utilisé au cours de cette étude agit aussi bien sur la morphologie que sur la physiologie des plantules d'arachide.

Le norflurazon à 10^{-4} M provoque des symptômes morphologiques apparents sur les plantules traitées : celles-ci sont partiellement dépigmentées phénomène de bleaching. La dépigmentation ou photobleaching est le principal aspect morphologique observé après traitement par certains herbicides tels le norflurazon, l'amtrole, l'acifluorfen... (Scalla, 1991). Par ailleurs, les différents paramètres morphologiques mesurés : croissance en longueur des tiges et des racines, masse sèche des parties aériennes et des parties racinaires, surface foliaire sont nettement moins importants que ceux des plantules témoins. Les rapports longueur et masse sèche des parties souterraines/longueur et masse sèche des parties aérienne ont montré que les racines sont moins affectées que les parties aériennes.

La diminution de la croissance est un phénomène souvent observé après traitement par les herbicides. (St John, 1985) a noté un ralentissement de la croissance du seigle soumis à l'effet d'un pyridazinone substitué le R-40244. Vecchia et al., (2001) ont également rapporté une réduction de la croissance des plantules de maïs traitées avec le norflurazon et l'amtrol.

Dans le cas du norflurazon la réduction de la croissance des plantules d'arachide est la conséquence de la diminution de la surface foliaire et des perturbations du métabolisme général des plantules. En effet, le norflurazon induit une diminution de la quantité des pigments photosynthétiques (caroténoïdes et chlorophylles).

Nos résultats sont en accord avec ceux de nombreux auteurs, utilisant des pyridazinones substitués, ainsi Lichtenthaler et Klendgen (1977) observent une diminution du taux des chlorophylles et de caroténoïdes chez les plantules de radis (*Raphanus*) et l'orge (*Hordeum*) traitées au SAN 6706.

La diminution des caroténoïdes que nous avons observé est dû à l'inhibition de la phytoène désaturase ; enzyme clé de leur biosynthèse et principale cible du norflurazon (Wilkinson,

1989 ; Scalla, 1991 ; Bramley et Palett, 1993) cet enzyme permet la désaturation du phytoène en phytofluène, ce qui a pour conséquence l'accumulation du phytoène (Linden et al., 1990).

La diminution des chlorophylles est due à une photooxydation par manque de caroténoïdes. En effet l'absence des caroténoïdes entraîne la formation de molécules actives d'oxygène (Jung et al., 2000) car le rôle le plus important de ces pigments est la protection contre les dommages photo-oxydants de l'appareil photosynthétique (Young, 1991).

Cette diminution des chlorophylles est due également à une déficience dans leur biosynthèse ; Oelmuller et Mohr (1986) ont montré que la dernière étape de biosynthèse des chlorophylles n'a pas lieu suite à la destruction par le norflurazon des structures chloroplastiques.

La forte baisse des teneurs en pigments photosynthétiques par le norflurazon se répercute sur l'activité photosynthétique des plantules d'arachide estimée par les teneurs en sucres solubles et en amidon qui diminuent de moitié. Cette réduction des glucides dérive non seulement du déficit en pigments photosynthétiques, mais aussi de la perte de l'expression de la plupart des gènes codant pour les protéines plastidiales dont les petites sous unités de la RubisCO (Tamada et al., 2003).

Le norflurazon bloque l'importation des protéines donc il se peut que la RubiSCo ne soit pas fonctionnelle.

La diminution de l'activité photosynthétique se répercute sur la masse sèche des parties aériennes et celle des racines, qui est également réduite. Nos résultats suggèrent donc une diminution sous l'effet du norflurazon de la synthèse des photosynthétats.

Nos résultats montrent que le norflurazon induit, via la production d'ERO, une peroxydation lipidique. Cette peroxydation lipidique a été évaluée par le dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr-TBA) dont le malondialdéhyde, molécule marqueur du stress oxydatif induit dans le cas présent par l'herbicide.

Le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (dont le MDA), montre que le norflurazon augmente le niveau de MDA dans les plantules traitées traduisant une détérioration des lipides membranaires. Cette augmentation du MDA est en relation avec la baisse des caroténoïdes observée et par conséquent de l'augmentation des molécules actives d'oxygène ; l'absence de caroténoïdes engendre effectivement la formation de l'oxygène singulet 1O_2 par manque d'extinction de l'état triplet de la chlorophylle (Knox et Dodge, 1985) entraînant ainsi la dégradation des chlorophylles et la peroxydation des lipides membranaires. Par ailleurs des travaux de Abrous et al., (1998 et 2009) ont rapporté de fortes modifications dans la composition lipidique des membranes cellulaires et en particulier celles du chloroplaste ainsi que dans leur degrés d'insaturation.

Le dosage du glutathion réduit qui est un puissant antioxydant impliqué dans des réactions antioxydatives, révèle que dans les feuilles de l'arachide la teneur en glutathion réduit augmente sous l'effet du norflurazon.

Coşkun et Zihnioğlu (2002) travaillant sur des plantules de blé, d'orge, de lentilles et de pois chiche traitées par divers xénobiotiques (herbicides et insecticides) ont montré des résultats variables du niveau de glutathion réduit selon la plante et le xénobiotique utilisé : la teneur en cet antioxydant est soit augmentée soit diminuée.

L'augmentation du glutathion réduit sous l'effet du norflurazon traduit une augmentation du stress oxydatif et suggère que les plantules d'arachide n'auraient pas utilisé cet antioxydant pour atténuer les effets délétères de l'herbicide.

En effet la mesure de la glutathion S transférase enzyme catalysant les réactions de conjugaison entre le glutathion, et des xénobiotiques dont les herbicides montre une diminution de cette activité sous l'effet du norflurazon aussi bien dans les racines que dans les feuilles des plantules traitées.

La plupart des études conduites sur la métabolisation des pesticides ont montré que ces derniers augmentent l'activité de la glutathion S-transférase (Fuerst et al., 1993 ; Jiang et Yang, 2009).

La diminution de l'activité de la glutathion S transférase dans les plantules traitées par le norflurazon laisse suggérer que cet herbicide n'est pas conjugué et/ou dégradé au niveau des racines et des feuilles des plantules traitées.

Coşkun et Zihnioğlu (2002) suggèrent que la glutathion S transférase peut ne pas être la seule enzyme induite par les pesticides ; selon ces auteurs d'autres enzymes impliquées dans la métabolisation des pesticides telles les cytochromes P oxydases peuvent être induites. En effet la conjugaison du glutathion avec le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène est largement utilisée pour la détection de l'activité glutathion-S-transférase, mais il peut ne pas détecter toutes les isoenzymes de la GST (Timmerman, 1989).

Ainsi selon Hunaiti et Ali (1991) et Mauch et Dudler (1993), l'induction de l'activité Glutathion S transférase dépend du groupe végétale et de l'espèce : Coşkun et Zihnioğlu (2002) ont rapporté que l'augmentation de l'activité de la GST chez des espèces monocotylédones (blé, orge) est supérieure à celles des espèces dicotylédones (pois chiche, lentille) traitées par un herbicide (linuron) et des insecticides (parathion methyl et malathion). L'induction de l'activité dépend également du xénobiotique, de la dose utilisée et des conditions de traitement.

L'application d'antioxydants exogènes α tocophérol et ascorbate ne semble pas diminuer la toxicité de l'herbicide utilisé.

En effet dans nos conditions expérimentales, et à la dose de l'herbicide utilisée (dose proche de celle préconisée en champs) mise à part une réduction du niveau de peroxydation des lipides par l' α tocophérol chez les plantules traitées, presque tous les autres paramètres biométriques et métaboliques mesurés n'ont pas été améliorés par les deux antioxydants.

Nos résultats ne concordent pas avec ceux de Havaux et al., (2005) travaillant sur des mutants d'arabidopsis ne possédant pas la vitamine E ; ceux-ci ont rapporté un phénomène de protection croisée entre les caroténoïdes et la vitamine E, les uns compensant l'absence de l'autre. L'interdépendance entre l' α -tocophérol et les caroténoïdes dans la protection de la structure et de la fonction du photosystème II a également été rapportée par Trebst, (2003) qui a montré chez *Chlamydomonas reinhardtii* exposée à des herbicides que l' α -tocophérol et le β -carotène coopèrent en limitant le niveau d'oxygène singulet protégeant ainsi le photosystème II.

L'application exogène de vitamine E ne semble pas compenser l'absence de caroténoïdes provoquée chez les plantules d'arachide par le traitement au norflurazon.

Les changements dans le niveau d' α tocophérol au cours d'un stress dépend de la sévérité du stress : dans le cas d'un stress modéré, il est noté une augmentation du niveau d' α tocophérol contribuant à la réduction des ROS et à la protection de la plante (diminution de la

péroxydation des lipides membranaires) ; lorsque le stress est sévère la dégradation de l' α tocophérol l'emporte sur sa synthèse et le niveau de cet antioxydant diminue (Munné-Bosch, 2005).

L'élimination chimique de l' $^1\text{O}_2$ par l' α tocophérol peut conduire à une nette perte des tocophérols, puisque les α tocophérol quinone et d'autres produits d'oxydation formés ne peuvent pas être recyclés en α tocophérol (Munné-Bosch et Alegre, 2002b).

Une dégradation irréversible de l' α tocophérol peut également se produire lorsque les radicaux tocophéroxyles, qui résultent de l'élimination du radical peroxyde par l' α tocophérol ne sont pas recyclés par l'ascorbate. Cela peut se produire, par exemple, lorsque la disponibilité de l'ascorbate dans les chloroplastes est limitée.

L'ascorbate (ou la vitamine C) a un rôle central dans les processus de détoxication cellulaire. Il désactive l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), réduit l'ion superoxyde et sert de substrat dans la détoxication enzymatique de H_2O_2 (par l'ascorbate peroxydase) (Asada, 1992). L'ascorbate est également connu pour sa capacité à réduire d'autres antioxydants oxydés comme la vitamine E ou les caroténoïdes (Asada, 1994).

L'apport exogène de vitamine C semble atténuer les effets inhibiteurs du norflurazon sur la croissance des plantules d'arachide.

Par ailleurs, bien que le niveau de MDA diminue sensiblement dans les feuilles des plantules soumises au norflurazon associé à un apport de vitamine C, la teneur en vitamine E diminue dans ces mêmes plantules ce qui suggère que ce dernier n'est pas recyclé par la vitamine C.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Leipner et al., (2000) qui montrent qu'un apport artificiel d'ascorbate n'améliore pas le recyclage de l'alpha tocophérol dans les plantules de maïs soumises à un stress froid.

Les caroténoïdes, les tocophérols, l'ascorbate et le glutathion sont interdépendants dans le contrôle des niveaux des ROS dans les plantes stressées et donc dans la limitation des dommages liés au stress oxydatif induit.

Dans nos conditions expérimentales, la forte réduction des caroténoïdes provoquée par le norflurazon semble entraîner des dommages au niveau morphologique et biochimique parfois non reversés par les deux antioxydants.

Les mécanismes de défense des plantes auxquelles ont été apportés les deux antioxydants n'ont pas permis d'éliminer l'excès des molécules actives d'oxygène et donc d'atténuer les dommages causés par le norflurazon.

Par ailleurs la vitamine E en réduisant la peroxydation des lipides diminue probablement la formation des oxylipines dont l'acide jasmonique qui joue un rôle clef dans la signalisation.

Selon la littérature, des études utilisant des mutants sousexprimant ou surexprimant des molécules ou des enzymes antioxydantes n'ont pas donné les résultats attendus. Les plantes déficientes ne se sont pas forcément montrées plus sensibles à des stress, et les plantes surexprimant des antioxydants se sont révélées n'être pas moins, voire plus sensibles, à des stress que les plantes témoins (Smirnoff, 1998 ; Foyer et Noctor, 2000 ; Arora et al., 2002 ; Edreva, 2005). Ces résultats mettent en évidence le fait que la régulation de la production d'ERO par les systèmes antioxydants est beaucoup plus complexe et plus fine que l'on ne le pense.

Conclusion générale

IV- CONCLUSION GENERALE :

Les résultats obtenus dans le cadre de nos expérimentations nous permettent de tirer les conclusions suivantes :

l'apport de l'alpha tocophérol et de l'ascorbate, ne modifient pas le phénotype des plantules d'arachide non stressées ; en effet, la comparaison des données des paramètres mesurés montre que la croissance des ces plantules ne diffère pas de celle des plantules témoins.

Le norflurazon agit aussi bien sur la morphologie que sur la physiologie des plantules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) population Niger feuille jaunes.

Le norflurazon affecte la croissance et la morphologie des plantules d'arachide en provoquant la réduction de la longueur des tiges et des racines, de la masse sèche des parties aériennes et des parties racinaires et de la surface foliaire et le blanchissement des plantules (Photobleaching).

Ces symptômes morphologiques sont la conséquence de plusieurs perturbations des mécanismes physiologiques.

Le norflurazon diminue la teneur en pigments photosynthétiques (caroténoïdes et chlorophylles). Cette chute est due à l'inhibition de la phytylène désaturase ; enzyme clé de la voie de biosynthèse des caroténoïdes et principale cible du norflurazon. Il s'ensuit alors une photooxydation des chlorophylles par manque de protection par les caroténoïdes.

Une conséquence de l'inhibition de la synthèse des pigments photosynthétiques est la réduction de l'activité photosynthétique caractérisée par une diminution des teneurs en sucres solubles et en amidon.

Le norflurazon en inhibant la synthèse des caroténoïdes engendre un stress oxydatif induisant une augmentation du MDA marqueur de la peroxydation des lipides et traduisant une détérioration des membranes.

Dans les plantules traitées par le xénobiotique, il est observé une diminution de l'activité de la glutathion S transférase. Ce résultat laisse suggérer que le norflurazon n'est pas dégradé et/ou conjugué au niveau des racines et des feuilles des plantules traitées d'où les effets toxiques manifestés au niveau phénotypique mais également à l'échelle cellulaire.

La réponse à l'application du stress se traduit par une réduction des quantités en α tocophérol due, éventuellement, à une dégradation de la vitamine E engendré par le norflurazon.

Les fortes teneurs des molécules antioxydantes (ascorbate et glutathion) en présence de norflurazon suggère que les plantules d'arachide n'ont pas utilisées ces antioxydants pour atténuer les effets délétères de l'herbicide.

L'application des deux antioxydants l' α tocophérol et l'acide ascorbique en présence du norflurazon n'atténue pas les effets toxiques de l'herbicide aussi bien au niveau phénotypique que physiologique ou encore métabolique.

Toutefois l'apport d' α tocophérol semble protéger les acides gras des lipides membranaires contre la peroxydation engendré par le norflurazon, mais cet effet protecteur ne semble pas suffisant face aux autres dommages occasionnés par l'herbicide.

De nombreux systèmes antioxydants (caroténoïdes, tocophérols, ascorbate et glutathion) sont interdépendants ce qui rend parfois difficile l'interprétation des résultats obtenus.

De plus, des études sur *Arabidopsis thaliana* montrent que certains mécanismes impliqués dans les défenses antioxydantes seraient espèce- ou famille-spécifiques (Luhua et al., 2008).

La manipulation de la défense cellulaire (enzymes, antioxydants, glutathion) contre le stress oxydatif pourrait être la solution pour modifier la sensibilité des cellules aux activités cytotoxiques des herbicides.

Il est donc important de chercher à mieux comprendre les mécanismes d'action des herbicides qui provoquent un stress oxydatif afin de tenter d'en contrôler la toxicité.

Pour une meilleure appréciation du comportement des plantules d'arachide vis-à-vis du norflurazon et de l'impact des antioxydants exogènes sur l'effet du norflurazon, il serait intéressant de compléter et d'enrichir ce travail par :

- Une application d' une faible dose de norflurazon afin de maintenir un certain niveau de caroténoïdes.
- Un prétraitement des feuilles par les antioxydants avant l'application de l'herbicide.
- Une étude de l'accumulation intracellulaire de produits résultants de l'oxydation des glucides, protéines et acides nucléiques (autres que ceux de l'oxydation des lipides). Ceci permettrait ainsi d'avoir une signature des dommages cellulaires causés par les ROS en condition de stress norflurazon et de tolérance induite par l'apport d'antioxydants.
Ces molécules pourraient ainsi servir de marqueurs ou de combinaison de marqueurs capables de prédire les altérations cellulaires associées à chaque type de stress oxydatif.
- L'étude de l'impact des antioxydants sur la nodulation des plantes soumises à l'herbicide.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbasi AR, 2007** Functional analysis of tocopherol biosynthesis in plants. Thèse. 171p.
- Abrous O., 1982**– Mode d'action d'un phénol nitré le dinoterbe sur la respiration et la photosynthèse . Thèse de Magister . ISN . (USTHB).
- Abrous O., 2004** – Contribution à l'étude du métabolisme lipidique des feuilles de soja *Glycine max* L. par une approche multidisciplinaire : effets d'un herbicide le Norflurazon. Thèse de Doctorat. 166p. (USTHB).
- Abrous O., Benhassaine – Kesri G., Tremolières A. et Mazliak P. 1998** - Effect of norflurazon on lipid metabolism in soya seedlings. *Phytochemistry*, **49** (4), 979 – 985.
- Abrous O, De Paepe R, Tremolières A, Mathieu C, Aïd F et Benhassaine – Kesri G. 2009** Evidence that Norflurazon Affects Chloroplast Lipid Unsaturation in Soybean Leaves (*Glycine max* L.). *J. Agric. Food Chem.* **57**. 11434-11440.
- Ackashi T., Izumi K., Nagano E., Enamoto M., Mizunok. et Shibaoka H., 1988.** – Effects of propyzamide on tobacco cell microtubules in vivo and in vitro. *Plant Cell Physiol.*, **29** : 1053 – 1062.
- Ait Ali N. 2008.** Etudes des mécanismes d'inhibition du transport des électrons photosynthétiques induite par les xénobiotiques affectant les réactions photochimiques du photosystème II. Thèse de doctorat. Université du Québec, Montréal. 142 pages.
- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC 2002** Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.* **82**: 1227-1238.
- Asada K 1992.** Ascorbate peroxidase. A hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* **85**: 235-241.
- Asada K 1994.** Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants. C.H. Foyer and P.M. Mullineaux. Boca Raton, CRC Press: 77-104.
- Belkebir A., 2007** - Contribution à l'étude du métabolisme lipidique et de l'acétyl-CoA Carboxylase de dicotylédones (*Glycine max* L, *Brassica napus* L et *Nicotiana sylvestris* L) : Effets de la séthoxydime. Thèse de Doctorat. 123p. (USTHB).
- Bertrand P 2008.** Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse de doctorat de l'université de toulouse. 284p.
- Bezpalý, I. 1984** Les plantes cultivées en Afrique occidentale. Editions MIR. Moscou. 279p.
- Blee E 2002** Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science* **7**(7): 315-322.
- Bowler. C. et al. 1992** Superoxide dismutases and stress tolerance. *Annu. Rev. PlantPhysiol. Plant Mol. Biol.* **43**. 83-116.

Bradford M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*. **72**: 248-254.

Bramley P. M., 1994. – Carotenoide biosynthesis : a target site for bleaching herbicides. *Lipid Biochemistry and Pesticid Action*. **22** (2) : 525-629.

Bramley P. M et Palett K. E ., 1993 - Phytoene desaturase : A Biochemical target of many bleaching herbicides. *Brighton Crop protection conference weed*, **68** (2) : 713 – 721.

Brash, A. 1999 Lipoxygenases : occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* **274**, 23679-23682.

Breitenbach, J.; Zhu, C.; Sandmann, G. 2001 Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5270-5272.

British pharmacopoeia 1986 - Printed in the united kingdom for HMSO (Ireland). volume I, P : 675 – 677.

Burns E. R., Buchanan G. A et Carter M. C., 1971 - Inhibition of carotenoid synthesis as a mecanisme of action for amitrol, dichlormate and pyrichlor. *Plant. Physiol.* **47**, P. 144 – 148.

Carol P, Stevenson D, Bisanz C, Breitenbach J, Sandmann G, Mache R, Coupland G et Kuntz M 1999 Mutations in the *Arabidopsis* gene *immutans* cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell* **11**: 57-68.

Chatterjee S., Bhattacharya S. 1984 – detoxication of industrial pollutants by the glutathione S-transferase system in the liver of *Anabas testudineus* (bloch). *Toxicol. Lett.*, **22** : 87 – 198.

Cillard J. et Cillard P. 2006. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *John Libby Eurotext* **13** (1).

Clavel D., Gautreau J., 1997. L'arachide. *In* l'amélioration des plantes tropicales. Eds. Charrier A., Jacquort M., Hamon S., Nicolas D., 61-82 p.

Collin VC, Eymery F, Genty B, Rey P et Havaux M 2008. "Vitamin E is essential for the tolerance of *Arabidopsis thaliana* to meyal-induced oxidative stress." *Plant, Cell and Environment* **31**(2): 244-257.

Coşkun, G et Zihnioğlu, F. 2002 Effect of Some Biocides on Glutathione-s-Transferase in Barley, Wheat, Lentil and Chickpea Plants. *Turk J Biol* **26**: 89-94.

Cvetkovska M, Rampitsch C, Bykova N et Xing T. 2005. Genomic analysis of MAP Kinase cascades in *Arabidopsis* defense responses. *Plant Mol Biol Rep.* **23**:331-343.

Davies A.O. et Harwood J.L. 1983 – Effect of substituted pyridazinones on chloroplast structure and lipid metabolism in greening barley leaves. *J. Exp. Bot.*, **34**, 1089 - 1100.

Derot. M. , Rathery. M., 1972 - Diabète et maladie de la nutrition. ed Flammarion. P : 815 – 822.

De Tullio, M., Liso, R., Arrigoni, O. 2004 Ascorbic acid oxidase : an enzyme in search of a role. *Biologia Plantarum*, Vol. **48**, No. 2, pp. 161 – 166.

Dodge A.B., 1982. – The role of light and oxygen in the action of photosynthetic inhibitor herbicides. In Biochemical responses induced by herbicides. Morlland D.E., St John J.B., Hess F.D. [eds.], Acs Symposium Series, American – Chemical Society, Washington., pp 57 – 77.

Duke S. O., 1985 – Effects of herbicides on non photosynthetic biosynthetic processus. Vol. II *Herbicide physiology*. S.O. Duke, Edt., 1985, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.

Duke S. O., 1990 – Overview of herbicide mechanisms action. *Environnemental health perspectives*. **87**, 263-271.

Edreva, A., 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agric. Ecosyst. Env.*,**106**, 119-133.

Ellman G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **82**: 70-77.

Fath A, Bethke P, Beligni V, Jones R. 2002 Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells. *J of Exp Bot*. **53**: 1273-1282.

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

Feussner I, Wasternack C. 2002 The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev Plant Biol*. **53**: 275-297.

Finckh, B. F. et Kunert K. J. 1985. Vitamins C and E : An antioxidative system against herbicide-induced lipid peroxidation in higher plants. *J. Agric. Food Chem*. **33**: 574-577.

Foyer CH., 1993.- Antioxydatifs in higher plants of oxygene. *Planta*. 157-239.

Foyer CH, Halliwell B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**: 21-25.

Foyer CH, Lelandais MA. 1996. A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasmalemma membranes of pea leaves mesophyll cells. *Journal of Plant Physiology* **148**: 391-398.

Foyer CH, Noctor G. 2000. Tansley Review 112. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist* **146**: 359-388.

Foyer CH, Noctor G. 2005 Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses, *Plant Cell* **17**: 1866-1875.

Frenot. M., Vierling. E., 1996 - Biochimie des aliments diététiques du sujet bien portant. Doin Edition. P : 155 – 188.

Freyssinet T. G., 1990. – Résistance aux herbicides et transfert de gènes. *Phytoma*. **415** : 9 – 13.

Fryer MJ 1992. "The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E (alpha-tocopherol)." *Plant, Cell and Environment* **15**(4): 381-392.

Fuerst, E.P., Irzyk, G.P. et Miller, K.D. 1993 Partial characterization of glutathione-s-transferase isozymes induced by the herbicide safener benoxacor in maize. *Plant Physiol.* **102**: 795-802.

Geiger D.R., Kapitan S.W. et Tucci M.A., 1986. – Glyphosate inhibits photosynthesis and allocation of carbon to starch in sugar beet leaves. *Plant Physiol.*, **82** : 468 – 472.

George G, Buchanan G., 1990 – Isolation properties and induction of plaice liver cytosolic glutathione S-transferases. *Fish Physiol. & Biochem.* **6**: 437-449.

Gillier P. et Sylvestre P., 1969 : L'arachide. Ed. Maisonneuve et Larose, Paris, 292 p.

Grusak, M.A., et DellaPenna, D. 1999. Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 133-161.

Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. 1974. Glutathione S-transferases. The first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**: 7120-7130.

Havaux M 1998 Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plant Sci* **3**: 147-151.

Havaux M, Lütz C, Grimm B. 2003 Chloroplast membrane photostability in *chlP* transgenic tobacco plants deficient in tocopherols. *Plant Physiol.* **132**, 300-310.

Havaux M, Eymery F, Porfirova S, Rey P et Dörmann P. 2005 Vitamin E Protects against Photoinhibition and Photooxidative Stress in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Cell* **17**:3451-3469.

Hodges, M., Andrews, D., Johson, J., Hamilton, I., 1996. Antioxidant compound responses to chilling stress in diferentially sensitive inbred maize lines. *Physiologia Plantarum* **98**, 685-692.

Hodges DM, DeLong JM, Forney CF et Prange PK 1999. "Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds." *Planta* **207**(4): 604-611.

Horemans N, Foyer CH, Asard H. 2000. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in Plant Science* **5**: 263-267.

Hunaiti, A. et Ali, B.R. 1991 The induction of chickpea glutathione-s-transferase by oxadiazon, *Phytochemistry*, **30**: 2131-2134.

Index phytosanitaire , 1993.- INPV. (Alger).

Jiang, L., Yang, H., 2009 Prometryne-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in wheat. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* doi: 10.1016/j.ecoenv.2009.04.025.

Joyard, J. ; Teyssier, E. ; Miège, C. ; Berny-Seigneurin, D. ; Maréchal, E. ; Block, M. A.; Dorne, A. J.; Rolland, N.; Ajlani, G.; Douce, R. 1998. The biochemical machinery of plastid envelope membranes. *Plant Physiol.*, **118**, 715 – 723.

Jung S.Y., Kim J.S., Cho K.Y., Tae G.S. et Kang B.G. 2000 – Antioxidant responses of cucumber (*Cucumis sativus*) to photoinhibition and oxidative stress induced by norflurazon under high and low PPFDs. *Plant Science*, **153** :145-154.

Kagan, V.E. 1989 Tocopherol stabilizes membrane against phospholipase A, free fatty acids, and lysophospholipids. In *Vitamin E: biochemistry and health implications*. Diplock, A.T et al. (Eds.). *Ann. NY Acad. Sci.*, **570**, 121-135.

Karleskind A., 1992 - Manuel des corps gras (tome I). ed Lavoisier Tec and Doc. P : 104 – 105.

Karrapetyan KN., 1993 – Photosynthesis and herbicides : effect of pyridazinones on chloroplast function and biogenesis. In : <<Photosynthesis, photoreaction to plant productivity>>, prasmma MONHANTY Klumwer academic publishers : 181-198.

Khelifa N., 2002 - Effects d'un herbicide : le Sulfosulfuron sur la germination, le début de croissance et le métabolisme cellulaire des feuilles de soja *Glycine max* L. Mémoire de thèse de Magister. 80p.

Knox JP, Dodge AD 1985 The photodynamic action of eosin, a singlet-oxygen generator. *Planta* **164**: 22-34.

Kolattukudy P. E. et Brown L., 1974.- Inhibition of cuticular lipid biosynthesis in *Pisum sativum* by thiocarbamates. *Plant. Physiol.*, **53**, 903 – 906.

Krieger-Liszkay A. et Rutherford A. W., 1998 – Influence of herbicide binding on the redox potential of the quinone acceptor in photosystem II : relevance to photodamage and phytotoxicity. *Biochemistry*, **37**, 17339 – 17344.

Krieger-Liszkay A et Trebst A 2006. "Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre." *Journal of Experimental Botany* **57**(8): 1677-1684.

Krinsky, N.I. et Yeum, K.J. 2003 'Carotenoid-radical interactions', *Biochemical and Biophysical Research Communications* **305**, 754-760.

Kruk J, Holländer-Czytko H, Oettmeier W, Trebst A 2005 Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *J Plant Physiol* **162**:749-757.

Landrieu. P., 1987 - Tocophérol, les vitamines. ed. Masson (Paris). P : 59 – 79.

- Larson RA. 1988.** The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* **27**: 969-978.
- Lehnen LP. et Vaughn KC. 1992** – The herbicide B disrupts spindle microtubule organizing centers. *Pestic Biochem Physiol* **44**: 50–59.
- Leipner J, Stamp P, Fracheboud Y 2000** Artificially increased ascorbate content affects zeaxanthin formation but not thermal energy dissipation or degradation of antioxidants during cold-induced photooxidative stress in maize leaves. *Planta*. **210**: 964-969.
- Lemerini W., 2005** - Contribution à l'étude des paramètres cinétiques de l'ascorbate oxydase de courgette verte (*Cucurbita pepo medullosa*). Ebauche d'un capteur optique pour le dosage de l'acide ascorbique. Mémoire de thèse de Magister. 138p. Université Abou-Bekr Belkaid – Tlemcen.
- Liavonchanka A et I Feussner 2006.** Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology*. **163**(3): 348-357.
- Lichtenthaler H.K. 1987.** Chlorophylls and carotenoids : Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methodes in enzymology*. **148**: 350-382.
- Lichtenthaler H.K., et Klendgen H.K., 1977** - Effect of the herbicide San 6706 on biosynthesis of photosynthetic pigments and prenyl quinones in *hordeum* seedlings. *Z. Naturforsch.* **32**, 236 – 240.
- Lignowski EM. et Scott EG., 1972.** - Effect of trifluralin on mitosis. *Weed . Sci.*, **20**, 267 – 270.
- Linden H., Sandmann G., Chamowitz D., Hirschber GJ. et Boger P., 1990.** – Biochemical characterisation of synechococcus mutants selected against the bleaching herbicide norflurazon. *Pestic . Biochem . Physiol.*, **36** : 46 – 51.
- Liotenberg S, North H et Marion-Poll A 1999** Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiol Biochem* **37**: 341-350.
- Luhua S, Ciftci-Yilmaz S, Harper J, Cushman J, Mittler R 2008** Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic *Arabidopsis* plants expressing proteins of unknown function. *Plant Physiol* **148**: 280-292.
- Marez M., Jehl, B., Madet, N. 2004** L'acide ascorbique et son utilisation en tant qu'additif dans les industries alimentaires. Université Paris XII, Val de Marne : Licence IUP SIAL, 23p.
- Matringe M. et Scalla R., 1988** – Effects of acifluorfen methyl on cucumber cotyledons : porphyrin accumulation. *Pestic . Biochem . Physiol.*, **32**, 164 – 172.
- Matringe M., Camadro J.M., Labbe P. et Scalla R., 1989.** – Protoporphyrinogen oxidase inhibition by three peroxidizing herbicides : oxadiazon, L.S 82 – 556 and M et B 39279. *FEBS Lett.*, **245** : 35 – 38.
- Mauch, F. et Dudler, R. 1993** Differential induction of distinct glutathione-S-transferase of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.*, **102**: 1193-1201.

May MJ, Vernoux T, Leaver C, Van Montagu M, Inze D. 1998. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* **49**: 649-667.

Mc Ready R.M, Guggoz J., Silverir V. et Owensh S. 1950. Determination of starch and analyse in vegetables. *Swedish Weed Conference*. 99-106.

Moller, I.M. Jensen P.E et Hansson A., 2007 – Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**: 459-81.

Möllers C. et Albrecht S. 1994. Screening herbicide effects on lipid metabolism of storage lipids by *in vitro* culture of microspore-derived embryoids of *Brassica napus*. *J. Plant Physiol.* **144**, 376-384.

Morosinotto, T., Caffari S., Dall' Osto L. et Bass R. 2003. "Mechanistic aspect of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids". *Physiol. Plant.*, vol. **119**, p. 347-354.

Mourad G. et King J., 1992 – Effect of four classes of herbicides on growth and acetolactate synthase activity in several variants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta.*, **107**, 43 – 52.

Mozzo M., Dall'Osto L., Hienerwadel R., Bassi B. et Croce R. 2008. "Photoprotection in the antenna complexes of Photosystem II: role of individual xanthophylls in chlorophyll triplet quenching". *J. Biol. Chem.* **283**, 6184-6192.

Munné-Bosch S, Alegre L. 2002a - The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit Rev Plant Sci*; **21**: 31–57.

Munné-Bosch S, Alegre L. 2002b Interplay between ascorbic acid and lipophilic antioxidant defences in chloroplasts of water-stressed *Arabidopsis* plants. *FEBS Lett*; **524**: 145-8.

Munné-Bosch S. 2005 The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*; **162**: 743-748.

Murphy D.J., Harwood J.L., Lee K.A., Roberto F., Stumpf P.K., et St John J.B., 1985 – Differential responses of a range of photosynthetic tissues to a substituted pyridazinone, Sandoz 97 85. Specific effects on fatty acid desaturation. *Phytochem.*, **24**, 1923 - 1929.

Nikkels A.F., Piérard-Franchimont C. et Piérard G.E. 2005. Photobiologie moléculaire. *Revue Médicale de Liege.* **60** (I) : 21-33.

Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249–279.

Oelmuller R. et Mohr H., 1986 – Potooxidative destruction of chloroplasts and its consequences for expression of nuclear genes. *Planta*, **167**, 106-113.

Ouarkoub S., Mamou F., 2000 - Etude du dosage de la rétinolémie et de la tocophérolémie par deux techniques comparatives : Relation liant le cholestérol avec la vitamine E. Ingéniorat en Génie biologique, USTHB, Faculté de biologie.

Pang C.-H. et Wang B.-S. 2008. Oxidative Stress and Salt Tolerance in Plants. In Luttge U. et al. (eds.), *Progress in Botany*. **69**: 231-245. Springer.

Patricia L. Conklin, Elizabeth H. Williams, et Robert L. Last 1996. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9970-9974.

Peeters A. et Salembier JF., 1994 – Contrôle des mauvaises herbes. In : Agronomie moderne, Bases physiologiques et agronomiques de la production végétale, El Hassani TA.: 428 – 464.

Pincemail, J. 2003. Directeur Scientifique PROBIOX SA. Université de Liège, Tour de Pathologie 2^{ème} étage Sart Tilman. 4000 Liège, Belgique.

Polle A 1997 Defense against photo-oxidative damage in plants. In JG Scandalios, ed, Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 623-666.

Quinn, P.J. 1998 Localization of vitamin E in membranes. In *Subcellular Biochemistry. Volume 30: fat soluble vitamins*. Quinn, P. and V.E. Kagan (eds). Plenum Press, New York.

Rajasekharan R. et Sastry PS., 1987 - Effect of pyridazinone herbicides on lipid metabolism in Groundnut *Arachis hypogea* leaves. *Pesticides Biochemistry and physiology*. **29**, 163 – 176.

Rhobbe-Durant P., 1990. – Classification chimique des herbicides organiques et de synthèse. Index phytosanitaire. *Acad., ed.*, **26** : 213 – 308.

Ricour C., Navarro , 1993 - Vitamine : Extrait de nutrition pédiatrique. P: 247- 251.

Ribera D., 1990 - Métabolisme oxydatif chez la moule : peroxydation lipidique et biotransformation des xénobiotiques. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux I.

Saadallah K., Drevon J.-J., Abdelly C., 2001 Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline, *Agronomie* **21** : 627-634.

Salin ML., 1987 – Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast *Physiol . Plant.* **72**, 681 – 689.

Salvi, D.; Rolland, N.; Joyard, J.; Ferro, M. 2008 Purification and Proteomic analysis of chloroplasts and their sub-organellar compartments. *Methods Mol. Biol.*, **432**, 19-36.

Sandmann G., Linden H., Böger P. 1989 – Enzyme-kinetic studies on the interaction of norflurazon with phytoene desaturase. *Z. Naturforsch.*, **44**: 787-790.

Sandmann G. et Albrecht M., 1990 – Accumulation of colourless carotenes and derivatives during interaction of bleaching herbicides with phytoene desaturation . *Z . Naturforsch .* **45**, 487 – 491.

Scalla R., 1991 – Les herbicides : mode d'action et principes d'utilisation. INRA, Paris. ISBN.

Schilling R., 2003. L'arachide : Histoire et perspective. Résumé de la Conférence donnée à Agropolis Museum, 5 février 2003, 14 p.

Servaites J.C., Tucci M.A., Geiger D.R., 1987. – Glyphosate effects on carbon assimilation, ribulose biphosphate carboxylase activity, and metabolite levels in sugar beet leaves. *Plant Physiol.*, **85** : 370 – 375.

Shao HB, Chu LY, Lu ZH, Kang CM 2008 Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *Int J Biol Sci* **4**: 8-14.

Simkin, A. J.; Breitenbach, J.; Kuntz, M.; Sandman, G. 2000 - In vitro and in situ inhibition of carotenoid biosynthesis in *Capsicum annuum* by bleaching herbicides. *J. Agric. Food Chem.*, **48** (10), 4676-80.

Sinnhuber R. O. et Yu T.C., 1958. "Characterization of the red pigment formed in 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity". *J. Food Sciences* **23**: 626-633.

Smirnoff N. 1998 - Plant resistance to environmental stress. *Curr Opin Biotechnol.* **9**: 214-219.

Smirnoff N. 2000.- Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 229–235.

Smirnoff N., 2005. Antioxidants and Reactive Oxygène Species in Plants. Blackwell Publishing, Oxford.

Soares A.F. 2005. Effet du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : adiponectine et prostaglandines. Thèse de doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. 133 pages.

Soll J, Schultz G, Joyard J, Douce R, Block A. 1985 Localization and synthesis of Prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from Spinach chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* ; **238** : 290-9.

St John JB., 1982 – Effects of herbicides on the lipid composition of plant membrane. In Biochemical responses induced by herbicides. *ACS Symp . Se. 181*, Moreland D. E., St John J. B. and Hess F. D., Eds ., American Society, Washington, D C.

St John JB., 1985 - Action of R – 40244 on chloroplast pigments and polar lipid. *Pesticide Biochem , and physiol.*, **23**, 13 – 18.

Szymańska R, Kruk J 2008 Tocopherol content and isomers' composition in selected plant species. *Plant Physiology and Biochemistry* **46** 29-33.

Tamada Y., Imanari E., Kurotani K.I., Nakai M., Andreo S.A. et Izui K. 2003 – Effect of photooxidative destruction of chloroplasts on the expression of nuclear genes for C₄ photosynthesis and for chloroplast biogenesis in maize. *J. Plant Physiol.*, **160**: 3-8.

- Tardy F, Havaux M. 1997** Thylakoid membrane fluidity and thermostability during the operation of the xanthophyll cycle in higher-plant chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **1330**: 179-193.
- Telfer A, Dhimi S, Bishop SM, Phillips D et Barber J 1994** β -Carotene Quenches Singlet Oxygen Formed by Isolated Photosystem II Reaction Centers. *Biochemistry*, **33**, 14469.
- Thomas CE, McLean LR, Parker RA, Ohlweiler DF. 1992.** Ascorbate and phenolic antioxidant interactions in prevention of liposomal oxidation. *Lipids* **27**: 543–550.
- Timmerman, K.P. 1989** Molecular characterization of corn glutathione-s-transferase isozymes involved in herbicide detoxication. *Physiologia Plantarum* **77**:465-471.
- Tissut M. et Séverin F. 1984** – Plantes, herbicides et désherbage: Bases scientifiques et techniques. Association de coordination technique agricole. ACTA, Paris, pp 251.
- Trebst A. 2003** Function of β -carotene and tocopherol in photosystem II. *Z Naturforsch*; **58c**: 609-20.
- Vecchia D.F., Barbato R., La Rocca N., Maro I. et Rascio N. 2001** – Response to bleaching herbicides by leaf chloroplasts of maize plants grown at different temperatures. *Journal of Experimental Botany*, **52 (357)**: 811-820.
- Vidi P, Kanwischer M, Baginsky S, et al. 2005** Tocopherol cyclase (VTE₁) Localization and Vitamin E Accumulation in Chloroplast Plastoglobule Lipoprotein Particles. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.*
- Wassal, S.R.; Wang, L.; McCabe, R.C.; Ehringer, W.D.; Stillwell, W. 1986** Deuterium NMR-study of the interaction of alpha-tocopherol with a phospholipids model membrane. *Biochemistry*, **25**, 319-326.
- Weiser H, Vecchi M. 1982.** Stereoisomers of alpha-tocopheryl acetate. II. Biopotencies of all eight stereoisomers, individually or in mixtures, as determined by rat resorption-gestation tests. *Int J Vitam Nutr Res* **52**:351-370.
- Wilkinson R.E. 1985** – Carotenogenic inhibition by norflurazon in Wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **23**, 370-375.
- Wilkinson RE., 1989** – Terpenoid biosynthesis as a site of action for herbicide safeners. *Acad. Press . INC.*, **10**, 221 – 420.
- Wilkinson R.E., 1991** – Reversal of norflurazon carotenogenesis inhibition by aminomethyl modified norflurazon molecules. *Biochem. Life Sci. Adv.*, **10**, 199-204.
- Willemot C., Slack CR., Browse J. et Roughan PG., 1982** – Effect of BASF 13-338, a substituted pyridazinone on lipid metabolism in leaf tissue of spinach, pea, linseed, and wheat. *Plant . Physiol.*, **70**, 78-81.

Wrona, M., Manowska, M. et Sarna, T. 2004 'Zeaxanthin in combination with ascorbic acid or α -tocopherol protects ARPE-19 cells against photosensitized peroxidation of lipids', *Free Radical Biology and Medicine* **36**, 1094-1101.

Yoshikawa T., Yamomoto Y., Naito Y. 2000 – Free radicals in chemistry, *Biology and Medicine*, Oica International, (UK). 580 p.

Young A.J., 1991 - The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia Plantarum*. **83**, 702 –708.

Zagnitko O., Jelenska J., Tevzadze G., Haselkorn R. et Gornicki P., 2001 – An isoleucine / leucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclo – hexanedione inhibitors . *Proc . Nalt . Acad . Sci , USA , 98*, 6617 – 6622.

Liste des figures

- Figure 1 : Plante d'arachide.
- Figure 2 : Structure chimique de la famille des pyridazinones.
- Figure 3 : Sites d'action du norflurazon au niveau de la biosynthèse des caroténoïdes et des acides gras.
- Figure 4 : Schéma de métabolisation d'un herbicide.
- Figure 5 : Réaction d'Haber-Weiss.
- Figure 6 : Origine des différents espèces réactives de l'oxygène.
- Figure 7 : Peroxydation lipidique.
- Figure 8 : Peroxydation de l'acide linoléique et linoléinique.
- Figure 9 : Cycle des xanthophylles.
- Figure 10 : Structure générale des tocophérols et des tocotriénols.
- Figure 11 : Destruction membranaire et insertion de la vitamine E.
- Figure 12 : Elimination des ROS et interruption de la chaîne de peroxydation des lipides par l' α tocophérol.
- Figure 13 : Forme radicalaire, forme réduite et forme oxydée de la vitamine C.
- Figure 14 : Cycle Ascorbate-glutathion.
- Figure 15 : Mécanisme fonctionnel de la glutathion peroxydase.
- Figure 16 : Interactions entre les caroténoïdes, les tocophérols et l'ascorbate.
- Figure 17 : Graines de la population Niger feuilles jaunes.
- Figure 18 : Structure de l' α -tocophérol.
- Figure 19 : Structure de l'acide ascorbique.
- Figure 20 : Mise en culture des graines d'arachide et mode de traitement.
- Figure 21 : Courbe d'étalonnage du dosage des sucres solubles.
- Figure 22 : Courbe d'étalonnage du dosage du malondialdéhyde.
- Figure 23 : Courbe d'étalonnage du dosage des protéines.
- Figure 24 : Courbe d'étalonnage du dosage de l'acide ascorbique.
- Figure 25 : Photo montrant un chromatogramme liquide à haute performance HPLC.
- Figure 26 : Courbe d'étalonnage du dosage de glutathion.
- Figure 27 : Morphologie des plantules d'arachide en présence des deux antioxydants après 4 semaines de culture.
- Figure 28 : Impact des antioxydants sur la morphologie des plantules d'arachide traitées par le norflurazon après 4 semaines de culture.
- Figure 29 : Impact des antioxydants sur la longueur des tiges et de la racine principale des plantules d'arachide traitées par le norflurazon.
- Figure 30 : Impact des antioxydants sur la surface foliaire des plantules d'arachide traitées par le norflurazon.
- Figure 31 : Impact des antioxydants sur la masse de matière sèche de la partie aérienne et des racines des plantules d'arachide traitées par le norflurazon.
- Figure 32 : Impact des antioxydants sur la teneur en chlorophylles totales des feuilles des plantules d'arachide traitées par le norflurazon.
- Figure 33 : Impact des antioxydants sur la teneur en caroténoïdes des feuilles des plantules d'arachide traitées par le norflurazon.
- Figure 34 : Impact des antioxydants sur la teneur en sucres solubles des feuilles des plantules d'arachide traitées par le norflurazon.
- Figure 35 : Impact des antioxydants sur la teneur en amidon des feuilles des plantules d'arachide traitées par le norflurazon.
- Figure 36 : Impact des antioxydants sur la teneur en malondialdéhyde des feuilles des plantules d'arachide traitées par le norflurazon.

Figure **37** : Chromatogramme standard d' α tocophérol 0,4 g/l obtenu en HPLC.

Figure **38** : Chromatogramme des feuilles des plantules d'arachide obtenu par HPLC.

Figure **39** : Impact des antioxydants sur la teneur en α tocophérol des feuilles des plantules d'arachide traitées par le norflurazon.

Figure **40** : Impact des antioxydants sur la teneur en acide ascorbique des feuilles des plantules d'arachide traitées par le norflurazon.

Figure **41** : Impact des antioxydants sur la teneur en glutathion réduit des feuilles des plantules d'arachide traitées par le norflurazon.

Figure **42** : Impact des antioxydants sur l'activité de la glutathion s-transférase des racines (**A**) et des feuilles (**B**) des plantules d'arachide traitées par le norflurazon.

Liste des tableaux

Tableau **I** : Modes d'action de certains pyridazinones selon leur degrés de substitutions.

Tableau **II** : Paramètres d'analyse en HPLC de l' α tocophérol.

Tableau **III** : Mesures de paramètres de croissance chez les plantules d'arachide témoin, plantules en présence d' α tocophérol 0,25 mM et plantules mises en présence de l'acide ascorbique 50 mM âgées d'un mois.

Tableau **IV** : Mesures des paramètres métaboliques dans les feuilles des plantules d' arachide témoins, plantules en présence d' α tocophérol 0,25 mM (TE), plantules mises en présence de l'acide ascorbique 50 mM (TC) âgées d'un mois.

Tableau **V** : Rapport longueur des racines/ longueur de la partie aérienne des plantules d'arachide témoins et traitées.

Tableau **VI** : Rapport masse sèche des racines/ masse sèche de la partie aérienne des plantules d'arachide témoins et traitées.

Tableau **VII** : Indice de sensibilité des plantules d'arachide traitées.

Tableau **VIII** : Rapport chlorophylles totales/ caroténoïdes des feuilles des plantules d'arachide témoins et traitées.

ABSTRACT

Norflurazon is a bleaching herbicide known to block carotenoid biosynthesis by inhibiting phytoene desaturase activity. Carotenoids are important quenchers of the triplet chlorophyll and singlet oxygen thus absence initiating photooxydative processes and reduces photoprotection of the photosynthetic apparatus induced by oxidative stresses.

Norflurazon 100 μ M in absence or in presence of two antioxidants α tocopherol (0,25mM) or ascorbate (50mM) was applied in pre-emergence on peanut (*Arachis hypogaea* L.). Norflurazon treatment allows to partially or totally photobleached plants which were noticeably smaller than the control (length of shoots and roots, dry weight of shoots and roots, leaf area). Norflurazon impairs the photosynthetic activity by decreasing photosynthetic pigments (carotenoids and chlorophylls) and by reducing quantities of soluble sugar and starch. The determination of malondialdehyde (MDA) a marker of lipid peroxidation showed that its contents is higher in treated plants this was related to enhanced of reactive molecules species by the herbicide and to decreased of endogenous α tocopherol. Norflurazon treatment caused a decrease in glutathione s transferase activity in peanut roots and leaves.

The apport of the two antioxidants did not decrease the phytotoxicity of norflurazon although we observed a decrease in MDA content. In other hand, the reduction of lipid peroxydation by α tocopherol could reduce the oxilipines synthesis as jasmonic acid which plays an important role in signalisation.

Key words : norflurazon, *Arachis hypogaea*, oxidative stress, photobleaching, lipid peroxidation, antioxidants, α tocopherol, ascorbate, glutathion s transferase.

ملخص

النورفلورازون هو مبيد أعشاب مبيض مثبط ال phytoène désaturase إنزيم رئيسي يشارك في صنع الجزرين. الجزرين من أهم محطمي اليخضور الثلاثي و الأكسجين الأحادي غيابه يؤدي إلى عملية الأكسدة بفعل الضوء و يقلل من حماية جهاز التركيب الضوئي. النورفلورازون (100 μ M) بمفرده أو بالاشتراك مع الالفا توكوفيرول (0,25 Mm) أو حمض الاسكوربيك (50Mm) طبق قبل ظهور شتلات الفول السوداني (*Arachis hypogaea* L.). النورفلورازون يؤدي إلى photobleaching جزئي أو كلي في الشتلات و انخفاض في نموها مقارنة مساحة الورقة). من ، الكتلة الجافة للجزء العلوي و الترابي ، مع شتلات الشاهد (طول الساق و الجذور الناحية الفيزيولوجية النورفلورازون يحول دون التركيب الضوئي من خلال خفض محتوى الاصبغة الجزرين) و السكريات القابلة للذوبان في الماء و النشاء. ان تحديد كمية المالونيل الدهيد علامة أكسدة دهون الأغشية اضررت أن محتواه عالي في الشتلات المعالجة بسبب زيادة جزيئات الأكسجين النشط الناجمة عن المبيد. النورفلورازون يخفض نشاط (esaréfsnart s noihtatulg) في جذور و أوراق الفول السوداني. الجلوتاتيون اس ترانسفيراز إضافة اثنين من المواد المضادة للأكسدة لم يقلل من الآثار السامة للنورفلورازون على الرغم من انخفاض مستوى المالونيل الدهيد. من جهة أخرى الالفا توكوفيرول عن طريق الحد من أكسدة الدهون ربما يقلل من تكوين oxylipines مثل acide jasmonique الذي يلعب دور رئيسي في الإشارة.

، الدهون الفول السوداني ، التوترا الاكسيجيني ، photobleaching ، أكسدة ، كلمات البحث : النورفلورازون ، توكوفيرول ، أسكورات ، الجلوتاتيون اس ترانسفيراز . الالفا مضادات الأكسدة ،

