

N° d'ordre : 38/012 – M/SB

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI
BOUMEDIENE USTHB / ALGER

Faculté des Sciences Biologiques



Présenté par
M^{elle} **KARAALI Karima**

En vue de l'obtention du diplôme de
MAGISTER EN SCIENCES DE LA NATURE
Option : Biologie et Physiologie Cellulaire et Moléculaire

THEME

**Effet de deux herbicides (Norflurazon, Prométryne) sur la
croissance et la nodulation de l'arachide
(*Arachis hypogaea* L.).**

Soutenu publiquement le : 25 / 01 / 2012 devant le jury composé de :

M.	R. AMIROUCHE	Maître de Conférences A	USTHB/FSB	Président
M.	Y. KACI	Maître de Conférences A	USTHB/FSB	Directeur de mémoire
Mme.	O. ABROUS	Professeur	USTHB/FSB	Examinatrice
Mme.	F. RAHMANIA	Professeur	USTHB/FSB	Examinatrice
M.	S. AMRANI	Maître de Conférences A	USTHB/FSB	Examineur

Remerciements

Avant de présenter les résultats de ce travail, je voudrais remercier tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à sa réalisation.

Je tiens à remercier particulièrement en tout premier lieu mon directeur de thèse M^r Kaci Y. de m'avoir accueillie dans le laboratoire de biologie des sols au sein de la FSB/USTHB et de m'avoir dirigé tout le long de ce travail. Je tiens à le remercier encore une fois parce qu'il a su orienter mes recherches aux bons moments en me faisant découvrir la pensée scientifique. Malgré son emploi de temps chargé, il a toujours été disponible pour d'intenses et fructueuses discussions.

Je tiens également à remercier les membres de jury pour le temps qu'ils m'ont accordé malgré leur charge de travail :

M^r Amirouche R. Maître de conférences à l'USTHB, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

M^{me} Abrous- Belbachir O. Professeur à l'USTHB, M^{me} Rahmania F. Professeur à l'USTHB et M^r Amrani S. Maître de conférences à l'USTHB qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie aussi M^{me} Djebara M. de LBS pour nous avoir fourni gracieusement les souches bactériennes.

Enfin, à tous les membres du laboratoire « biologie des sols » spécialement Zakia et Nadia, avec qui j'ai vécu de riches moments depuis mon premier jour au laboratoire, merci pour leurs conseils dans la vie quotidienne, leurs encouragements et leur soutien amical, les échanges scientifiques et culturels que nous avons pu avoir.

Je tiens à remercier Assia, Faiza et Soraya pour leurs soutiens et leurs encouragements pendant toutes ces années et tous ceux qui ont participé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Un merci tout particulier à toute ma famille qui m'a soutenue et encouragée depuis toujours, dans mes études et dans la vie en général.

Sommaire

	Résumé.....	1
I.	Introduction.....	2
II.	Revue bibliographique.....	4
1.	Azote.....	4
2.	La fixation biologique de l'azote.....	4
2.1.	Fixateurs libres.....	6
2.2.	Fixateurs symbiotiques de l'azote.....	6
3.	Molécule responsable de la fixation biologique.....	7
3.1.	Nitrogénase.....	7
3.1.1.	Structure.....	7
3.1.2.	Mécanisme moléculaire de la fixation.....	8
4.	Symbiose.....	8
5.	Symbiose <i>Rhizobia</i> – légumineuses.....	9
5.1.	Macrosymbionte.....	9
5.1.1.	La phylogénie des légumineuses.....	10
5.1.2.	<i>Arachis hypogaea</i> L.....	10
5.1.2.1.	Origine.....	10
5.1.2.2.	Systématique.....	11
5.1.2.3.	Morphologie de l'arachide.....	11
5.2.	Microsymbionte.....	13
5.2.1.	Taxonomie.....	13
5.2.2.	Caractères généraux.....	14
6.	La nodulation.....	16
6.1.	Reconnaissance.....	16
6.2.	Infection.....	16
6.3.	Organogénèse.....	17
7.	La nodulation de l'arachide (<i>Arachis hypogaea</i> L.).....	17
8.	Structure et fonctionnement des nodules.....	21
8.1.	Structure.....	21

8.2.	Fonctionnement des nodules.....	22
9.	Les herbicides	23
9.1.	Définition.....	23
9.2.	Classification des herbicides.....	23
9.2.1.	Classification par voie de pénétration.....	24
9.2.2.	Classification des herbicides en fonction de leurs mode d'action.....	24
9.3.	Les pyridazinones.....	26
9.4.	Les triazines.....	27
9.5.	Devenir des herbicides dans le sol.....	28
9.6.	Type de dégradation.....	29
9.7.	Devenir des herbicides dans la plante.....	30
II.	Matériel et méthodes.....	32
1.	Matériel.....	32
1.1.	Matériel végétal	32
1.2.	Sol	32
1.3.	Matériel biologique	33
1.4.	Herbicides.....	34
1.5.	Milieus de culture.....	35
2.	Méthodes.....	36
2.1.	Mise en culture de l'arachide (<i>A. hypogaea</i>).....	36
2.1.1.	Sélection et stérilisation des semences.....	36
2.1.2.	Germination des graines	36
2.2.	Tests physiologiques	37
2.2.1.	Effet des herbicides sur la plante	37
2.2.2.	Effet des herbicides sur les bactéries	37
2.3.	Analyse morphologique.....	37
2.4.	Extraction et dosage des pigments.....	38
2.5.	Indice de tolérance pour les plantules mises en culture hydroponique.....	39
2.6.	Test de nodulation	39
2.6.1.	Préparation de l'inoculum.....	39
2.6.2.	Inoculation des plantes en pots et en culture hydroponique	40
2.6.3.	Action des herbicides sur la symbiose (<i>Rhizobium-Arachis hypogaea</i> L.).....	41
2.7.	Traitement statistique et analyse des données.....	41

III.	Résultat et discussion	42
1.	Effet des herbicides (norflurazon, prométryne) sur la croissance de deux souches bactériennes (R30, Br12).....	42
1.1	Croissance des souches bactériennes (R30, Br12) en absence des herbicides (norflurazon et prométryne).....	42
1.2	Croissance des souches bactériennes (R30, Br12) en présence des herbicides (norflurazon et prométryne).....	42
2.	Effet du norflurazon sur la croissance des plantules d'arachide.....	44
2.1	Elongation de la plante en fonction des concentrations du norflurazon.....	44
2.2	Évolution de la biomasse en fonction de la concentration en norflurazon appliquée.....	45
2.3	Impact du norflurazon sur le contenu pigmentaire.....	47
3.	Effet de la prométryne sur la croissance des plantules d'arachide.....	50
3.1	Effet sur l'élongation des plantules.....	50
3.2	Effet sur la biomasse des plantules.....	51
3.3	Effet sur le contenu pigmentaire.....	52
4.	Effet de l'inoculation sur la symbiose (<i>Rhizobium-Arachis hypogaea</i> L.).....	55
4.1	Infectivité des souches.....	55
4.2	Efficiéce des souches.....	55
5.	Effet du norflurazon sur les plantules d'arachide (<i>Arachis hypogaea</i> L.) inoculées par deux souches bactériennes (R30 et Br12).....	57
5.1.	Effet sur la nodulation.....	57
5.2.	Effet sur la croissance.....	58
6.	Effet de la prométryne sur les plantules d'arachide (<i>Arachis hypogaea</i> L) inoculées par deux souches bactériennes (R30 et Br12).....	62
6.1	Effet sur la nodulation.....	62
6.1.1.	Effet sur la croissance.....	62
IV.	Discussion générale	66
V.	Conclusion	72
VI.	Bibliographie	74
VII.	Annexe	

INDEX DES FIGURES

Figure 1	Cycle d'azote et sa relation avec les trois compartiments: l'atmosphère, le sol et la biomasse (animale et végétale).....	5
Figure 2	Structure du complexe enzymatique « Nitrogénase », selon Rubio et Ludden, 2005.....	7
Figure 3	Mécanisme moléculaire de la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac par la Nitrogénase. (Godfroy, 2008).....	8
Figure 4	Morphologie générale de la plante d'arachide.....	12
Figure 5	Photographies met en évidence des nodules formés au niveau des racines et des tiges par les bactéries fixatrices symbiotiques.....	13
Figure 6	Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques implique les facteurs Nod. (Deléglise, 2001).....	19
Figure 7	Etapes du processus de nodulation lors de la symbiose Légumineuse-Rhizobium (Perret <i>et al.</i> , 2000).....	20
Figure 8	Structure des nodules de légumineuses et des plantes actinorhiziennes. (Pawlowski et Bisseling, 1996).....	21
Figure 9	Fixation de l'azote et transport de l'ammonium dans le symbiosome. (Day <i>et al.</i> , 2001).....	22
Figure 10	Comportement de l'herbicide dans la plante.....	24
Figure 11	Structure de quelques herbicides de la famille des pyridazinones.....	26
Figure 12	Structure de quelques herbicides de la famille des triazines.....	27
Figure 13	Phases de métabolisation des herbicides dans les cellules de la plante...	31
Figure 14	Aspect morphologique des gousses et des graines d'arachide (<i>Arachis hypogaea</i> L.).....	32
Figure 15	Photographies des colonies deux souches bactériennes (Br12 et R30) sur milieu de production (YEMA et YESA).....	34
Figure 16	Photographies des graines d'arachide (<i>Arachis hypogaea</i> L.) avant et après germination.....	36
Figure 17	Dispositif expérimental de culture d'arachide en pots.....	40
Figure 18	Dispositif expérimental de culture en condition hydroponique.....	41
Figure 19	Photographies illustrant l'effet du norflurazon sur la croissance de la	

	R30 et Br12.....	43
Figure 20	Photographies illustrant l'effet de la prométryne sur la croissance de la R30 et Br12.....	43
Figure 21	Élongation de la plante d'arachide (<i>Arachis hypogaea</i> L.) en fonction des concentrations appliquées du norflurazon.....	44
Figure 22	Photographies montrant l'effet du norflurazon sur la morphologie des plantules d'arachide.....	47
Figure 23	Croissance des plantules d'arachide (<i>Arachis hypogaea</i> L.) sous l'effet du norflurazon.....	49
Figure 24	Élongation de la plante d'arachide (<i>Arachis hypogaea</i> L.) en fonction de la prométryne.....	50
Figure 25	Photographies montrant l'effet de la prométryne sur la morphologie des plantules d'arachide.....	53
Figure 26	Croissance des plantules d'arachide (<i>Arachis hypogaea</i> L.) sous l'effet de la prométryne.....	54
Figure 27	Photographie des nodules racinaires obtenus après 3 semaines de culture lors du test de nodulation.....	56
Figure 28	Effet de 3 concentrations de norflurazon sur les plantules d'arachide (<i>Arachis hypogaea</i> L.) inoculées par la souche Br12 durant 5 semaines de culture.....	60
Figure 29	Effet de 3 concentrations de norflurazon sur les plantules d'arachide (<i>Arachis hypogaea</i> L.) inoculées par la souche R30 durant 5 semaines de culture.....	61
Figure 30	Effet de 3 concentrations de prométryne sur les plantules d'arachide (<i>Arachis hypogaea</i> L.) inoculées par la souche Br12 durant 5 semaines de culture.....	64
Figure 31	Effet de 3 concentrations de prométryne sur les caractères morphologiques des plantules d'arachide (<i>Arachis hypogaea</i> L.) inoculées par la souche R30 durant 5 semaines de culture.....	65

INDEX DES TABLEAUX

Tableau I.	Les variétés d'arachide (<i>Arachis hypogaea</i> L.) les plus cultivées au monde selon Nyabyenda, 2005.....	11
Tableau II.	Composition chimique de la graine d'arachide cultivée (Bewley et Black, 1994).....	12
Tableau III.	Classification des bactéries nodulants les légumineuses (N'zoué <i>et al.</i> , 2006).....	15
Tableau IV.	La classification des herbicides selon leurs mode d'action.....	25
Tableau V.	Caractéristiques morphologiques de l'arachide (<i>Arachis hypogaea</i> L.).....	32
Tableau VI.	Principales caractéristiques du sol (ITGC de Oued Smar).....	33
Tableau VII.	Principales caractéristiques des herbicides (norflurazon et prométryne).....	35
Tableau VIII.	Test de nodulation.....	55
Tableau IX	Effet de l'inoculation sur la croissance des plantules d'arachide.....	57
Tableau X	Effet du norflurazon sur le test de nodulation.....	58
Tableau XI.	Effet de la prométryne sur la nodulation des plantules d'arachide.....	62

Liste des abréviations

NH ₄	Ammoniac
N	Azote
BNL	Bactéries nodulants les légumineuses
cm	Centimètre
°C	Degré Celsius
H ₂ O	Eau
e ⁻	Electron
EPS	Exopolysaccharides
Fe	Fer
Fig.	Figure
g	Gramme
H	Heure
Kda	Kilo dalton
Mg	Magnésium
µg	Microgramme
µm	Micromètre
mg	Milligramme
ml	Millilitre
M	Molaire
Mo	Molybdène
nm	Nanomètre
NO ₃	Nitrate
ox	Oxydé
O ₂	Oxygène
P	Poids
PA	Poids aérien
PR	Poids racinaire
pH	Potentiel hydrogène
%	Pourcentage
qsp	Quantité suffisante pour
PR/PA	Rapport (poids racinaire sur le poids aérien)
C/N	Rapport Carbone/Azote
red	Réduit
ADNr 16S	Ribosomal Desoxyribonucleic acid
Tab	Tableau
tr/min	Tours par minute
TSA	Trypticase Soya Agar
YEMA	Yeast Extract Mannitol Agar

Résumé

La fixation biologique de l'azote atmosphérique constitue le principal mécanisme d'incorporation d'azote dans la biosphère, elle consiste à transformer le diazote en ammoniac, forme assimilable par les végétaux.

La symbiose bactérie-légumineuse, une des voies la plus importante de cette transformation, est soumise à de nombreux facteurs qui peuvent avoir des effets bénéfiques ou néfastes. Dans ce cadre, notre étude consiste à tester l'effet de deux herbicides (le norflurazon et la prométryne) sur la croissance des plantules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.), des souches bactériennes (R30, Br12) et sur l'interaction bactérie - légumineuse.

Dans un premier temps, nous avons effectué une étude morphologique et physiologique des caractères de croissance des plantules cultivées en pots et en conditions hydroponiques.

En seconde partie, dans l'objectif d'étudier le processus symbiotique, un test d'inoculation est effectué en utilisant deux souches bactériennes.

Les résultats obtenus ont montré que :

- Le degré de tolérance des plantes et des bactéries diffère non seulement par le type d'herbicide mais aussi par les doses utilisées.
 - La réduction de la croissance et du développement des plantules d'arachide en présence des herbicides est due à des perturbations physiologiques (inhibition de la photosynthèse), se traduisant sur le plan morphologique.
 - Les plantules traitées par le norflurazon présentent un ralentissement dans la croissance des tiges et des racines. En plus, un phénomène de photobleaching se manifeste et se traduit par une dépigmentation des plantules.
 - Les plantules traitées par la prométryne présentent aussi un ralentissement dans la croissance de la partie aérienne et un allongement important des racines, par contre les feuilles sont de taille réduites et de couleur verte.

Le test d'inoculation est jugé positif en absence des herbicides vu la formation des nodules. Ceci confirme l'infectivité des souches bactériennes inoculées et la spécificité de la relation symbiotique.

En présence de l'un des deux herbicides (norflurazon ou prométryne) à différentes concentrations (10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M) ; il y a eu échec du processus de nodulation chez les plantules cultivées en pots ; en revanche une importante stimulation de la croissance du système racinaire a été observée en présence du norflurazon, une inhibition dans la croissance des plantules d'arachide (partie aérienne et racinaire) en présence de la prométryne et un prolongement des entre-nœuds quelque soit le type d'herbicide utilisé.

Les mêmes expérimentations en conditions hydroponiques ont montré des résultats comparables à ceux obtenus en pots.

Mots clés : Arachide (*Arachis hypogaea* L.), Bactérie, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, symbiose, inoculation, nodulation, herbicide, norflurazon, prométryne.

Introduction

Introduction

L'azote est un élément présent en grande quantité chez les êtres vivants. Dans le sol par exemple, les teneurs en azote assimilable par les plantes sont faibles, ce qui constitue souvent un des facteurs limitant la croissance des végétaux. L'azote est cependant, très abondant dans l'atmosphère (N_2), mais seuls certains microorganismes sont capables de l'utiliser, comme les bactéries dites « diazotrophes » qui possèdent le complexe enzymatique « nitrogénase ».

Ces micro-organismes diazotrophes vivent libres, ou en association plus ou moins étroite avec des végétaux.

La symbiose *Rhizobium*-Légumineuses par exemple constitue l'association la plus importante et la plus étudiée, car c'est une interaction à bénéfice réciproque : les microorganismes fournissent aux légumineuses des composés nécessaires pour leur croissance et en retour, la plante met à la disposition des populations bactériennes de nombreuses substances carbonées (énergie), assurant ainsi la croissance des bactéries dans la rhizosphère (Baudoin *et al.*, 2003).

L'association symbiotique *Rhizobium*-Légumineuse présente un haut niveau de spécificité, basé sur un dialogue moléculaire entre les deux partenaires. Cette relation se manifeste par la formation des structures racinaires qu'on appelle « nodules », siège de la fixation d'azote atmosphérique.

Les légumineuses sont subdivisées en trois sous-familles, Ceasalpinioideae, Mimosoideae et Papillioideae (Lewis *et al.*, 2005) et le nombre de genres capables de former des nodules racinaires donc d'entretenir une relation symbiotique avec des *Rhizobia* est variable (Allen et Allen, 1981 ; Polhill et Raven, 1981). Alors qu'il n'y a que quelques genres non-nodulants chez les Papillioideae et les Mimosoideae, la sous-famille Ceasalpinioideae, moins spécialisée, inclut de nombreux genres non-nodulants (de Faria *et al.*, 1989).

A cause de leur importance écologique, économique et agronomique en Algérie, les légumineuses détiennent une place importante parmi les végétaux cultivés et constituent avec les céréales l'épine dorsale du système alimentaire algérien.

Le deuxième partenaire de la relation symbiotique est représenté par les bactéries nodulant les légumineuses ; parmi elles les *Rhizobia* occupent la partie majoritaire de ce groupe. Ils appartiennent à la famille des Rhizobiaceae, qui est subdivisée en cinq genres différents : *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium* et *Bradyrhizobium*

Les deux genres bactériens *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, nodulant spécifiquement l'arachide (*Arachis hypogaea*) comportent des espèces, respectivement à croissance rapide et lente.

Plusieurs facteurs entravent l'installation de la symbiose. Parmi ces facteurs nous citerons particulièrement la pollution chimique (engrais chimiques, pesticides...etc.) qui occasionne au niveau des sols des problèmes de production. A ce titre, certains pesticides persistants, demeurent dans le sol sous forme de résidus pour des périodes plus ou moins longues en fonction de leur vulnérabilité et constituent ainsi un problème écologique majeur.

Cette contamination par les résidus affecte non seulement le sol et les plantes, mais aussi la microflore bactérienne. Cette situation a conduit l'émergence de mécanismes de tolérance où de résistance chez de nombreux microorganismes.

Ce travail consiste, à déterminer le comportement de deux souches bactériennes: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et de l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) vis à vis de deux herbicides (Norflurazon et Prométryne). L'effet de ces deux herbicides sur la symbiose a été également évalué.

Revue bibliographique

1. Azote

Tout comme le carbone, l'azote est le deuxième élément nutritif pour la plante, car il intervient dans le processus de la formation des molécules organiques notamment les acides aminés, les protéines, les acides nucléiques et la chlorophylle. Cette importance résulte de la présence d'azote dans l'atmosphère dans un rapport approximatif de 78%, ce qui constitue un réservoir important disponible et accessible à toute espèce sur la surface de la terre, toutefois, malgré son abondance, l'azote se présente sous une forme chimique ($N\equiv N$) stable et non assimilable par la plupart des plantes .

Trois voies de fixation permettent aux plantes d'assimiler l'azote disponible dans l'environnement:

- **La voie de fixation par décharge électrique** : qui consiste à transformer le N_2 en NO_3 par réaction de réduction à base d'oxygène
- **La voie de fixation industrielle** : qui consiste à transformer le diazote en ammoniac (engrais azotés).
- **La voie de fixation biologique** : qui consiste à transformer le N_2 en ammoniac puis en nitrite (microorganismes).

Les trois voies de fixation d'azote nécessitent des échanges complexes entre trois compartiments différents : atmosphère, sol et la biomasse (animale, végétale), ce qui permet la réalisation du cycle d'azote.

Le cycle d'azote regroupe trois étapes principales : Ammonification, dénitrification et absorption. (**Fig. 1**)

2. La fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote atmosphérique constitue le principal mécanisme d'incorporation d'azote dans la biosphère, elle incorpore tous les ans 60% d'azote fixé. À titre de comparaison, la moitié de cette quantité est fixée industriellement (Arp, 2000) et les 10% restant par décharge électrique.

Les organismes eucaryotes sont incapables de fixer l'azote parce qu'ils ne possèdent pas la machinerie biochimique appropriée. La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes, simplement parce qu'ils possèdent un complexe enzymatique, nommé **dinitrogénase**, qui catalyse la réduction de l'azote en ammoniac (Hopkins, 2003).

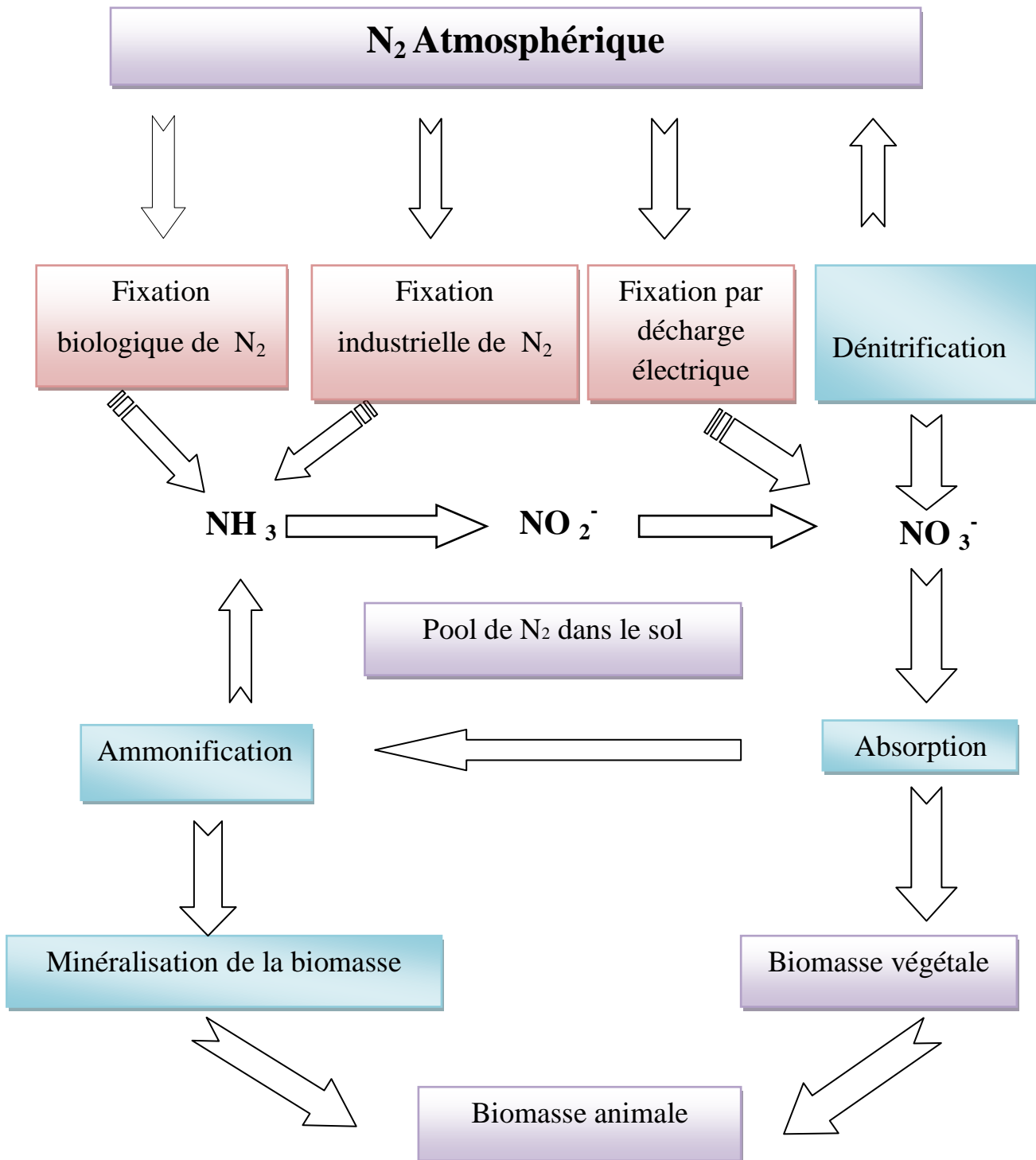


Figure 1. Cycle de l'azote et sa relation avec les trois compartiments: l'atmosphère, le sol et la biomasse (animale et végétale).

Ces organismes procaryotes sont connus par **des fixateurs d'azote** qui comprennent à la fois **des fixateurs libres** qui ne requièrent pas d'hôte pour effectuer le processus. En revanche, d'autres fixateurs d'azote sont **symbiotique** et fixe l'azote seulement en association avec certaines plantes et avec des champignons (lichens). (Madigan *et al.*, 2007) .

2.1. Fixateurs libres

Ce sont des bactéries qui habitent les sédiments marins, les tubes digestifs des animaux, les surfaces des feuilles et les sols (Hopkins *et al.*,2003).Ces différents habitats, permettent aux organismes vivants d'être départagés en plusieurs groupes :

- ✓ Bactéries aérobies : *Azotobacter*, *Azomonas*
- ✓ Bactéries anaérobies : *Clostridium*, *Bacillus*, *Klebsiella*
- ✓ Bactéries phototrophes : *Rhodospirillum*, *Chromatium*
- ✓ Les cyanobactéries : *Nostoc*, *Anabaena*, *Tolypothrix*, *Cylindrospermum*, *Colothrix*, *Rivularia* (Richter, 1993)

On estime que ces bactéries apportent environ 7 kilos d'azote par hectare et par an.

2.2. Fixateurs symbiotiques de l'azote

Les bactéries symbiotiques introduisent chaque année dans les cycles biologiques 120 millions de tonnes d'azote, soit plus du double de l'apport dû aux bactéries libres (Davet, 1996), alors qu'ils sont nettement moins nombreuses que les fixatrices libres.

Parmi ces fixateurs, nous citons : les *Rhizobia*, actinomycètes et les cyanobactéries. (Pelmont, 1995).

3. Molécule responsable de la fixation biologique

3.1. Nitrogénase

3.1.1 Structure

La nitrogénase est une métallo-enzyme formé de deux composants protéiques majeurs :

✓ **Protéine à molybdène-fer** : appelé composant I ou dinitrogénase, son poids moléculaire est de 220 Kda et codé par deux gènes : *nif K* et *nif D* (Howard et Rees,2000.), c'est une hétérotétramère ($\alpha_2\beta_2$) qui contient du Fe et Mo, chaque monomère contient un centre [4 Fe - 4 S] reliés entre eux deux par deux. Ce tétramère est associé à un cofacteur protéique qui contient 8 Fe et 2 atomes de molybdène (Mo) (Leclerc, 1995 ; Hopkins, 2003), elle est impliquée dans le processus de la réduction (présence d'un site de réduction).

✓ **Protéine à fer** : composant II ou la dinitrogénase réductase, c'est une homodimère (2 sous – unités identiques), elle est de 64 Kda, codé par le gène *nif H* (Howard et Rees, 2000.). Elle se caractérise par la présence d'un seul centre [4 Fe - 4 S], alimenté en électrons par une ferrédoxine ou flavodoxine, elle se couple à sa partenaire à molybdène, en lui cédant un électron et hydrolyse de l'ATP (Leclerc, 1995 et Hopkins, 2003) ; elle représente le donneur d'électrons. (Fig.2)

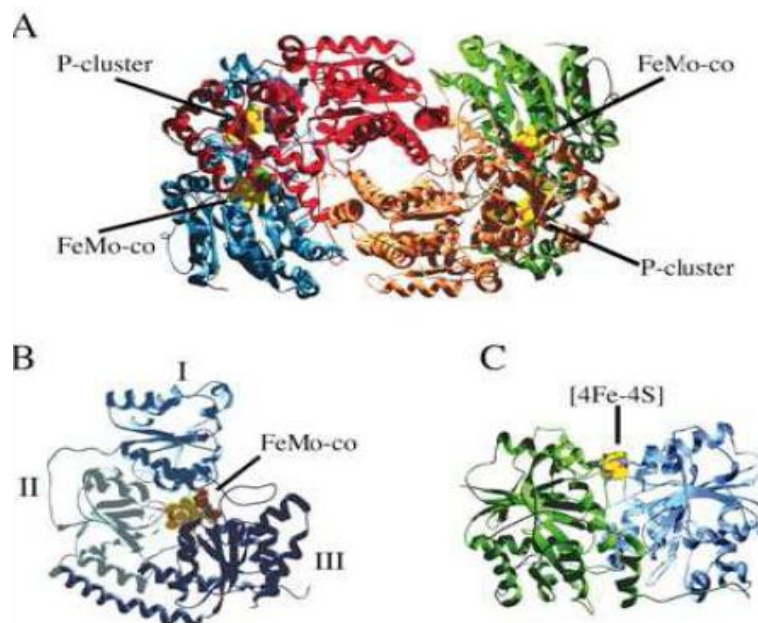


Figure 2. Structure du complexe enzymatique « Nitrogénase », selon Rubio et Ludden, 2005.

- A. Aspect générale de la structure
- B. Structure du composant I
- C. Structure du composant II

3.1.2. Mécanisme moléculaire de la fixation

La réduction de l'azote en ammoniac est une réaction qui nécessite une très grande dépense d'énergie pour l'activation, au moins 8 électrons et 16 ATP (4 ATP par paire d'électrons sont acquises), car l'azote moléculaire est un gaz non réactionnel avec une triple liaison entre les deux atomes d'azote.

L'équation de la réaction chimique est la suivante :

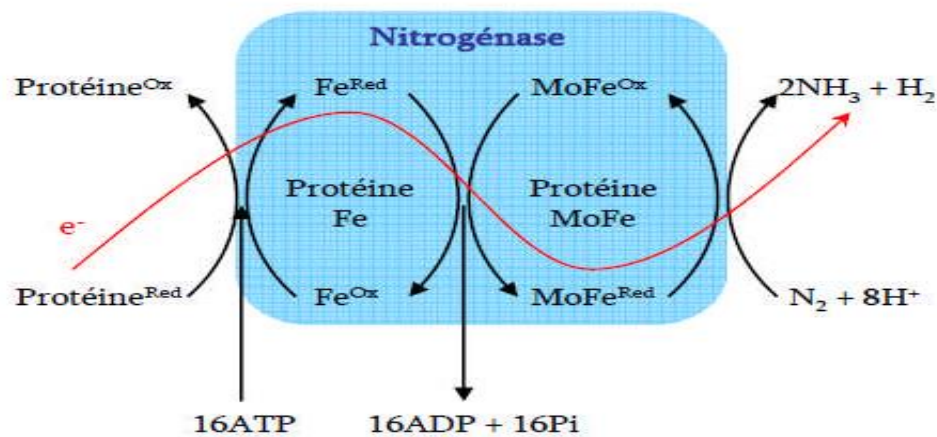
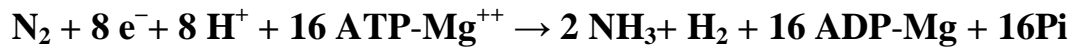


Figure 3. Mécanisme moléculaire de la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac par la Nitrogénase. (Godfroy, 2008)

4. Symbiose

La symbiose est une association de deux ou plusieurs organismes différents, qui leur permettent de vivre avec des avantages pour chacun (Broughton, 2000).

Deux types de symbioses ont été identifiés à base des fixateurs :

➤ **Endosymbiose** : peut être obtenue suite à une association des légumineuses et les fixateurs d'azote ou bien entre ces derniers et les plantes actinorhiziennes.

Cette union permet la formation d'un nouvel organe au niveau des racines (ou de la tige chez certaines espèces) appelé : « nodule », lieu de la fixation d'azote.

➤ **Ectosymbiose :** une interaction non nodulaire, représentée par les cyanobactéries et les fixateurs.

5. Symbiose *Rhizobia* – légumineuses

L'interaction *Rhizobia* –Légumineuse est bénéfique pour les deux parties en présence, car elle permet d'une part à la plante de fournir l'énergie par photosynthèse à son symbionte et d'autre part les bactéries fixent et rendent l'azote assimilable.

5.1. Macrosymbionte

Les légumineuses constituent une des familles les plus abondantes et les plus diversifiées des dicotylédones, ainsi que des plantes supérieures après les graminées, cette famille comprend des herbacées, des arbustes, des arbres ou des lianes. Elle est caractérisée par un fruit typique qu'on appelle « gousse » issu d'un ovaire supérieur formé d'un seul carpelle, qui peut contenir plusieurs graines comme le haricot (gousse multiséminée), ou seulement quelques graines comme l'arachide (gousse pauciséminée).

La diversité de cette famille lui permet d'être classé parmi les trois importants groupes des angiospermes, avec plus de 720 genres et 20000 espèces (Crok et *al.*, 2006), et présente pratiquement partout dans le monde terrestre, surtout au niveau des régions tropicales (Amérique latine, Afrique) et tempérées.

En méditerranée particulièrement, plusieurs espèces fourragères et pastorales sont représentées avec environ 3700 espèces au Maroc, 2162 en Tunisie et enfin 3139 espèces en Algérie. (Quezel et Santa, 1963).

5.1.1. La phylogénie des légumineuses

Les plantes qui appartiennent aux fabacées sont subdivisées en trois sous-familles : Mimosoideae, Césalpinoideae et les Papillionoideae (Lewis *et al.*, 2005), dont cette dernière représente la plus grande partie avec plus de 10000 espèces. Le pourcentage des familles examinées capable de noduler se répartit de la façon suivante : *Papillionoideae* (97%), *Mimosoideae* (90%) et *Cesalpinoideae* (23%) (Duhoux *et al.*, 2004).

✓ Césalpinoidées

Regroupe environ 2200 espèces, sous forme d'arbres, arbustes et des herbacées vivaces, possédant des fleurs irrégulières (zygomorphe).

✓ Mimosoidées

Occupe une position intermédiaire entre les césalpinoidées et les papillionoidées ; caractérisé par des fleurs régulières (actinomorphes) regroupées en inflorescence, elle comprend environ 2500 espèces représentées, principalement par des arbres et des arbustes.

✓ Papillionoidées

La sous famille des papillionoideae regroupe les espèces cultivées les plus importantes économiquement. Ces légumineuses cultivées sont réparties en deux grands groupes appelés Galegoides et Phaseoloides, à l'exception de l'arachide qui appartient au groupe des Aeschynomeneae (Broughton *et al.* 2003).

5.1.2. *Arachis hypogaea* L.

5.1.2.1. Origine

L'arachide est une espèce originaire de l'Amérique tropicale, plus exactement du Mato Grosso, au Brésil ; elle se rencontre actuellement dans de très nombreux pays où elle constitue parfois une spéculation majeure, comme le Sénégal et le Nigeria (Pollet, 1982).

Elle est considérée parmi les légumineuses qui posent problème au point de vue origine, où de nombreux chercheurs suggèrent que l'arachide est un hybride interspécifique stabilisé par doublement de chromosome ($2n = 40$ allotétraploïdes), qui dérive de deux parents diploïdes sauvages *Arachis monticola* qui n'ont pas été précisément déterminés.

5.1.2.2. Systématique

Le genre *Arachis* appartient à la sous famille des Papillionoideae des Fabacées ; il comprend environ 70 espèces (Krapov *et al.*, 1994).

Selon la collection mondiale, 17000 variétés de ce genre ont été maintenues ; elles appartiennent toutes à l'espèce *hypogaea* réparties dans deux sous-espèces différentes :

- *Arachis hypogaea hypogaea*
- *Arachis hypogaea fastigiata*. (Schiling *et al.* 1996).

Tableau I. Les variétés d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) les plus cultivées au monde selon Nyabyenda, 2005.

Espèce	<i>Arachis hypogaea</i> L.			
Sous espèce	<i>hypogaea</i>		<i>Fastigiata</i>	
Variété	<i>hypogaea</i>	<i>hirsuta</i>	<i>fastigiata</i>	<i>Vulgaris</i>
Type	Virginia	Peruvian et Runner	Valencia	Spanish et Natal

5.1.2.3. Morphologie de l'arachide

Arachis hypogaea L. est une plante herbacée, annuelle, érigée ou rampante peut atteindre les 70 cm de hauteur. C'est une espèce fortement enracinée qui possède une racine principale et des racines secondaires, caractérisées par l'absence des poils absorbants.

La partie aérienne est formée d'une tige qui peut être dressée ou rampante, des ramifications latérales issues du collet de la plante et des feuilles composées de deux paires de folioles elliptiques opposées au bout d'un pétiole inséré sur des ramifications alternes ou séquentielles.

La floraison débute 25 à 30 jours après le semis et se poursuit tout au long du cycle végétatif.

Les fleurs sont de couleur jaune, très petites, caractérisées par une corolle papilionacée (spécificité des légumineuses) ; elles sont frêles et flétrissent rapidement.

A titre d'information, seulement 10 à 20% des fleurs arrivent à maturité et donneront des gousses.

A l'intérieur des gousses il y a formation des graines caractérisées par une forme cylindrique à ovoïdes de 1-2 cm, à extrémité pointues ou aplaties, enfermées dans un tégument dont la couleur va du blanc au violet foncé. (**Fig. 4**)

Les graines peuvent être dormantes dans le groupe Spanish et Valencia des variétés *fastigiata* et *vulgaris* respectivement, comme elles peuvent être non-dormantes dans le groupe Virginia de la variété *hypogaea*.

La germination de ces graines nécessite une température optimale de 25-30°C.

Les graines d'arachide sont oléagineuses caractérisées par un taux important des lipides (huiles), environ 50% des constituants totaux. (**Tab. II**).

Tableau II. Composition chimique de la graine d'arachide cultivée (Bewley et Black, 1994).

Composition moyenne en %	<i>Arachis hypogaea</i> L.
Protéines	31
Lipides	48
Amidon (glucides)	12

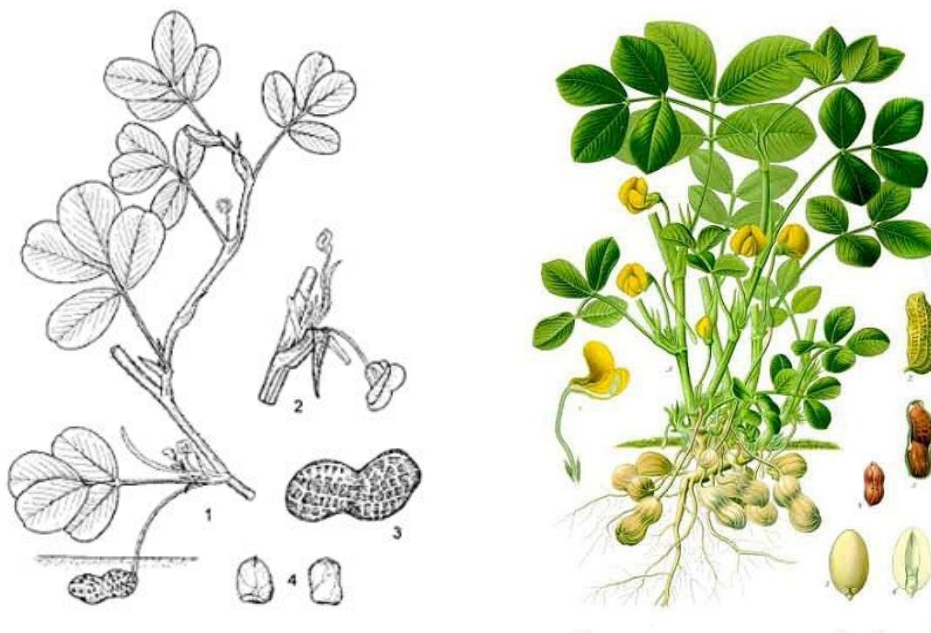


Figure 4. Morphologie générale de la plante d'arachide

1. Rameau en fleurs et en fruits, 2. L'inflorescence, 3. Fruit, 4. Graines. (Source : PROSEA).

5.2. Microsymbionte

Au sens large, les micro-organismes fixateurs d'azote atmosphérique sont ceux qui provoquent la formation des nodosités, soit sur les racines des légumineuses (*Phaseolus vulgaris*), ou bien sur les tiges de certaines espèce (*Sesbania* , *Aeschynomene et parasponia*). (Neyra *et al.*,1989).

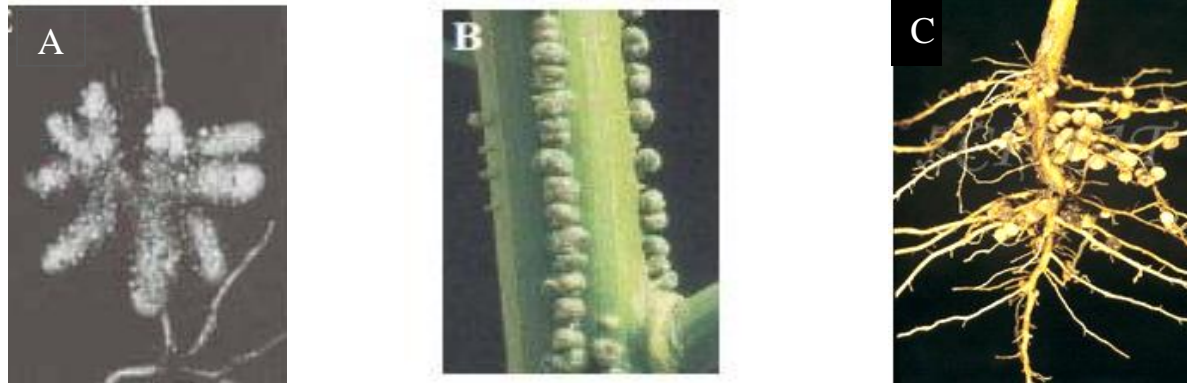


Figure 5. Photographies mettant en évidence des nodules formés au niveau des racines et des tiges par les bactéries fixatrices symbiotiques

- A. Nodules racinaires de *Parasponia rigida* (Lancelle *et al.*, 1985)
- B. Nodules caulinaires de *Sesbania rostrata* (Duhoux *et al.*, 2004)
- C. Nodules racinaires de *Phaseolus vulgaris* (Duhoux *et al.*, 2004)

5.2.1. Taxonomie

Au cours des vingt dernières années, la classification des *Rhizobia* a subi de grands remaniements.

Les bactéries symbiotiques ont été classées pour la première fois, suite à un test d'inoculation des plantes hôtes qui à révélé deux groupes bactériens :

- ✓ Le genre *Rhizobium*: renferme les espèces à croissance rapide
- ✓ Le genre *Bradyrhizobium*, représenté par les souches à croissance lente (Vincent,1970)

En 1984, Jordan est arrivé à la même classification en se basant sur des caractères phénotypiques et la vitesse de croissance des *Rhizobia*.

Quelques années après, les *Rhizobia* ont connu une nouvelles classification représentée par environ 40 espèces; avec sept genres parmi les α -*Proteobacteria* : *Allorhizobium* (de Lajudie *et al.*, 1998) , *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982 ; Kuykendall *et al.*, 1992 ; Xu *et al.*, 1995) , *Mesorhizobium* (Chen *et al.*, 1991 ; Jarvis *et al.*, 1982 ; Jarvis *et al.*, 1997 ; de Lajudie *et al.*, 1998b ; Nour *et al.*, 1994 ; Nour *et al.*, 1995 ; Wangs *et al.*, 1999), *Rhizobium* (Amarger *et al.*, 1997 ; Van Berkum *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 1997 ; Jordan, 1982 ; Lindström, 1989 ; Marinez-Romero *et al.*, 1991; Segovia *et al.*, 1993 Wangs *et al.*, 1998 Wei *et al.*, 2002) , *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988 ; de Lajudie *et al.*, 1994 ; Rome *et al.*, 1996 ; Wei *et al.*, 2002) et une espèce dans le genre *Methylobacterium* (Sy *et al.*, 2001). Actuellement, dans la relation symbiotique, d'autres genres fixateurs d'azote ont été également décrits parmi eux : *Burkholderia* et *Cupriavidus* dans la sous-classe des β -*Proteobacteria* (Moulin *et al.*, 2001).

La taxonomie moderne des bactéries fixatrices d'azote se base sur trois critères importants: la morphologie, la physiologie et l'analyse des séquences ADNr 16S, par conséquent, la nouvelle systématique a défini plus de 60 espèces regroupées en BNL (bactéries nodulants les légumineuses), avec 12 genres de l'ordre des Rhizobiales, de la sous-classe α -Protéobactéries, 3 genres de l'ordre des Burkholderiales de la sous-classe β -Proteobacteries (Zahkia et de Lajudie.,2001; Moulin *et al.*, 2001; Chen *et al.*,2001; Nogom *et al.*,2004), un genre dans l'ordre Enterobacterales de la sous-classe des γ -Proteobacteria et enfin un genre de l'ordre des Pseudomonadales de la même sous-classe (Benhizia *et al.*,2004). (**Tab.III**).

5.2.2. Caractères généraux

Les *Rhizobia* apparaissent sous forme de bâtonnets de 0.5 à 0.9 μ m de large sur 1.2 à 3.0 μ m de longueur, ce sont des bactéries à Gram négatif (membrane riche en lipopolysaccharides et pauvre en peptidoglycanes), strictement aérobies, non sporulantes (Jordan, 1984), mobiles grâce à des flagelles et présentes soit à l'état libre ou bien en association avec des légumineuses dans le sol.

La culture de ces bactéries nécessite des milieux riches en carbone, azote et sels minéraux, une température optimale (25-30°C) et un pH neutre (6 à7). (Somasegaran et Hoben, 1994).

Tableau III. Classification des bactéries nodulants les légumineuses (N'zoué *et al.*, 2006).

Classe	Genre	Espèce	Plante hôte
Alpha Proteobacteria	<i>Rhizobium</i> Jordan,1984; de Frank,1989	<i>R. leguminosarum</i>	<i>pisum sativum</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> L.
	<i>Sinorhizobium</i> Chen <i>et al.</i> , 1988	<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i>
	<i>Allorhizobium</i> de Lajudie <i>et al.</i> , 1998	<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
	<i>Mezorhizobium</i> Jarvis <i>et al.</i> , 1982	<i>M. loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i> , <i>L. tenuis</i> L. <i>japonicum</i>
	<i>Phyllobacterium</i> Valverde <i>et al.</i> , 2004	<i>Phyllobacterium</i> sp.	
	<i>Methylobacterium</i> Jourand <i>et al.</i> , 2004 ; Sy <i>et al.</i> , 2001	<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria podocarpa</i> , <i>C. Perottetti</i>
	<i>Ochrobactrum</i> Ngom <i>et al.</i> , 2004		<i>A. mangium</i>
	<i>Azorhizobium</i> Moreira <i>et al.</i> , 1999	<i>A. caulinodans</i> <i>A. johannense</i> <i>Azorhizobium</i> sp.	<i>Sesbania rostrata</i> <i>Sesbania virgata</i>
	<i>Devosia</i> Rivas <i>et al.</i> , 2002	<i>D. neptunia</i>	<i>Neptunia natans</i>
	<i>Bradyrhizobium</i> Jordan, 1984 ; Kirchner, 1896	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Blastobacter</i> Alazard <i>et al.</i> , 1985 ;Young <i>et al.</i> , 1991	<i>B. denitrifican</i>	<i>Aeschynomene</i>	
Beta Proteobacteria	<i>Burkholderia</i> Vandamme <i>et al.</i> , 2002	<i>B. caribensis</i>	<i>Mimosa pudica</i> , <i>M. diplotricha</i> .
Gamma Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> Benhizia <i>et al.</i> , 2004	<i>Pseudomonas</i> sp	<i>Hedysarum carnosum</i> ,

6. La nodulation

La mise en place de la symbiose fixatrice d'azote entre les bactéries du genre *Rhizobium* et les légumineuses est un phénomène complexe, au cours duquel la bactérie doit mener trois processus différents : la reconnaissance spécifique entre les deux partenaires, l'infection des racines et l'induction d'une organogenèse, qui conduit à la différenciation d'un nouvel organe spécialisé qu'on appelle : **nodosité** ou **nodule**.

L'interaction légumineuse – *Rhizobium* est hautement spécifique car l'espèce bactérienne n'affecte et ne nodule qu'un nombre défini d'espèces végétales, néanmoins le degré de spécificité est variable selon la souche bactérienne et la plante hôte (Debellé *et al.*, 2001).

Les différentes étapes de la nodulation sont les suivantes :

6.1. Reconnaissance

Les *Rhizobia* qui vivent à l'état libre dans le sol, sont attirés vers la rhizosphère des plantes hôtes par diverses substances qui y sont excrétées, telles que ; glucides, acide carboxylique ; acides aminés et les flavonoïdes, dont la plupart augmentent la croissance des micro-organismes.

Les bactéries reconnaissent les flavonoïdes excrétés par les légumineuses et activent l'expression des **gènes nod** structuraux impliqués dans la synthèse et la sécrétion de signaux symbiotiques bactériens extracellulaires, **les facteurs Nod**. Les facteurs Nod sont de nature lipo-oligosaccharides spécifiques à chaque espèce de *Rhizobia* (Lerouge *et al.*, 1990 ; Dénarié *et al.*, 1996 ; Gresshoff, 2003), perçus par la plante et déclenchent des modifications morphologiques au niveau des racines.

Les cellules bactériennes s'attachent donc aux poils absorbants de la plante et permettent l'adhésion, un processus hautement spécifique et irréversible qui nécessite la présence de deux molécules : la léctine, une glycoprotéine spécifique formée par la plante et les exopolysaccharides présents chez les bactéries.

6.2. Infection

Cette étape est réalisée après modification morphologique des poils absorbants et la formation d'une structure dite en « crosse de berger » qui renferme l'ensemble des *Rhizobia* piégés dans les racines de la plante hôte (Esseling *et al.*, 2003).

A l'intérieur de ces poils infectés, les *Rhizobia* se multiplient et permettent la formation d'un cordon infectieux (Duchoux *et al.*, 2004).

L'infection est achevée dès que le cordon d'infection se ramifie dans les cellules corticales et guide les bactéries vers les cellules du méristème nodulaire.

6.3. Organogénèse

L'arrivée des *Rhizobia* dans le méristème nodulaire induit une dédifférenciation et des divisions à plusieurs reprises de type anticlines et périclines des cellules corticales, formant ainsi le primordium nodulaire.

Les *Rhizobia* se libèrent du filament d'infection et pénètrent dans les cellule hôte (Raven *et al.*, 2007). Ils se développent en cellules spécialisées dans la fixation d'azote, nommées bactéroïdes (Hopkin *et al.*, 2003 ; Raven *et al.*, 2007).

Finalement, les cellules végétales infectées et les bactéries infectantes se différencient pour permettre la formation d'une nouvelle structure appelée : symbiosome, cellules capables de synthétiser la nitrogénase et permettre la réduction de l'azote moléculaire.

Les symbiosomes sont formés d'une membrane pér bactéroidale issue des cellules corticales et de bactéroïdes qui dérivent de la différenciation des *Rhizobia*

La prolifération des bactéroïdes enfermés dans leur membrane et les cellules corticales de la racine produisent des excroissances tumorales appelées nodules ou nodosité (Davet, 1996 ; Raven *et al.*, 2007).

Le nombre de nodules et leur masse sont contrôlés par la plante en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique (Duhoux, 2004).

7. La nodulation de l'arachide (*Arachis hypogaea* L.)

Dans le cas de l'arachide, l'étape d'infection présente une différence par rapport aux autres légumineuses.

L'infection est assurée par des fissures réalisées aux points d'émergences des racines par les bactéries fixatrices d'azote (généralement les genres *Bradyrhizobium* et *Rhizobium*). Les cellules infectées élaborent une sorte de conduit revêtu de cellulose, **le cordon d'infection**, dans lequel s'engagent les bactéries, dont la présence provoque la dédifférenciation de certaines cellules corticales.

Le cordon d'infection traverse les parois cellulaires et se ramifie dans les nouvelles cellules formées.

Les *Rhizobia* sont libérés à l'intérieur des cellules, mais restent isolées du cytoplasme par une membrane formée par la plante (l'arachide).

Leur forme s'est modifiée et le complexe enzymatique fixateurs d'azote est activé : ils sont devenus des bactéroïdes.

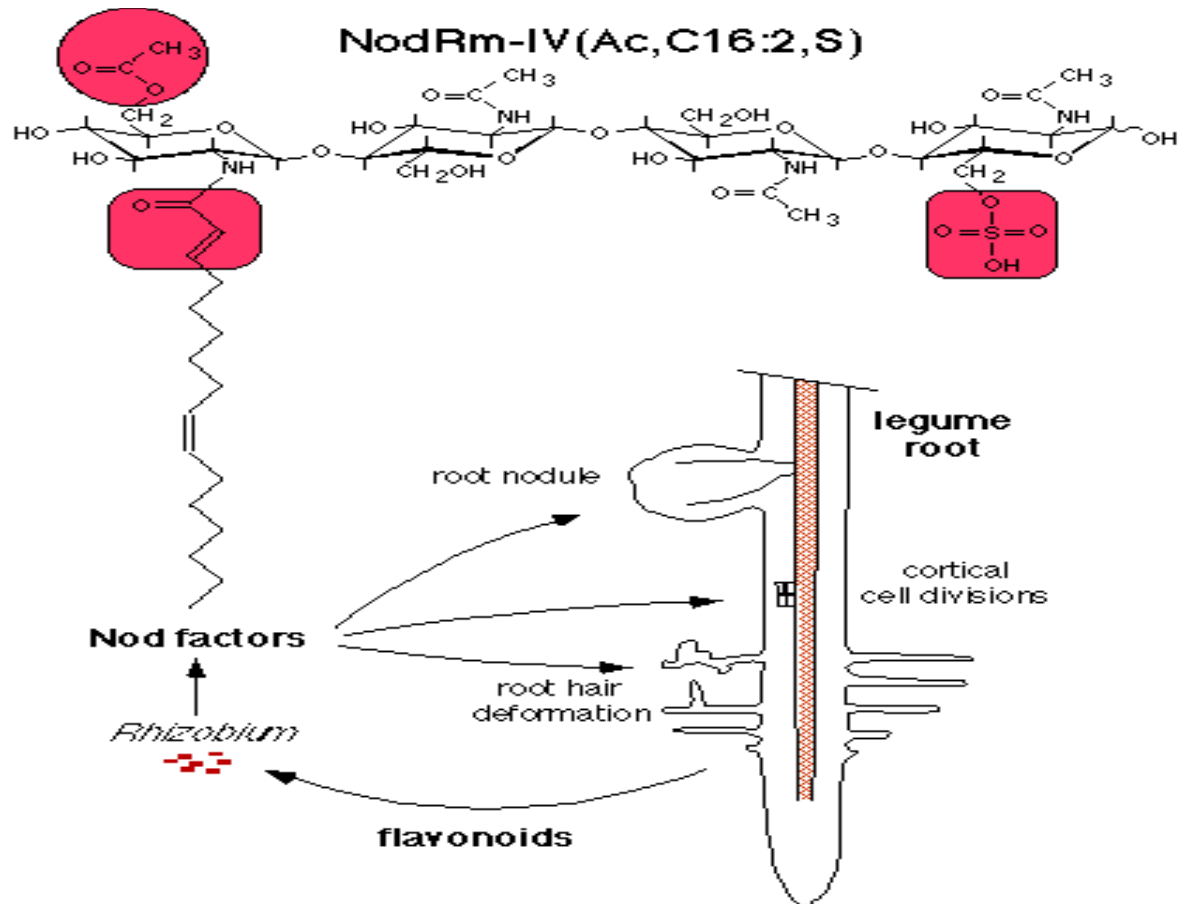


Figure 6. Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques impliquant les facteurs Nod. (Deléglise, 2001)

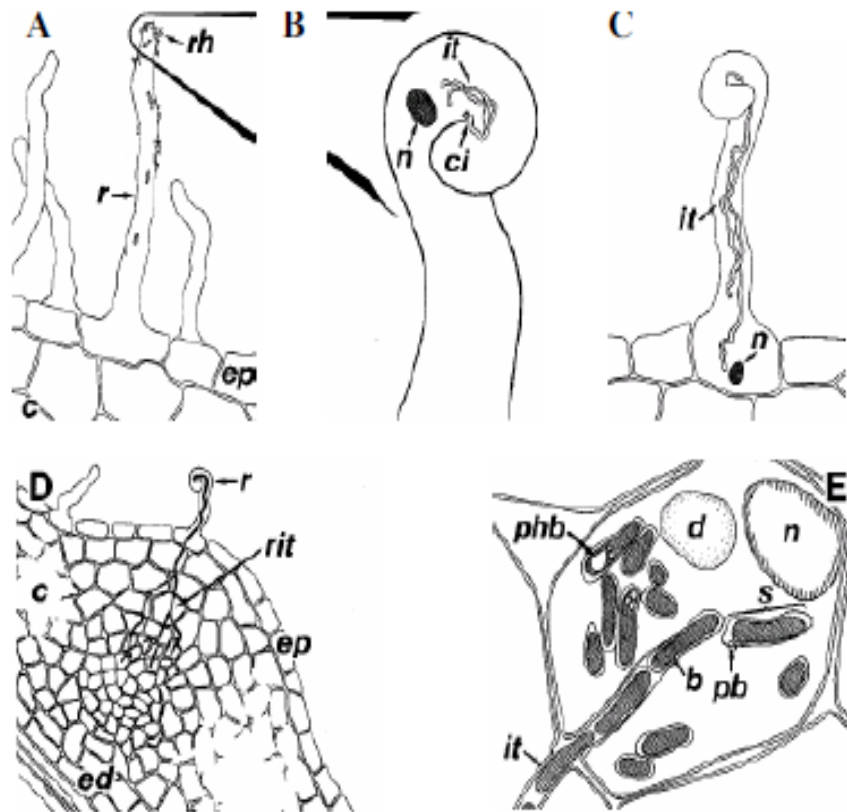


Figure 7. Etapes du processus de nodulation lors de la symbiose Légumineuse-Rhizobium (Perret *et al.*, 2000).

- A.** Les *Rhizobia* (rh) colonisent la rhizosphère et s'attachent aux poils absorbants (r).
- B.** Les bactéries induisent la déformation du poil et initient un cordon d'infection (it)
- C.** Le cordon s'allonge et atteint la base de la cellule épidermique.
- D.** Le cordon se ramifie (rit) à l'approche du primordium nodulaire, formé suite a la division des cellules du cortex (c).
- E.** Les bactéries sont relâchées dans les cellules du nodule et forment des symbiosomes, où elles se différencient en bactéroïdes fixateurs.

8. Structure et fonctionnement des nodules

8.1. Structure

L'infection par les cordons d'infection a lieu à partir de la base du nodule, ce qui établit un gradient de différenciation et plusieurs zones ont pu être définies (Vasse *et al.*, 1990).

- La zone I ou zone méristématique correspond à l'apex du nodule et contient des cellules dépourvues de bactéries.
- La zone II ou zone de préfixation contient les cellules corticales nouvellement produites par le méristème qui sont envahies par des cordons d'infection rhizobiens. Les bactéries sont déversées dans les cellules, entourées par la membrane pér bactéroidienne (MPB) et leur différenciation en bactéroïde commence. À ce stade, elles ne fixent pas encore l'azote.
- Dans l'interzone II-III, la différenciation des bactéroïdes se poursuit et la fixation de l'azote commence. Cette zone se caractérise par la présence de nombreux amyloplast.
- La zone III ou zone de fixation est celle où les bactéroïdes pleinement différenciés fixent activement l'azote.
- Dans des nodules âgés, la zone IV correspond à une zone de sénescence. (Pawlowski et Bisseling, 1996).

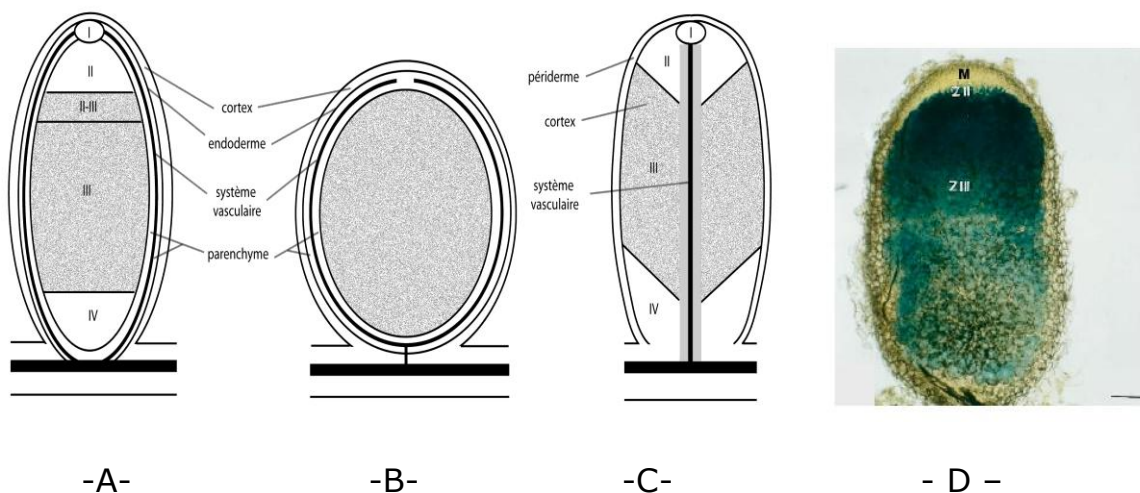


Figure 8. Structure des nodules de légumineuses et des plantes actinorhiziennes. (Pawlowski et Bisseling, 1996).

A. Nodule de Légumineuse de type indéterminé.

B. Nodule de Légumineuse de type déterminé.

C. Lobe nodulaire actinorhizien.

I. Zone méristématique ; **II** : zone d'infection ; **II-III** : interzone; **IV** : zone de sénescence.

D. Structure cellulaire d'un nodule de type indéterminé (Tirichine *et al.*, 2000)

8.2. Fonctionnement des nodules

Chez la légumineuse nodulée, la capacité de fixer l'azote dépend largement de trois facteurs : l'apport direct de photosynthétats aux bactéroïdes, le maintien de faibles concentrations d'O₂ à l'intérieur du nodule pour protéger la nitrogénase, et l'exportation rapide de l'azote fixé. A certains stades du développement, le nodule peut consommer jusqu'à 50% des photosynthétats produits par la plante. Le contrôle de la concentration en oxygène est principalement dépendant de l'action d'une leghémoglobine produite lors de la symbiose. L'ammonium produit dans les bactéroïdes est libéré dans le cytoplasme de la plante, par simple diffusion à travers des membranes pér bactéroides. Dans le cytoplasme végétal, le NH₃ est assimilé via la voie métabolique glutamine synthase (GS)/glutamate synthase (GOGAT) (Marschner, 1995).

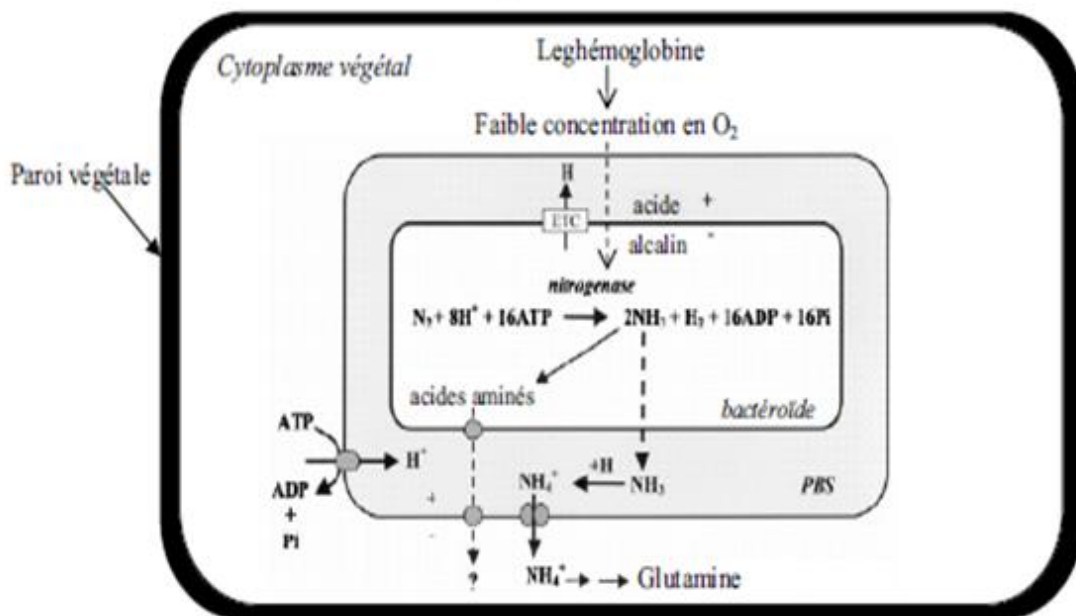


Figure 9. Fixation de l'azote et transport de l'ammonium dans le symbiosome.

(Day *et al.*, 2001)

9. Les herbicides

Les herbicides constituent un des moyens de lutte, le plus efficace contre les maladies majeures des plantes cultivées, et qui sont nécessaires pour l'augmentation des rendements agricoles.

En Algérie, l'usage des herbicides ne cesse de se multiplier dans de nombreux domaines et en grandes quantités. Pour cette raison, environ 400 produits phytosanitaires homologués dont une quarantaine de variétés sont largement utilisées par les agriculteurs (Bouziani, 2007).

Cependant, la plupart de ces molécules sont hautement toxiques et difficilement biodégradables. Leur utilisation massive et répétée peut engendrer des conséquences néfastes pour toutes les composantes de l'environnement.

9.1. Définition

Par définition on appelle herbicide toute substance active qui provoque un effet permettant de réduire la vigueur des espèces végétales que l'on souhaite contrôler ou détruire. L'efficacité de l'herbicide est l'une des propriétés importantes, où certains herbicides ont un effet limité sur quelques espèces, mais, d'autres agissent sur de nombreux végétaux, en fonction de la dose d'emploi, du stade phénologique, du mode d'application et des conditions climatiques, d'où certains risques de phytotoxicité indésirables. Par ailleurs, la sélectivité est une autre propriété des phytocides qui n'a aucun effet défavorable sur la plante cultivée.

Le produit herbicide qui correspond au nom commercial, ou bien désherbant notamment en horticulture, constitue une vaste classe des pesticides (représentent plus de 70% de la production des pesticides) à usage agricole dans la catégorie des produits phytopharmaceutiques ; il s'agit d'une molécule caractérisée par des structures et des compositions chimiques très diverses et complexes.

9.2. Classification des herbicides

Les herbicides sont classés en fonction de leur voie de pénétration ou bien par leur mode d'action.

9. 2.1. Classification par voie de pénétration

La diversité des herbicides permet de les subdiviser en deux grands groupes :

- **Les desherbants de contact** : présentent une diffusion faible ou extrêmement limitée à l'intérieur du végétal, ils agissent au point d'impact du produit sur la plante et détruisent les premières couches de cellules.
- **Les desherbants systémiques** : sont plus complexes, assimilés par les racines et les feuilles, ils sont transportés par la sève dans les vaisseaux.

Ces herbicides ont une action en profondeur dans le végétal, ils agissent sur des sites éloignés du point de pénétration. (Gama *et al.*, 2006)

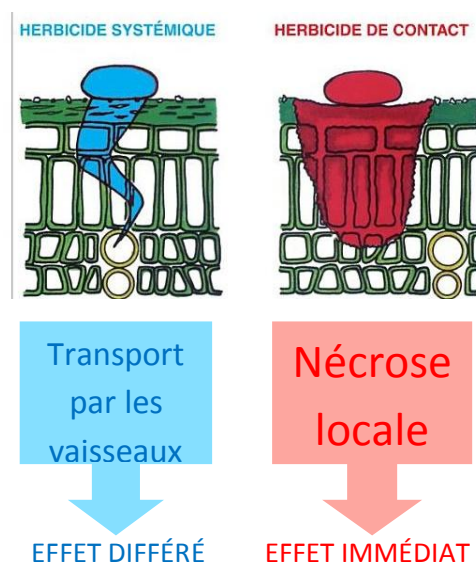


Figure10. Comportement de l'herbicide dans la plante. (Gama *et al.*, 2006)

9.2.2. Classification des herbicides en fonction de leur mode d'action

Chaque famille d'herbicide a un mode d'action spécifique qui dépend du type de pénétration dans le végétal, son déplacement vers son site d'action, son interaction avec sa cible biochimique (modification ou perturbation des processus métaboliques) et ses conséquences physiologiques (limiter et bloquer la croissance et le développement des adventices).

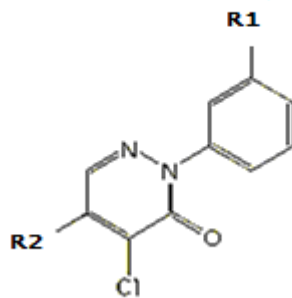
Tableau IV. Classification des herbicides selon leurs mode d'action. (Gama *et al.*, 2006)

Herbicides		
	Mode d'action	Familles chimiques
Herbicides inhibiteurs de la photosynthèse	Herbicides agissant par blocage de la protéine D1 du photosystème II	Amides Benzothiadiazone Carbamates Pyridazinone Hydroxybenzonnitriles 1, 3,5- triazines Urées substituées.
	Inhibiteurs de la photosynthèse par détournement d'électrons à la sortie du photosystème I	
Herbicides inhibiteurs de la synthèse des lipides	Inhibition de l'enzyme ACCase	Acides arylphénoxy-propioniques Cyclohexanediones oximes
	Inhibition des elongases (enzymes conduisant aux acides gras plus de 18 C, précurseur des cires et de la subérine)	Acides organiques halogénés benzofuranes
	Inhibition des elongases et des enzymes conduisant aux gibbérellines	Acétamides chloroacétanitriles Oxyacétamides Thiocarbamates
Herbicides inhibiteurs de la synthèse des acides aminés	Inhibition de l'enzyme conduisant à la synthèse de la glutamine	Aminophosphonates Acides phosphiniques
	Inhibition de l'enzyme conduisant à la synthèse des acides aminés aromatiques	Amino-phosphanates (organophosphorés) Glycine Glyphosate
	Inhibition de l'enzyme conduisant à la synthèse des acides aminés ramifiés	Imidazolinones Sulfonylurées Triazolopyrimidines
Herbicides perturbant la régulation de l'auxine AIA	Herbicides auxiniques	Acides phénoxy-alcanoïques Acides benzoïques Acides pyrimidiques Acides quinoléine-carboxyliques
Herbicides inhibiteurs de la division cellulaire à la métaphase	Herbicides bloquant la formation des microtubules du fuseau achromatiques par absence de la formation de la tubuline	Benzamides 2,6- dinitroanilines
	Herbicides bloquant les MTOC et désorganisant le fuseau achromatique	Carbamates
	Herbicides inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique et bloquant les MTOC	Carbamates
Herbicides inhibiteurs de l'enzyme conduisant à la synthèse des chlorophylles	Herbicides inhibiteurs des pigments chloroplastiques	Diphényl- éthers N- phénylphtalimides Oxadiazoles Triazolinones
Herbicides perturbant la croissance	Inhibiteurs du transport auxinique et inversion du géotropisme	Acides phtaliques
	Inhibiteurs de la synthèse de la cellulose de la paroi pecto-cellulosique	Acide quinoléine Carboxyliques benzonnitriles

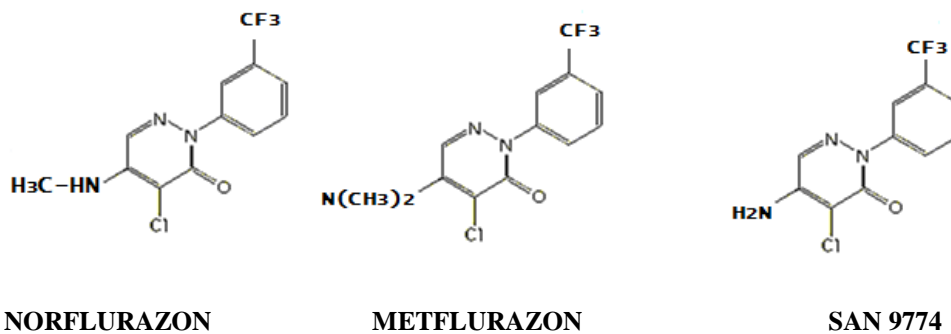
9.3. Les Pyridazinones

C'est une famille qui regroupe un nombre importants d'herbicides qui affectent plusieurs fonctions du métabolisme cellulaire. Parmi ces herbicides nous citons : le norflurazon, le pyrazon, le SAN 9774 et le metflurazon.

La figure suivante représente quelques herbicides de la famille des pyridazinones :



Formule générale des pyridazinones



NORFLURAZON

METFLURAZON

SAN 9774

Figure 11. Structure de quelques herbicides de la famille des pyridazinone.

L'influence des dérivés de pyridazinones sur le métabolisme cellulaire est due à la phytotoxicité de cette famille qui dépend essentiellement du degré de méthylation de la fonction amine et aussi de la présence et de l'absence du groupe trifluorométhyle sur le noyau aromatique (Scallia, 1991).

Les principaux modes d'action sont :

- ✓ Une activité photosynthétique réduite à cause d'une photodestruction des ribosomes chloroplastiques (Bartels et Hydes, 1970), de l'altération de la structure des chloroplastes (Davis et Harwood, 1983) et l'inhibition de la réaction Hill.
- ✓ Perturbation et modification du métabolisme lipidique. (St John, 1976 ; Norman et St John, 1987 ; Abrous *et al.*, 1998)
- ✓ Perturbation dans la synthèse des hormones de croissance, comme l'acide abscissique et la chélation de certains cations indispensable au métabolisme cellulaire (le cas du Mg^{2+})

9.4. Les Triazines

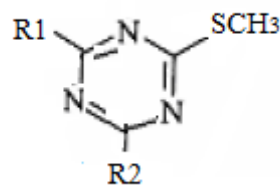
Constituent actuellement la famille la plus importante, avec environ 20 herbicides répartis en deux groupes. Le premier renferme les dérivés de triazine symétrique qui sont :

Les chloro-diamino-S-triazine (simazine, atrazine ou propazine)

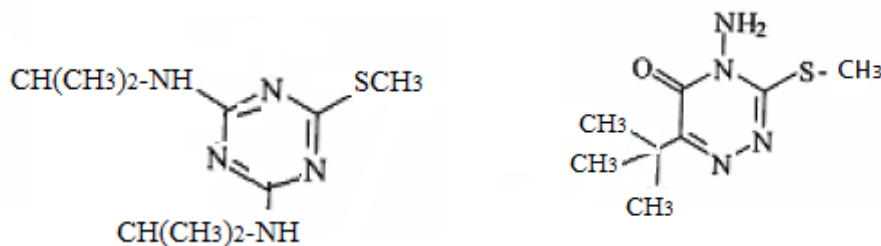
Les methoxy-diamino-S-triazine (terbuméton, siméton et prométon)

Les methlthio-diamino-S- triazine (prométryne, simétryne ou amétryne)

Le deuxième groupe est formé des triazines non symétrique (métribuzine). (Tissut et Severin, 1984)



Formule générale des triazines



PROMETRYNE

METRIBUZINE

Figure12. Structure de quelques herbicides de la famille des triazines

Les triazines pénètrent essentiellement par les racines et exercent leur action au niveau des feuilles en bloquant la photosynthèse après un transport par la sève brute (Pelletier, 1992 et Majumdar *et al.*, 2007)

Les principaux modes d'action de ces herbicides sont :

- ✓ Les triazines inhibiteurs du PS II agissent en s'incorporant au système de transfert d'électrons situé dans la membrane des thylakoïdes. Ils se comportent comme de véritables barrages du courant d'électrons au niveau de la plastoquinone (Tissut et Severin, 1984).
- ✓ Ils agissent après une compétition avec la plastoquinone pour un site d'affinité localisé sur la protéine D1 connue par la quinone B (Qb), bloquant ainsi le transfert des électrons, et empêchent la réoxydation de la quinone A (Qa). (Heller, 1995).
- ✓ L'énergie lumineuse reçue par la chlorophylle n'est plus convertie en énergie électrochimique, ce qui entraîne avec le temps l'arrêt du dégagement d'oxygène et de la fixation du CO₂. (Ducruet, 1991)
- ✓ Une réduction dans la synthèse des pigments photosynthétiques (surtout les caroténoïdes) favorisent une production importante de l'oxygène singulet à partir de la chlorophylle excitée. (Tissut et Severin, 1984).

9.5. Devenir des herbicides dans le sol

L'utilisation des herbicides dans l'agriculture ne comporte pas uniquement des effets bénéfiques, mais également des conséquences néfastes pour l'environnement et pour la santé humaine. En effet, suite à leur épandage sur les sols agricoles, une partie des herbicides rejoint soit l'atmosphère par volatilisation, soit les eaux de surface par ruissellement. Mais pour la plus grande partie d'entre eux, ces produits vont séjourner au sein des sols où ils peuvent être dégradés en de petits composés, en dioxyde de carbone et en eau à travers des réactions photochimiques, chimiques et biologiques (Perrin *et al.*, 1997).

Les produits de dégradation sont appelés métabolites, caractérisés par des propriétés chimiques spécifiques : la toxicité, la capacité d'adsorption et la résistance à la dégradation. Dans certains cas, les métabolites peuvent être plus toxiques et/ou persistants que l'herbicide lui-même.

Tous les sols n'ont pas la même capacité de dégradation. Ce potentiel est en fonction de la composition physico-chimique du sol et de la composition de la microflore présente (Coulibaly, 2005).

Certaines conditions telles qu'un pH acide ou de basses températures sont de nature à augmenter la persistance des herbicides dans le sol. Par conséquent, pour connaître la persistance d'un produit dans le sol, il faut connaître la vitesse avec laquelle ce produit se dégrade « demi-vie de l'herbicide » (Fdil, 2004).

9.6. Type de dégradation

Dès leur application, les produits phytosanitaires subissent des processus biotiques et abiotiques qui amènent à leur dégradation plus ou moins complète (Colin, 2000).

a) Dégradation abiotique : elle se divise en dégradation chimique et photolyse.

- **Dégradation chimique** : est une décomposition conduite par des réactions chimiques qui sont l'hydrolyse, l'oxydation et la réduction.
- **Photodégradation** : est un processus physique qui aboutit à une photodécomposition par les rayonnements ultraviolets, la plupart des molécules phytosanitaires ayant un maximum d'absorption compris entre 200 et 400 nm (Colin, 2000).

b) Dégradation biologique

- **Dégradation microbiologique**

Dans le sol les micro-organismes occupent un faible volume (moins de 0.1%), mais cela ne les a pas empêché d'être les responsables sur plusieurs transformations dans la nature (Fdil, 2004), parmi ces transformations nous citons la dégradation microbiologique.

Cette dégradation est liée à l'activité enzymatique des micro-organismes dans le sol, ainsi qu'à la population microbienne, car elles ont la capacité de consommer l'herbicide. (Ertli *et al.*, 2004).

La décomposition des herbicides fait intervenir les mêmes réactions chimiques que la dégradation abiotique, et par conséquent il s'agit de l'élimination complète de la molécule avec comme seuls rejets des produits simples tels que H₂O, CO₂, CH₄, etc.

La flore microbienne utilise ces produits organiques comme source de carbone (Coulibaly, 2005).

L'oxygène dissous dans l'eau contenue dans le sol est utilisé par les bactéries comme accepteur final d'électrons, permettant ainsi leur métabolisme en milieu aérobie.

La température et l'humidité sont également des facteurs importants de l'activité microbienne et par conséquent de la dégradation des herbicides. Celle-ci augmente avec la température dans une gamme de 0 à 30°C, et une humidité de 85 à 100 % (Coulibaly, 2005 et Ertli *et al.*, 2004).

9.7. Devenir des herbicides dans la plante

La capacité qu'ont certaines plantes à supporter la présence des herbicides provient de l'existence d'un complexe enzymatique susceptible de dégrader ou transformer ces derniers. Cette biotransformation consiste à produire des métabolites plus solubles que la molécule initiale et donc facilitant leur élimination et leur ségrégation dans les vacuoles.

Les mécanismes d'action enzymatiques responsables de la biotransformation des herbicides peuvent être classiquement divisés en trois phases (Sandermann, 1977, 1992 ; Coleman *et al.*, 1997).

- **Phase I** : elle correspond à une série de réactions d'oxydation (les monooxygénases à cytochrome P450), de réduction et d'hydrolyse (les estérases) (Werck-Reichhart, 2000 ; Siminszky, 2006), qui permettent l'introduction ou la libération de fonctions chimiques polaires sur l'herbicide, favorisant ainsi l'activation et l'action des enzymes de phase II.

- **Phase II** ou de conjugaison sont des réactions d'addition d'une molécule endogène hydrosoluble sur l'herbicide ou l'un de ses métabolites primaires. Ces réactions font intervenir des enzymes spécifiques du substrat endogène à conjuguer, comme la glutathion S-transférase qui conjugue le glutathion (tripeptide) et les glyco-transférases qui conjuguent des sucres (glucose) (Pflugmacher *et al.*, 2000 ; Edwards et Dixon, 2005 ; Öztetik, 2008).

- **Phase III** correspond à l'élimination, hors du corps, des produits de la phase II stockés au niveau des vacuoles cellulaires par une procédure d'excrétion en phase aqueuse, en parallèle avec l'évacuation des produits de dégradation des constituants cellulaire. Les végétaux ne possèdent pas de fonction excrétoire équivalente à celle des animaux ni un milieu interne circulant équivalent au sang.

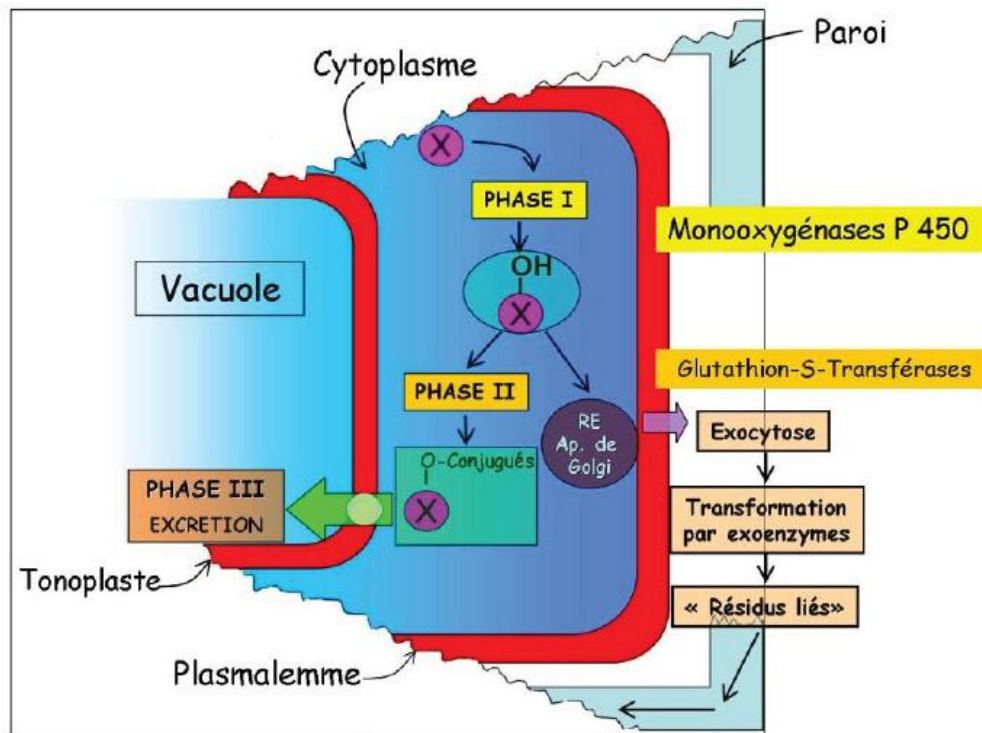


Figure 13. Phases de métabolisation des herbicides dans les cellules de la plante (Özgur, 2010)

Matériels
et
méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Pour mieux connaître le phénomène de la nodulation (symbiose) de l'arachide et comment réagit cette espèce vis-à-vis des herbicides, nous avons utilisé dans nos expériences une variété locale et commerciale de la région d'El Oued (sud algérien), qui représente l'une des wilayas productrices d'arachide en Algérie.



A : Gousses



B : Graines

Figure 14. Aspect morphologique des gousses et des graines d'arachide (*Arachis hypogaea* L.)

Tableau V. Caractéristiques morphologiques de l'arachide (*Arachis hypogaea* L.).

	Caractéristique
Graine	grosse
Port	érigé
Ramification	alterne
Couleur de feuillage	vert foncé
Fleur sur la tige principale	non
Nombre de cavité par gousse	2
Cycle végétatif	90 jours

1.2. Le sol

Le sol argilo-limoneux de la station de l'ITGC de Oued Smar est celui que nous avons utilisé dans tous les tests en pots.

Le sol est stérilisé à l'autoclave pendant 20 minutes à une température de 120°C. Cette opération a été réalisée pour réduire de manière importante la charge microbienne du sol et pour permettre une plus grande efficacité de l'inoculation.

Tableau VI. Principales caractéristiques du sol (ITGC de Oued Smar)

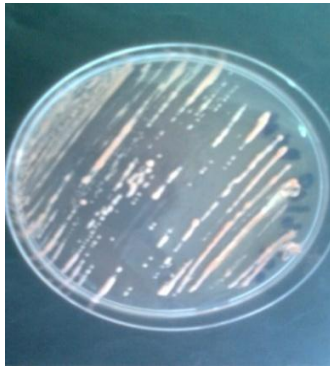
Caractéristiques	
Texture	Argileuse
Structure	massive polyédrique
pH (eau)	7.7
Carbone	0.9
Matière organique	1.5
Azote total	0.05
Rapport C/N	18

1.3. Matériel biologique

Les deux souches bactériennes utilisées dans le cadre de ce travail nous ont été fournies gracieusement par Mme Djebara M. (Membre de l'équipe de Biologie des sols). Elles ont été isolées à partir des nodules d'une légumineuse (*Arachis hypogaea* L.) de la région de « El Taref ».

- **Aspect morphologique des souches bactériennes**

Les deux souches bactériennes présentent des colonies, circulaires, légèrement élevées, lisses, opaques avec une texture blanchâtre pour la bactérie Br12, alors que la souche R30 présente un aspect transparent.



Bradyrhizobium sp (Br12)



Rhizobium sp (R30)

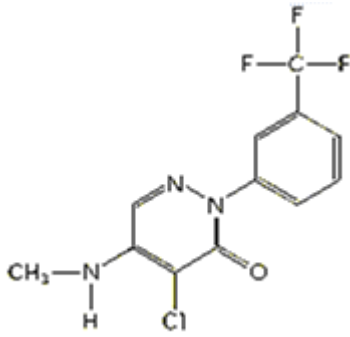
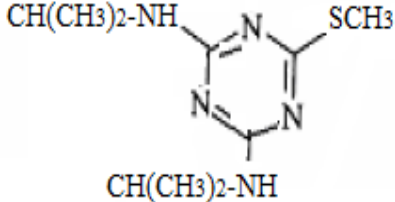
Figure 15. Photographies des colonies des deux souches bactériennes (Br12 et R30) sur milieu de production (YEMA), après 5 jours d'incubation à 30°C.

1.4. Les Herbicides

La contamination des sols par des herbicides est très répandue et représente la préoccupation majeure, qui à certaines concentrations, devient néfaste pour les végétaux, les animaux et les micro-organismes. Plusieurs méthodes ont prouvé avec le temps que certains herbicides, peuvent influencer la croissance et la physiologie des micro-organismes. De même ces herbicides peuvent affecter de manière significative la nodulation des légumineuses ainsi que le processus de fixation d'azote atmosphérique.

Nous avons utilisé deux herbicides : le norflurazon et la prométryne qui appartiennent à deux groupes d'herbicides distincts. Ceux-ci ont été utilisés pour tester leur effet à différentes concentrations sur une variété locale d'arachide.

Tableau VII. Principales caractéristiques des herbicides (norflurazon et prométryne).

Caractéristiques	Norflurazon	Prométryne
Nom chimique	4-chloro-5-(methylamino)-2-[3-(trifluorométhyl)phényl]-3(2H)-pyridazinone	2,4-bis(isopropylamino)-6-(méthylthio)-s-triazine
Nom commercial	Zorial / San 9789	Gesagard 480SC
Famille	pyridazinone	Triazine
Formule chimique	C ₁₂ H ₉ C ₁ F ₃ N ₃ O	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S
Structure chimique		
formulation	Poudre de couleur beige	Liquide blanc ressemblant à la peinture
Poids moléculaire	303.7g/mole	241.37g/mole
Demi-vie	environ 4 mois	de 1 à 3 mois
Solubilité dans l'eau	34mg/l à 20°C	48mg/l à 20°C
Utilisation principales	Poacées, Fabacées et les harbres fruitiers	légumineuses, céleri et poireaux

Ces herbicides ont été préparés aux concentrations suivantes : 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M.

1.5. Milieux de culture

Dans toutes les expérimentations, plusieurs milieux de culture ont été préparés:

- Un milieu pour la culture des plantes
 - Milieu de KNOP
- Milieux pour la culture des bactéries
 - Milieu liquide : TSB (Trypton soja broth)
 - Milieux solides: YEMA (yeast extract mannitol agar)
TSA (trypton soja agar)

2. Méthodes

2.1. Mise en culture de l'arachide (*A. hypogaea* L.)

2.1.1. Sélection et stérilisation des semences

Avant la mise en germination des semences, une sélection des graines à été réalisée de telle sorte à mettre en évidence des graines propres, non endommagées et qui appartiennent au même intervalle à la même classe de poids ($1.5g \leq P \leq 2g$) pour réduire la variabilité lors des expériences.

Les graines d'*Arachis hypogaea* L. correspondant à la lignée locale d'El Oued, sont immergées pendant 30 secondes dans de l'éthanol à 95%, ensuite pendant une minute dans de l'hypochlorite de sodium à 2% et enfin rincées 10 fois avec de l'eau distillée stérile.

2.1.2. Germination des graines

Les graines imbibées dans de l'eau distillée stérile et tiède pendant 3 à 4 heures, sont mises dans une chambre de culture à l'obscurité et à une température de 28 à 30°C pendant 4 à 5 jours sur un milieu de culture TSA, afin de mettre en évidence d'éventuels contaminants microbiens.



Avant germination



Après germination

Figure 16. Photographies des graines d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) avant et après germination.

2.2. Tests physiologiques

Ils consistent à déterminer l'action des herbicides sur les deux partenaires (bactéries et plante). C'est ainsi que nous avons testé le comportement de l'arachide et des *Rhizobia* vis-à-vis de deux herbicides (le norflurazon et la prométryne) séparément et à différentes concentrations.

2.2.1. Effet des herbicides sur la plante

Pour étudier la capacité des plantules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) à tolérer le Norflurazon et la Prométryne, nous avons mis en présence des germinations des teneurs variables en herbicide (10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M) dans des pots (2 plantules/pot) contenant le sol de l'ITGC (Oued Smar) ; ces plantules sont suivies durant 5 semaines.

2.2.2. Effet des herbicides sur les bactéries

Sur une boîte de Petri contenant un milieu de culture solide (TSA), un puits central est réalisé dans la gélose qui reçoit 1ml d'herbicide (Norflurazon ou prométryne). Ces boîtes de Petri sont ensuiteensemencées avec chacune des 2 souches bactériennes sélectionnées (séparément), puis incubées à 28°C. Des observations sont effectuées tous les jours pendant 6 jours.

2.3. Analyse morphologique

- *Mesure biométriques des plantules*

La croissance des plantes est déterminée par mesures répétées des longueurs moyennes des racines principales et de la tige.

De plus diverses observations sont faites telles que :

Pour les racines : la couleur, les ramifications et leurs aspect

Pour les feuilles : leur nombre, leur surface et leur état (jaunissement, blanchissement ou nécrose).

Pour la tige : les entre-nœuds.

- **Détermination des poids sec.**

Après 5 semaines de culture, les plantules d'arachide sont prélevées et les racines sont séparées des tiges et des feuilles constituant ainsi 3 échantillons par plante (racines, tiges et feuilles pour chaque traitement).

Les poids secs des différents échantillons sont déterminés après séchage à l'étuve jusqu'à obtention d'un poids constant (60°C pendant 48h).

- **Taux d'inhibition.**

Afin, d'estimer l'effet des herbicides sur la croissance des plantules d'arachide, nous avons calculé le pourcentage de l'inhibition à partir de l'équation suivante :

$$I\% = \frac{L_0 - L}{L_0} \times 100$$

I% : Pourcentage d'inhibition

L₀ : Longueur de la plante cultivée dans un sol sans herbicide

L : Longueur de la plante traitée

2.4. Extraction et dosage des pigments

Dosage

La matière végétale fraîche (feuilles) est prélevée, pesée puis broyée dans un premier temps à sec dans un mortier, puis dans 10 ml d'acétone (80%).

La solution obtenue est centrifugée à 4500trs/min pendant 10 min.

Le surnageant est récupéré puis utilisé dans la quantification de la chlorophylle a, b et les caroténoïdes pour les longueurs d'ondes spécifiques et respectives de : 470 - 647 et 663nm.

2.5. Indice de tolérance pour les plantules mises en culture hydroponique

Un indice dit de « tolérance », est calculé à partir de la longueur des racines, il permet de comparer la capacité des plantes à pousser dans un milieu de culture liquide additionné dans notre cas de chacun des deux herbicides (le norflurazon ou la prométryne), par rapport aux plantes poussant dans un milieu non traité.

La formule de cet indice est la suivante :

$$IT (\%) = \frac{T}{T_0} \times 100. \text{ (Wilkins, 1957)}$$

IT : Indice de tolérance

T : Taille moyenne des racines des plantes traitées

T₀ : Taille moyenne des racines des plantes témoins

2.6. Test de nodulation

Le but de ce test est d'évaluer l'aptitude des souches bactériennes à former des nodules avec la plante hôte dans des conditions bactériologiques contrôlées, en absence et présence des deux herbicides (norflurazon et Prométryne).

2.6.1. Préparation de l'inoculum bactérien

La biomasse bactérienne des deux souches (*Bradyrhizobium* : Br 12 ou *Rhizobium* : R30) est produite sur milieu de prolifération liquide (TSB), sous agitation et incubation à 28°C, pendant 48 heures.

Le bouillon de culture est ensuite centrifugé à 6000 trs/min, à 4°C pendant 20 minutes. Le culot est ensuite récupéré et rincé trois fois avec de l'eau physiologique stérile (solution de Na Cl à 0.9%). La densité bactérienne est enfin uniformisée par calibration à une densité optique de 0.3 ($\lambda = 680$) par ajout d'eau physiologique stérile. Cette solution bactérienne

servira comme inoculum dans le cas des expérimentations menées en culture hydroponique ou en pots.

2.6.2. Inoculation des plantes en pots et en culture hydroponique

- *Inoculation des plantules en pots*

Après germinations, les graines d'arachide sont transférées dans des pots (140g de sol ITGC/pot) et inoculées avec 2ml de la solution bactérienne, ce qui correspond approximativement à 10^6 bactéries. Le dispositif expérimental est mis dans une chambre de culture durant 5 semaines de végétation dans les conditions suivantes :

- Température ambiante (environ 30°C jour et 20°C nuit)
- Eclairage 5000 lux
- Photopériode (16heures jours/8 heures nuit)



Figure 17. Dispositif expérimental pour la culture de l'arachide en pots.

- *Inoculation des plantules d'arachide en culture hydroponique stérile*

Après germination des graines, chacune des germinations est transférée dans un tube (de 2 cm de diamètre et 18cm de long) contenant des billes en verre et 15 ml du milieu Knop.

Les germinations sont inoculées avec 2ml de la suspension bactérienne (10^6 bactéries).

Les tubes sont ensuite recouverts d'un papier opaque et mis dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment.



Figure 18. Dispositif expérimental de culture de l'arachide en condition hydroponique.

2.6.3. Action des herbicides sur la symbiose (*Rhizobium- Arachis hypogaea* L.)

Afin d'estimer l'effet des herbicides sur la symbiose, trois concentrations sont utilisées : 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M

Les dispositifs préparés précédemment, sont ensuite arrosés avec 20ml d'herbicide (norflurazon ou bien prométryne) pour les cultures en pots et 2 ml pour les plantules en culture hydroponique.

La croissance des plantes est déterminée par analyse morphologique, alors que le taux de nodulation est calculé par le nombre de nodule par plant.

7. Traitement statistique et analyse des données

Les mesures des paramètres de croissance (poids et la taille) des plantules d'arachide ont été relevées et traitées à l'aide des logiciels excel et statistica pour l'analyse de variance et la comparaison des moyennes avec un niveau au seuil de 5%.

Chaque test est répété au moins deux fois pour une meilleure appréciation des résultats.

Résultats et discussion

1. Effet des herbicides (norflurazon, prométryne) sur la croissance de deux souches bactériennes (R30, Br12)

1.1. Croissance des souches bactériennes (R30, Br12) en absence des herbicides (norflurazon et prométryne)

La culture de deux souches bactériennes sur un milieu, à permis d'obtenir des colonies, circulaires, légèrement élevées, lisses, opaques avec une texture blanchâtre pour la bactérie Br12 et un aspect transparent pour la souche R30 qui se caractérise par une production très importante d'exopolysaccharides. Les colonies apparaissent au bout de 24 à 48h pour les *Rhizobium sp* (R30), ce qui indique qu'elles sont à croissance rapide, tandis que les *Bradyrhizobium sp* (Br12) sont à croissance lente, les colonies n'apparaissant qu'après 6 jours d'incubation.

1.2. Croissance des souches bactériennes (R30, Br12) en présence des herbicides (norflurazon et prométryne)

Il existe une très grande variabilité dans la tolérance des souches bactériennes aux différentes concentrations d'herbicide testées.

Des colonies ont été observées autour du puits en présence des herbicides (norflurazon et la prométryne) aux concentrations : 10^{-5} et 10^{-6} M, alors qu'à 10^{-4} M aucune croissance n'est observée (**Fig 19-20**). Cela signifie que les deux souches bactériennes tolèrent seulement les faibles concentrations (10^{-6} M et 10^{-5} M). Cet effet inhibiteur est déterminé après 8 jours d'incubation à 30°C.

Les deux souches bactériennes présentent la même concentration inhibitrice pour les deux types d'herbicide (10^{-4} M).

Les résultats ont montré aussi que la souche R30 tolère mieux les deux herbicides (norflurazon et prométryne) que la souche Br12. Il semblerait donc que la vitesse de croissance et la production importante des exopolysaccharides influencent le comportement des souches bactériennes vis-à-vis des deux herbicides (le norflurazon et la prométryne).

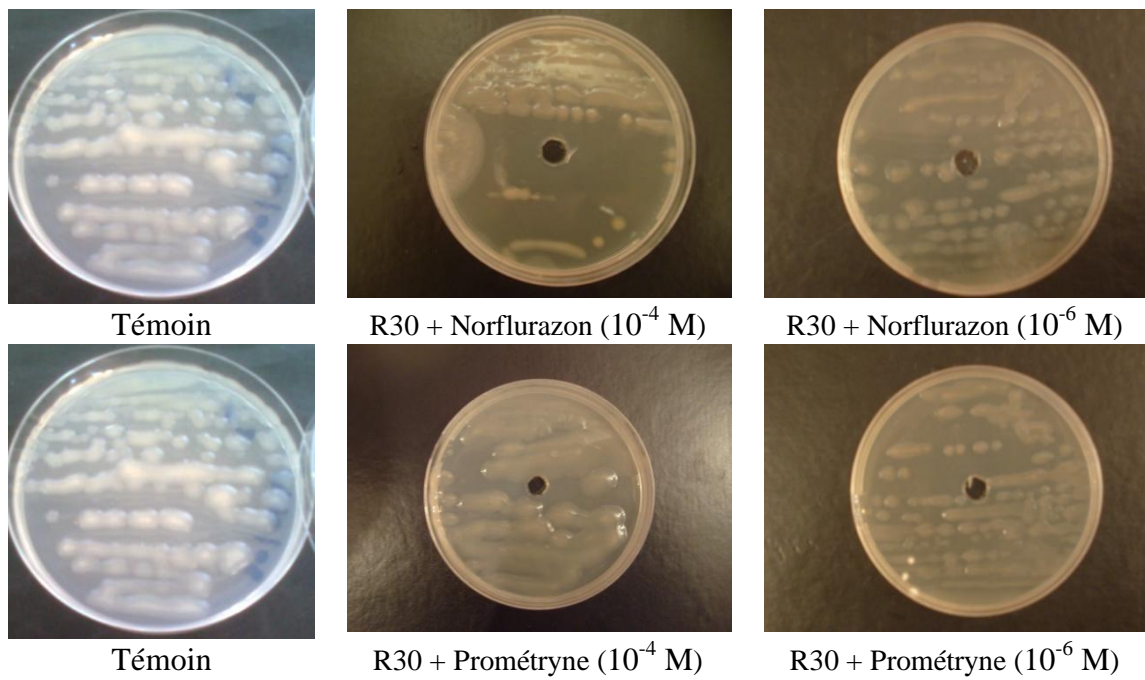


Figure 19. Photographies illustrant l'effet du norflurazon sur la croissance des souches bactériennes R30 et Br12.

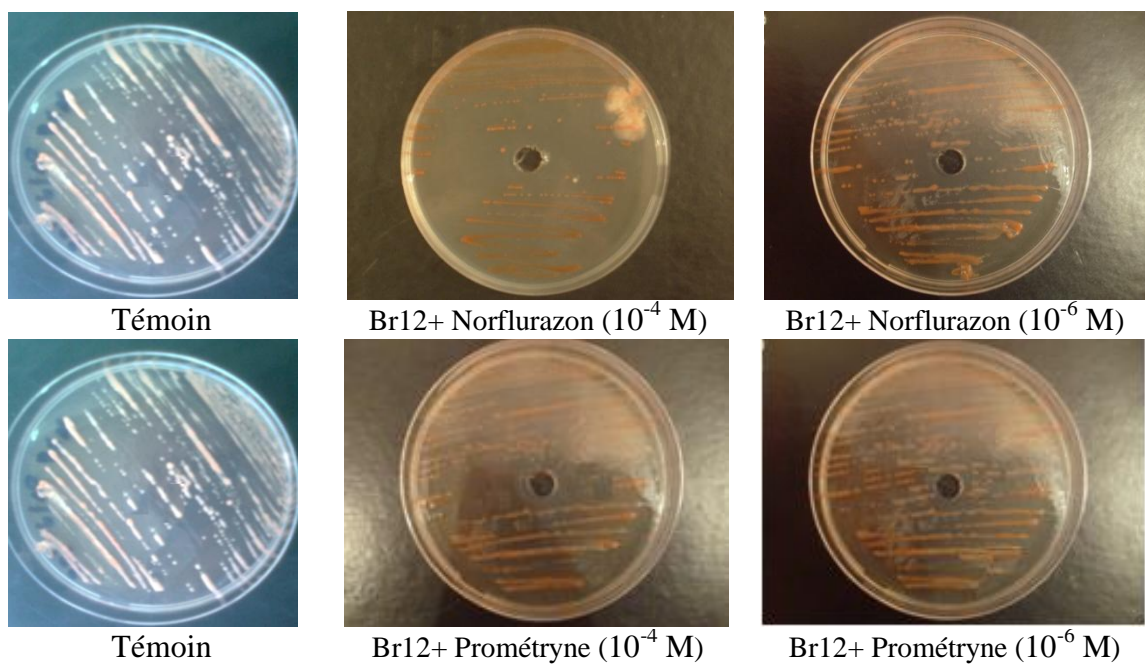


Figure 20. Photographies illustrant l'effet de la prométryne sur la croissance des souches bactériennes R30 et Br12.

2. Effet du norflurazon sur la croissance des plantules d'arachide

2.1. Elongation de la plante en fonction des concentrations du norflurazon

Nous avons mesuré l'impact des traitements norflurazon sur l'élongation racinaire et foliaire chez l'arachide durant 5 semaines de végétation. Les résultats sont présentés dans la **figure 21 (A et B)**

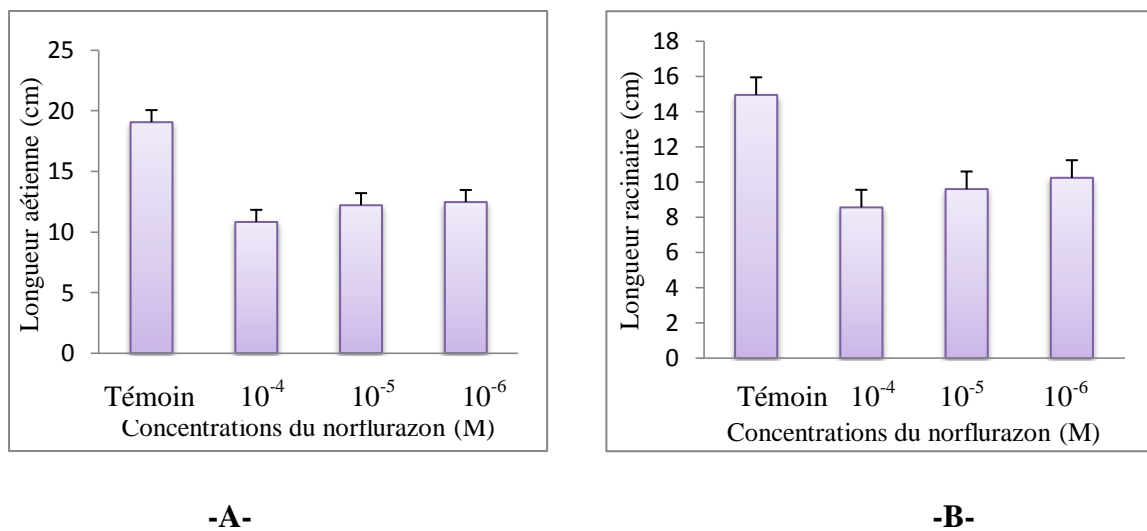


Figure 21. Élongation de la plante d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) en fonction des concentrations appliquées du norflurazon.

A : Longueur de la partie aérienne
 B : Longueur de la partie racinaire

- Taille de la partie aérienne

Les résultats obtenus montrent que les plantules témoins présentent une meilleure croissance avec une taille moyenne qui atteint les 19.02 cm et un développement très important, alors que les plantules stressées sont moins développées, avec des valeurs moyennes qui varient entre 12.46 - 12.2 et 10.82 cm, respectivement pour les doses 10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} M. (**Fig. 21 A**)

- Taille de la partie racinaire

Les plantules traitées par le norflurazon présentent un ralentissement remarquable dans la taille des racines par rapport aux témoins qui notent une valeur moyenne de 14.9 cm contre des valeurs respectives de 8.56- 9.6 et 10.25 cm chez les plantules dosées à 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M. (**Fig. 21 B**).

De plus les plantules stressées présentent des racines moins ramifiées que celles des témoins.

➤ L'allure des résultats tant au niveau foliaire que racinaire est la même, il semble y avoir un effet légèrement inhibiteur et qui ne dépasse pas 42% pour les concentrations les plus élevées (10^{-4} M).

Avec les résultats de l'analyse statistique, nous pouvons considérer que l'effet du norflurazon sur la croissance des plantules d'arachide est faible aussi bien sur la taille de chevelu racinaire que sur la longueur des feuilles.

2.2. Évolution de la biomasse en fonction de la concentration en norflurazon appliquée

La biomasse constitue un autre moyen nous permettant d'évaluer l'effet des deux herbicides sur la croissance de l'arachide.

- Biomasse sèche de la partie aérienne (PA)

La pesée de la matière végétale sèche aérienne des plantules d'arachide a montré une valeur moyenne de 0.614g pour le témoin contre 0.448 - 0.348 et 0.311g respectivement pour les concentrations 10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} M. Cela signifie qu'en présence de norflurazon, la biomasse diminue progressivement en fonction de l'augmentation de concentration, cette perte est maximale (de l'ordre de 50.6%) à la plus forte concentration (10^{-4} M). (**Fig. 23 A**)

- Biomasse sèche de la partie racinaire (PR)

Contrairement à la biomasse de la matière végétale sèche de la partie aérienne, la détermination de la biomasse sèche racinaire montre des valeurs moyennes de 0.12 - 0.11 - 0.12 et 0.15g respectivement pour le témoin et les plantules dosées par le norflurazon à 10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} M. Ces résultats montrent que la masse racinaire la plus importante est en faveur des plantules dosées à 10^{-4} M. Toutefois nous n'avons révélé aucune différence significative entre le témoin et les plantules stressées (**Fig. 23 B**).

- Rapport PR/PA

Le rapport a montré des valeurs en faveur des plantules stressées où « PR/PA » atteint : 0.47, 0.35 et 0.23 respectivement pour les concentrations suivantes d'herbicide : 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M, alors que pour le témoin, ce rapport a enregistré une valeur de 0.18, valeur nettement moins importante que les précédentes (**Fig. 23 C**).

L'analyse de variance a révélé une différence hautement significative entre le témoin et les plantes stressées, peu significative entre les plantules dosées à 10^{-6} et 10^{-5} et très significative entre ces deux dernières et celles traitées à 10^{-4} M.

Les résultats obtenus en calculant le rapport PR/PA, ont permis de déterminer le type d'accumulation de la matière sèche, ainsi que le degré de sensibilité des plantules d'arachide.

Lorsque le PR/PA est faible la croissance de la partie aérienne est favorisée, c'est le cas des plantules témoins, alors qu'en présence du norflurazon le rapport a noté des valeurs variables et importantes selon la concentration.

C'est ainsi que chez les plantules traitées à 10^{-4} M de norflurazon, l'accumulation de la matière sèche est au niveau des racines, ce qui traduit une croissance plus importante à ce niveau, alors qu'à la concentration de 10^{-5} et 10^{-6} M, nous constatons une homogénéité dans la répartition de la matière sèche entre la partie aérienne et racinaire.

- Humidité de la partie aérienne

La figure **23 D** exprime des humidités importantes dans la partie aérienne des plantules d'arachide. La valeur moyenne la plus élevée est de 79.33% pour les témoins, contre 52.76, 64.97 et 77.22% respectivement pour les plantules traitées à 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M.

L'analyse de variance a révélé une différence hautement significative entre les plantules témoins et stressées, en revanche, aucune différence significative n'est observée entre les plantules stressées à 10^{-5} et 10^{-6} M, en parallèle, ces deux dernières ont une différence peu significative avec les plantules dosées à 10^{-4} M.

Enfin, nous pouvons dire, que la baisse de teneur en eau des plantules d'arachide à fortes concentrations peut être liée à la mise en place de nécrose (phénomène non visible à l'œil nu sur les plants d'arachide).

2.3. Impact du norflurazon sur le contenu pigmentaire

L'évolution du contenu pigmentaire dans les parties aériennes varie en fonction de la dose de norflurazon.

L'effet le plus marqué est celui obtenu à 10^{-4} M avec un blanchissement des plantules (tige et feuilles). Cette dépigmentation débute par la tige, la base des feuilles et se propage vers l'extrémité, c'est le phénomène de « photobleaching » qui entraîne la formation des plantes albinos.

Pour les plantules traitées à 10^{-5} M, la dépigmentation touche les feuilles alors que la tige est totalement verte.

A 10^{-6} M les feuilles d'arachide présentent une réduction dans le contenu pigmentaire à partir de la deuxième feuille et juste au niveau de la nervure principale (**Fig. 22**).

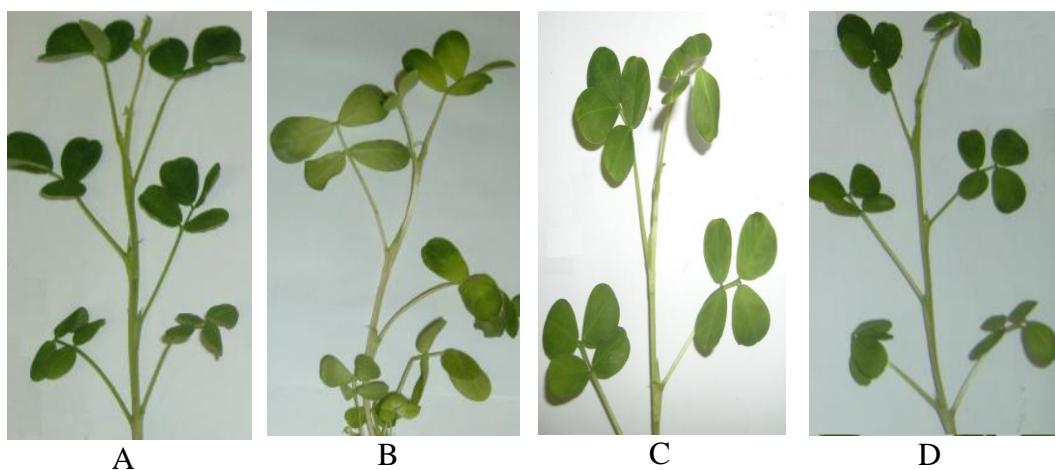


Figure 22. Photographies montrant l'effet du norflurazon sur la morphologie des plantules d'arachide.

- A. Témoin (plantules d'arachide non traitées par l'herbicide)
- B. Plantules d'arachide traitées par le norflurazon à 10^{-4} M
- C. Plantules d'arachide traitées par le norflurazon à 10^{-5} M.
- D. Plantules d'arachide traitées par le norflurazon à 10^{-6} M.

Les résultats statistiques confirment les observations précédentes et montrent que le contenu pigmentaire ne varie pas de manière significative pour des concentrations de l'ordre de 10^{-6} M. Pour les concentrations plus élevées, l'évolution des teneurs en chlorophylle a et b ainsi que celle des caroténoïdes suit la même allure. A partir de la concentration de 10^{-4} M en norflurazon, nous enregistrons des traces de la chlorophylle a et b et disparition totale des caroténoïdes.

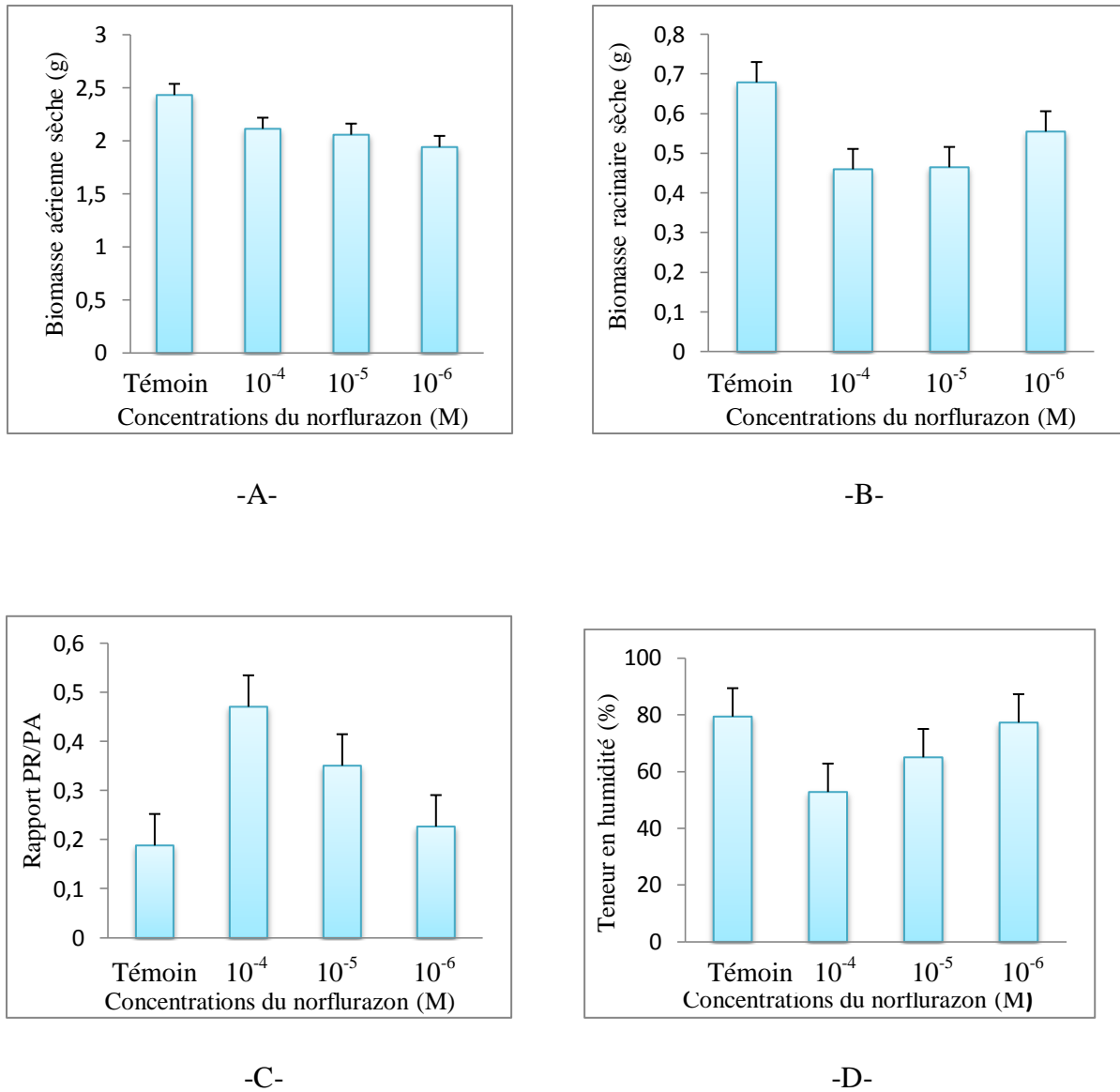


Figure 23. Croissance des plantules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) sous l'effet du norflurazon.

- A. Biomasse sèche de la partie aérienne (PA)
- B. Biomasse sèche de la partie racinaire (PR)
- C. Ratio de matière sèche : partie racinaire (PR)/partie aérienne (PA)
- D. Humidité de la partie aérienne (%)

3. Effet de la prométryne sur la croissance des plantules d'arachide

3.1. Effet sur l'élongation des plantules

Sur une même période de végétation (5 semaines), des cultures d'arachide traitées par la prométryne aux concentrations (10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M) ont été menés à coté des témoins et des plantules stressées par le norflurazon. Les résultats obtenus sont présentés en **figure 21(A et B)**.

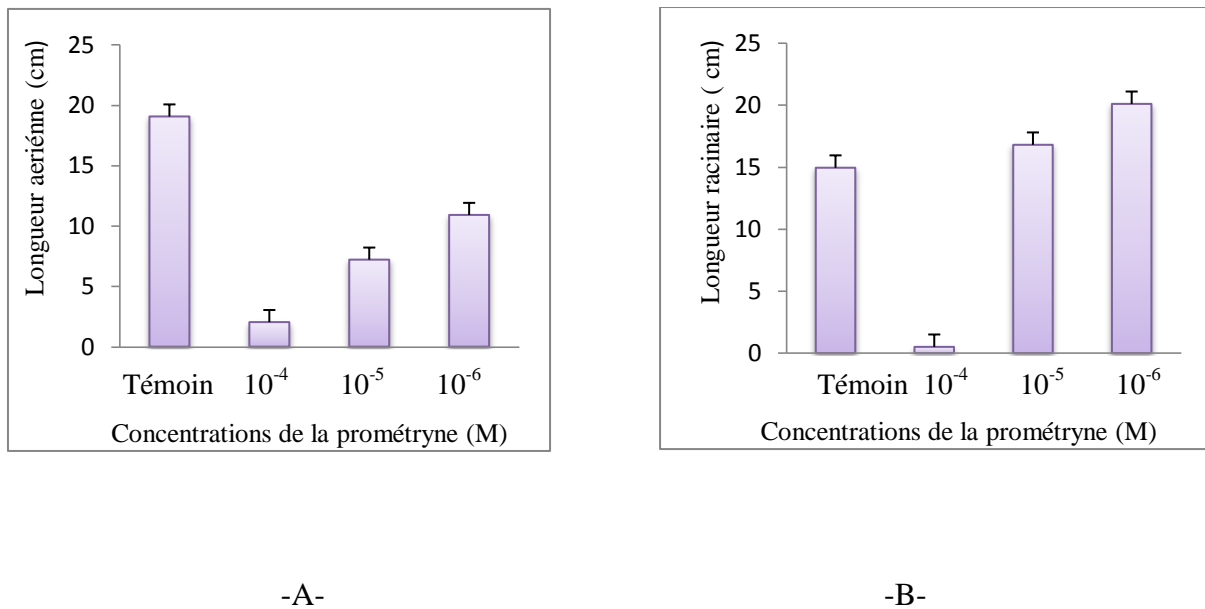


Figure 24. Élongation de la plante d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) en fonction des concentrations appliquées de la prométryne.

A : Longueur de la partie aérienne

B : Longueur de la partie racinaire

- Taille de la partie aérienne

La taille la plus élevée est notée chez les plantules témoins avec une valeur moyenne de 19.02cm, contre des valeurs plus en moins faibles en présence de la prométryne ; elles atteignent les valeurs: 10.9, 7.2 et 2.03cm respectivement pour les plantules traitées avec les trois concentrations étudiées: 10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} M. (**Fig. 24 A**).

L'analyse de la variance a révélé une différence hautement significative entre les plantules témoins et les plantules stressées.

- **Taille de la partie racinaire**

Comparativement à la taille de la partie aérienne des plantules, la partie racinaire présente des tailles peu semblables, avec une valeur de 14.95cm pour les plantules témoins et des valeurs de 20.1, 16.8 et 4.5cm respectivement pour les plantules traitées à 10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} M (**Fig. 24 B**).

L'analyse de la variance montre une différence hautement significative entre les plantules témoin et celles stressées par la prométryne à 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M.

➤ Sur la base de ces résultats, nous constatons que la croissance est liée à la concentration de la prométryne appliquée pour les deux organes mesurés (parties aérienne et racinaire). Il semble y avoir un effet stimulant aux faibles concentrations (10^{-5} et 10^{-6} M), contre un effet inhibiteur important qui dépasse les 70% à forte dose (10^{-4} M).

Avec les résultats de l'analyse statistique, et contrairement au norflurazon nous pouvons dire que l'atteinte de la croissance lors de l'utilisation de la prométryne en traitement racinaire est importante sur la taille du chevelu racinaire et sur la longueur de la partie aérienne.

3.2. Effet sur la biomasse des plantules

- **Biomasse aérienne sèche (PA)**

La biomasse aérienne sèche enregistrée par le témoin est de 0.57g contre des valeurs moyennes respectives de 1.14, 0.80 et 0.01g pour les plantules traitées par la prométryne aux concentrations de 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M (**Fig. 26 A**).

En se basant toujours sur le même test statistique, les résultats montrent une différence hautement significative entre les plantules témoins et les plantules stressées aux différentes concentrations.

- **Biomasse racinaire sèche (PR)**

La figure **26 B** représente l'effet de différentes concentrations en prométryne sur la biomasse racinaire sèche. Elle montre des valeurs moyennes variant de 0.12, 0.42, 0.38 et 0.27g respectivement pour le témoin, les plantules traitées à 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M.

L'analyse de la variance a montré une différence hautement significative entre les témoins et les plantules stressées à 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M.

- **Rapport PR/PA**

Le rapport PR/PA le plus important est noté chez les plantules traitées par la prométryne avec une valeur élevée (0.41) pour les plantules traitées à 10^{-5} M, contre un rapport faible pour les plantules témoins. (**Fig. 26 C**)

L'analyse de la variance a révélé une différence hautement significative entre les plantules témoins et stressées à 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M.

Ces résultats signifient que les plantules témoins favorisent la croissance de la partie aérienne en accumulant de la matière sèche, par contre les plantules stressées à 10^{-4} , 10^{-5} M accumulent préférentiellement de la matière sèche au niveau des racines. Cependant, la concentration 10^{-6} M présente des plantules caractérisées par une homogénéité dans la répartition de la matière sèche.

- **Teneurs en eau de la partie aérienne**

La teneur en eau la plus faible est notée chez les plantules traitées par la prométryne avec un pourcentage de 72.2 et 63.39% pour les doses de 10^{-4} et 10^{-6} M contre 79.81% pour le témoin (**Fig. 26 D**).

L'analyse de la variance a enregistré une différence peu significative entre témoins et les plantules stressées à 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M.

En se basant sur ces résultats, nous pouvons conclure qu'en présence de la prométryne l'absorption d'eau est atténuée. Cette diminution de l'humidité est proportionnelle à la dose en prométryne.

3.3. Effet sur le contenu pigmentaire

Chez les plantules traitées par la prométryne à forte dose (10^{-4} M), nous avons remarqué une décoloration partielle (jaunissement) de la première feuille. Cette dépigmentation est localisée au niveau de l'extrémité apicale des feuilles.

L'effet le plus marqué est celui obtenu aux faibles doses (10^{-5} et 10^{-6} M) avec un verdissement important des feuilles. Ce phénomène ne peut être que le résultat de nombreuses perturbations des processus physiologiques et biochimiques (**Fig. 25**).

L'ensemble de ces résultats nous permet de dire qu'en présence de la prométryne, les plantules d'arachide réagissent différemment, elles réduisent la longueur des plantules et des surfaces foliaires afin de minimiser l'absorption importante d'herbicide.



A

B

C

D

Figure 25. Photographies montrant l'effet de la prométryne sur la morphologie des plantules d'arachide

- A. Témoin (plantules d'arachide non traitées par l'herbicide).
- B. Plantules d'arachide traitées par la prométryne à 10^{-4} M.
- C. Plantules d'arachide traitées par la prométryne à 10^{-5} M.
- D. Plantules d'arachide traitées par la prométryne à 10^{-6} M.

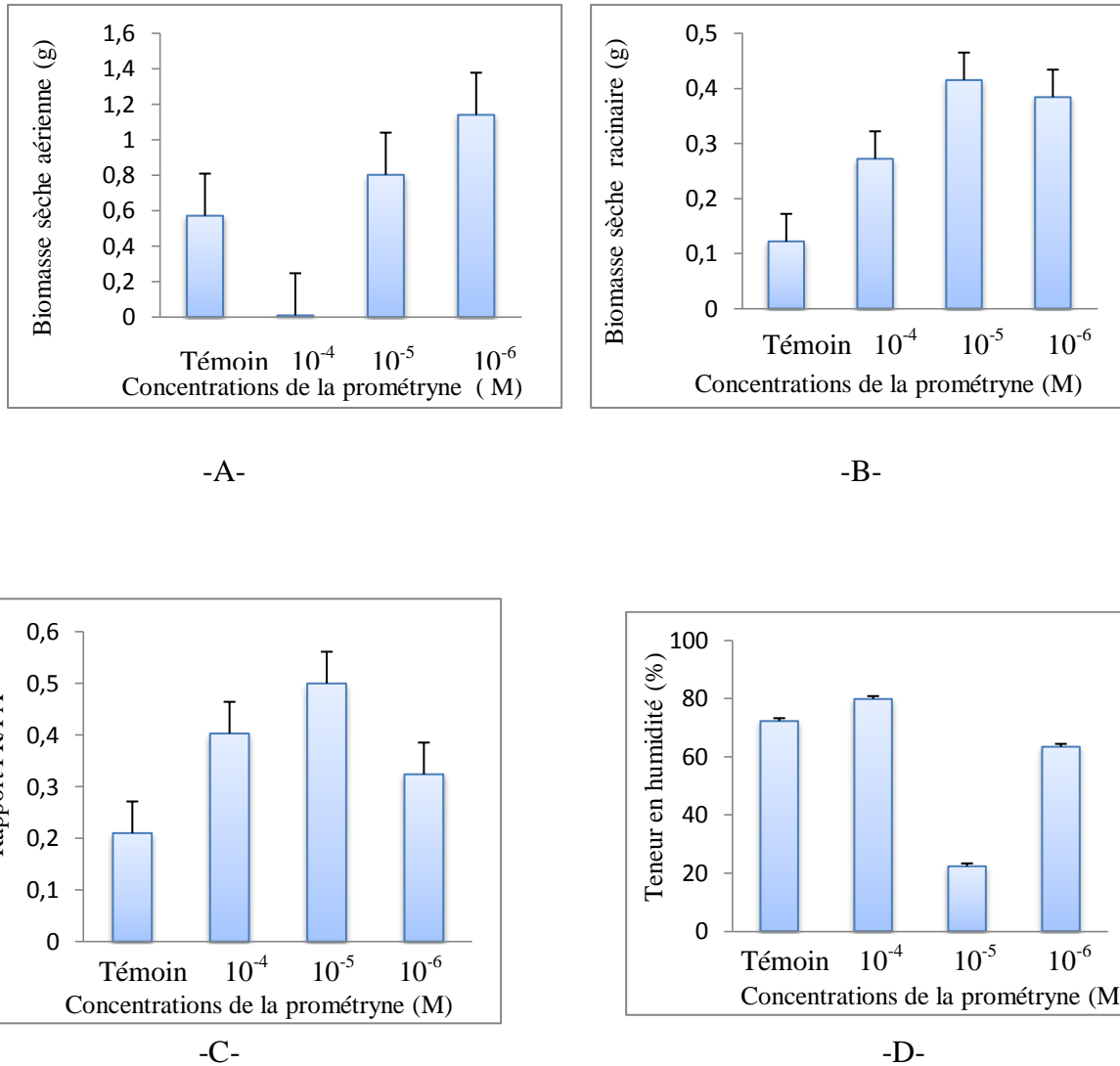


Figure 26. Croissance des plantules d'arachide (*Arachis hypogaea L.*) sous l'effet de la prométryne

- A. Biomasse sèche de la partie aérienne (PA)
- B. Biomasse sèche de la partie racinaire (PR)
- C. Ratio de matière sèche : partie racinaire (PR)/partie aérienne (PA)
- D. Teneur en humidité de la partie aérienne

4. Effet de l'inoculation sur la symbiose (*Rhizobium-Arachis hypogaea* L.)

La capacité symbiotique d'une souche de *Rhizobium* est évaluée par deux paramètres : son infectivité et son efficacité. L'infectivité de chaque souche est appréciée par le nombre de nodules formés sur la racine de chaque plante. L'efficacité est estimée par la détermination de la biomasse végétale racinaire et aérienne.

4.1 Infectivité des souches

Le tableau représentant les résultats des tests d'inoculation en pots, permet de montrer que les deux souches bactériennes testées R30, Br12 ont infecté les racines d'arachide en formant des nodules, seulement après trois semaines de culture.

L'apparition des nodules chez les plantules inoculées par chacune des 2 souches bactériennes a été observée en même temps, malgré la différence de croissance des souches bactériennes (Br12, R30), la première étant à croissance lente alors que la seconde est à croissance rapide.

Tableau VIII. Test de nodulation.

	Nombre de pied/ pot	Nombre de nodules /pied
Plantules d'arachide non inoculées (Témoin)	2	0
Plantules d'arachide inoculées par la Br12	2	7
Plantules d'arachide inoculées par la R30	2	5

4.2 Efficacité des souches

➤ Formation des nodules

Pour les plantes inoculées avec la souche R30 : les nodules obtenus sont presque tous de la même taille, de couleur rose indiquant la présence de légghémoglobine et présageant ainsi d'une activité nitrogénasique.

Pour les plantes inoculées avec la souche Br12, les nodules sont de petite taille et plus nombreux que les précédents (**Fig. 27**).



Br12

R30

Figure 27. Photographie des nodules racinaires obtenus après 3 semaines de culture lors du test de nodulation.

➤ **Croissance des plantules d'arachide**

Pour déterminer l'effet des inoculum bactériens sur la croissance d'arachide, nous avons mesuré la taille des plantules (parties aérienne et racinaire), ainsi que la biomasse racinaire et aérienne, après cinq semaines de culture.

L'ensemble des paramètres étudiés est représenté dans le tableau suivant :

Tableau IX. Effet de l'inoculation sur la croissance des plantules d'arachide

	Taille aérienne (cm)	Taille racinaire (cm)	Biomasse aérienne sèche (g)	Biomasse racinaire sèche (g)
Plantules témoins	19.1 ± 0.68	9.9 ± 3.20	0.30 ± 0.12	0.07 ± 0.03
Plantules inoculées par la souche Br12	25 ± 0.59	14.2 ± 2.98	0.75 ± 0.18	0.15 ± 0.01
Plantules inoculées par la souche R30	23.9 ± 0.64	10.6 ± 3.22	0.61 ± 0.16	0.09 ± 0.03

- La taille aérienne la plus élevée est notée chez les plantules d'arachide inoculées avec la souche Br12 et la souche R30 respectivement avec des valeurs de 25cm, 23.9cm contre seulement 19 cm pour les plantules témoins (non inoculées).

L'analyse de variance a révélée une différence significative entre les plantules témoins et inoculées.

- Les racines présentent des valeurs de 9, 11 et 14cm respectives avec les plantules témoins, inoculées par les souches R30 et Br12.
- La biomasse aérienne sèche est de 0.30, 0.75 et 0.61g respectivement pour les plantules témoins et inoculées (R30 et Br12), ces résultats montrent que les plantules inoculées possèdent la biomasse la plus importante.

L'analyse de variance a révélé une différence significative entre les plantules témoins et les plantules inoculées avec l'une ou l'autre des deux souches bactériennes (R30 et Br12).

- La biomasse racinaire sèche la plus élevée est de 0.15g chez les plantules inoculées par la souche Br12 contre 0.07g chez les plantules inoculées par la R30 et le témoin.

Les résultats obtenus, montrent que, quel que soit la bactérie utilisée, les plantules d'arachide inoculées produisent plus de biomasse que les plantules témoins. Il semblerait aussi que les deux bactéries inoculées présentent un effet PGPR qui est beaucoup plus marqué pour la souche Br12.

5. Effet du norflurazon sur les plantules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) inoculées par deux souches bactériennes (R30 et Br12)

5.1 Effet sur la nodulation

Le traitement par le norflurazon des plantules d'arachide inoculées par les deux souches bactériennes (R30 et Br12) a provoqué une inhibition du processus de nodulation et ceci aux différentes concentrations (10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} M).

Tableau X. Effet du norflurazon sur le test de nodulation

	Nombre de pied/ pot	Nombre de nodules /pied
Témoin inoculé par la souche Br12	2	7
Plantules traitées par le norflurazon inoculées par la souche Br12	2	0
Témoin inoculé par la souche R30	2	5
Plantules traitées par le norflurazon inoculées par la souche R30	2	0

5.2. Effet sur la croissance

Afin, d'estimer l'effet du norflurazon sur la croissance des plantules d'arachide inoculées, nous avons réalisé des mesures biométriques et déterminé le poids sec des plantules.

D'après les résultats obtenus, nous constatons que la taille de la partie aérienne des plantules inoculées par les souches bactériennes R30 et Br12 et traitées par le norflurazon (10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M) se développe de la même manière que les témoins avec une élévation des entre nœuds en faveur des plantules stressées.

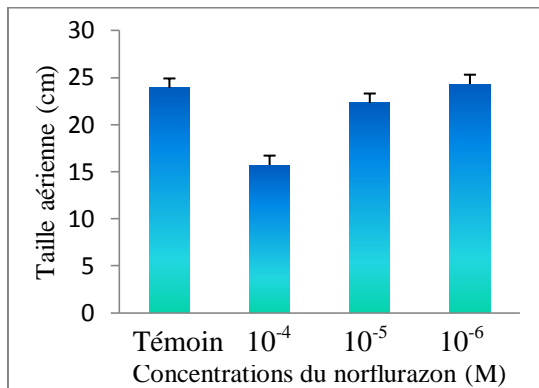
Contrairement à la taille de la partie aérienne, le norflurazon a un effet positif sur la croissance racinaire des plantules stressées inoculées par la bactérie R30, où elles atteignent une taille plus élevée par rapport aux plantules témoins. Cette augmentation est d'autant plus prononcée que la dose du norflurazon est importante. Dans le précédent chapitre nous avons déjà signalé un effet PGPR de la souche R30 qui apparemment persisterait même sous l'effet du norflurazon. Par ailleurs, l'effet de ce même herbicide sur la croissance de la souche Br12 n'est pas très important même aux concentrations élevées en Norflurazon.

Comparativement aux plantules témoins, les plantules stressées sont plus frêles et dépigmentées.

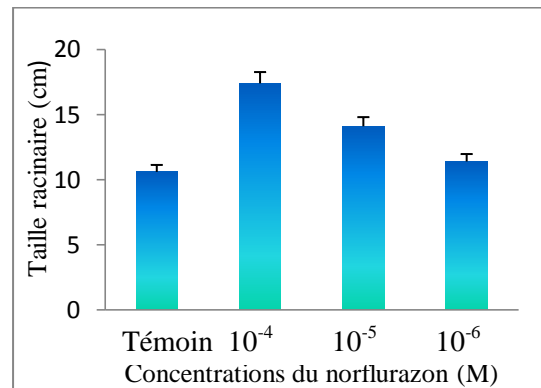
Nous pouvons donc dire qu'en présence de norflurazon, la souche bactérienne R30 favorise la croissance des racines au détriment de la partie aérienne.

Les plantules inoculées par la souche bactérienne Br12 et traitées par le norflurazon, montrent une diminution dans la croissance des racines par rapport aux témoins, avec une différence hautement significative.

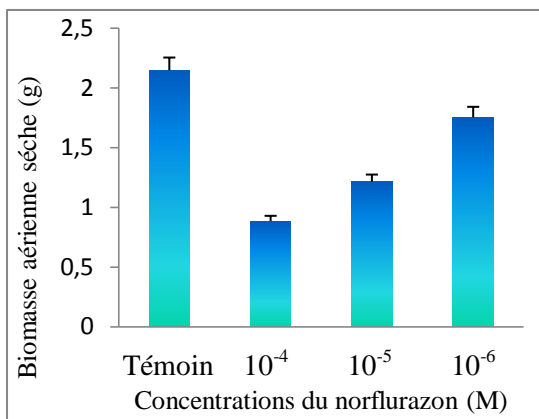
Comparées aux plantules témoins, les plantules stressées ne présentent pas de différence notable, puisque la taille est sensiblement la même que celles des témoins. Ceci montre que contrairement à la souche bactérienne Br12, la souche R30 semble atténuer l'effet du norflurazon la plantule d'arachide



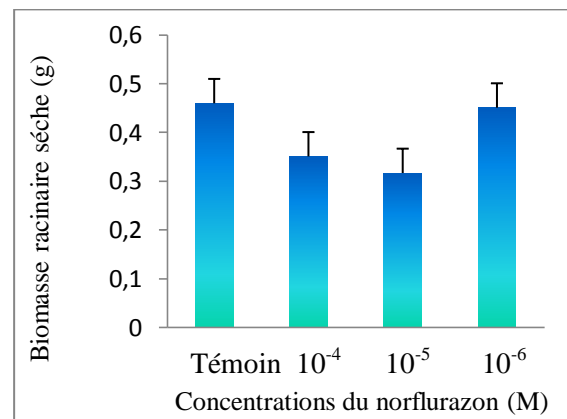
-A-



-B-



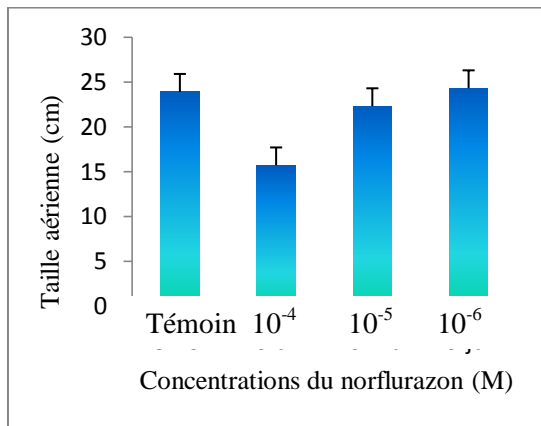
-C-



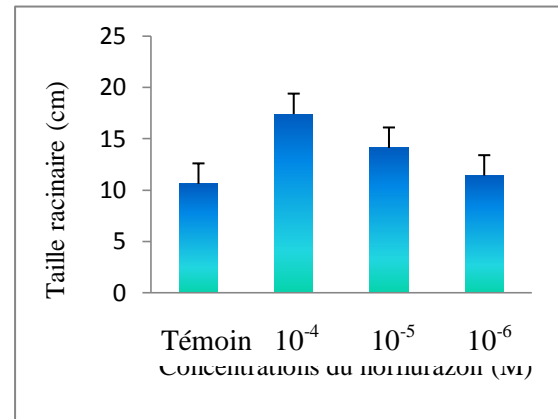
-D-

Figure 28. Effet de 3 concentrations de norflurazon sur les plantules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) inoculées par la souche Br12 durant 5 semaines de culture.

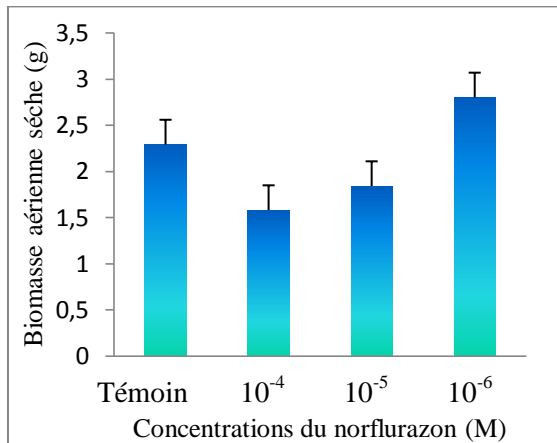
- A. Taille aérienne (cm)
- B. Taille racinaire (cm)
- C. Biomasse aérienne sèche (g)
- D. Biomasse racinaire sèche (g)



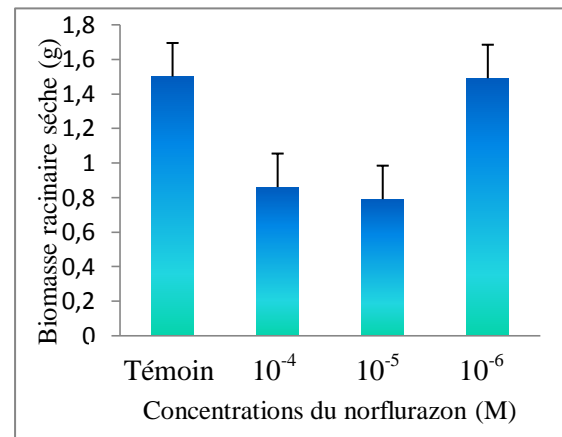
-A-



-B-



-C-



-D-

Figure 29. Effet de 3 concentrations de norflurazon sur les plantules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) inoculées par la souche R30 durant 5 semaines de culture.

- A. Taille aérienne
- B. Taille racinaire
- C. Biomasse sèche de la partie aérienne
- D. Biomasse sèche de la partie racinaire

6. Effet de la prométryne sur les plantules d'arachide (*Arachis hypogaea* L) inoculées par deux souches bactériennes (R30 et Br12)

6.1. Effet sur la nodulation

Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas eu de formation des nodules donc, ceci peut être dû à l'interruption de dialogue moléculaire entre la bactérie et la plante hôte en présence de la prométryne. Dans ces conditions, nous notons l'incapacité des deux souches bactériennes (R30 et Br12) à infecter les racines de l'arachide.

Tableau XI. Effet de la prométryne sur la nodulation des plantules d'arachide

	Nombre de pied/ pot	Nombre de nodules /pied
Témoin inoculé par la souche Br12	2	7
Plantules traitées par la prométryne inoculées par la souche Br12	2	0
Témoin inoculé par la souche R30	2	5
Plantules traitées par la prométryne inoculées par la souche R30	2	0

6.1.1. Effet sur la croissance

La taille moyenne de la partie racinaire des plantules d'arachide inoculées avec la souche bactérienne R30 traitées par la prométryne est comparable à celles des plantules témoins.

Les valeurs atteignent respectivement 10.6cm, 4.8cm, 7.4cm et 11.1cm: pour le témoin et les plantules stressées à 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M.

L'analyse de variance ne révèle aucune différence significative.

Pour la taille aérienne, les valeurs des plantules stressées par la prométryne atteignent 3.4-14 et 20.3cm cm respectivement pour les concentrations : 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M contre une valeur moyenne de 23.9cm pour le témoin.

De plus, un allongement des entre nœuds est noté en présence de la prométryne.

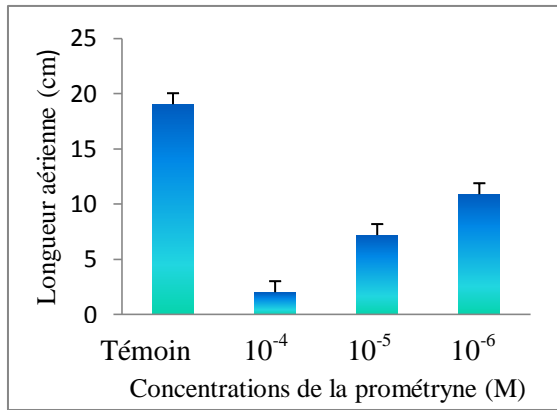
Concernant les plantules inoculées par la souche bactérienne Br12 traitées par la prométryne présentent une diminution dans la croissance des racines par rapport aux témoins, les valeurs atteignent : 3.2-9.2- 13.4cm pour les concentrations 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M contre 21.1cm pour le témoin, avec une différence hautement significative.

L'analyse de variance n'a révélé aucune différence significative entre la taille aérienne des plantules inoculées par la Br12 traitées par la prométryne et le témoin.

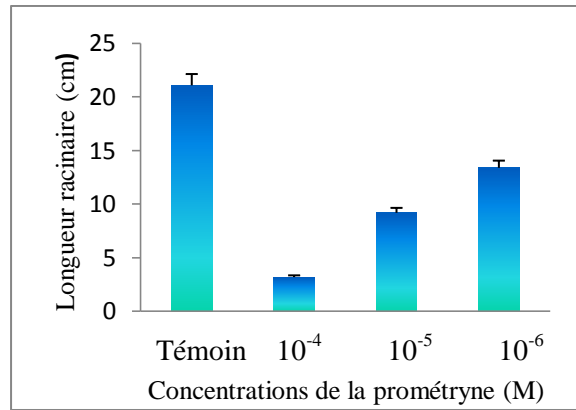
Comme le norflurazon, la prométryne provoque une élongation des entre-nœuds proportionnelle à la dose appliquée.

A partir de ces résultats, nous pouvons dire que l'inoculation par la bactérie R 30 atténue l'effet de la prométryne à faible concentration (10^{-5} et 10^{-6} M), vue que la croissance est nettement plus importante que celle obtenu sur les plantules d'arachide traitées par la prométryne et non inoculées, tandis qu'à 10^{-4} M les résultats sont sensiblement les mêmes.

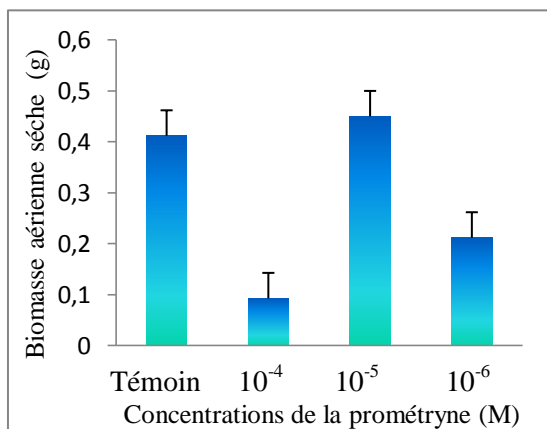
Contrairement à la bactérie R30, nous constatons que la Br12 ne semble pas avoir un effet sur la prométryne .



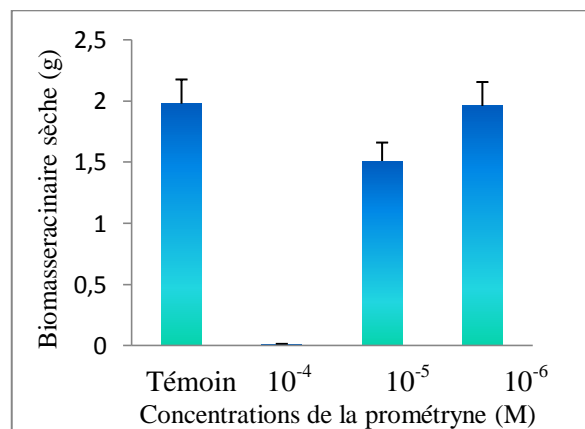
-A-



-B-



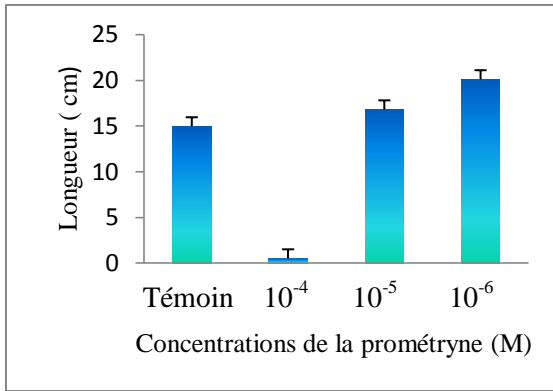
-C-



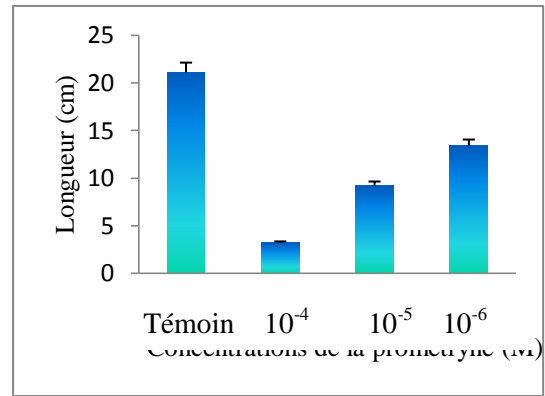
-D -

Figure 30. Effet de 3 concentrations de prométryne sur les plantules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) inoculée par la souche Br12 durant 5 semaines de culture.

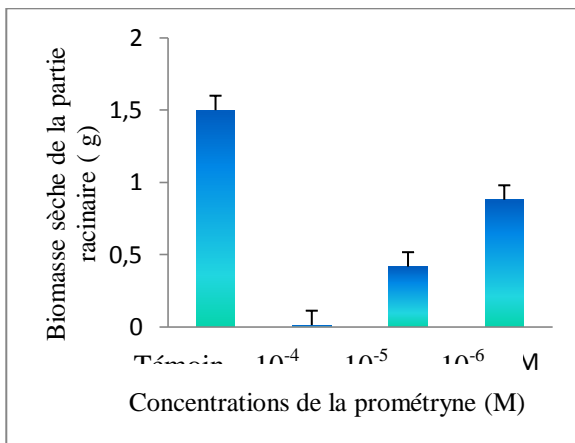
- A. Longueur de la partie aérienne
- B. Longueur de la partie racinaire
- C. Biomasse sèche de la partie aérienne
- D. Biomasse sèche de la partie racinaire



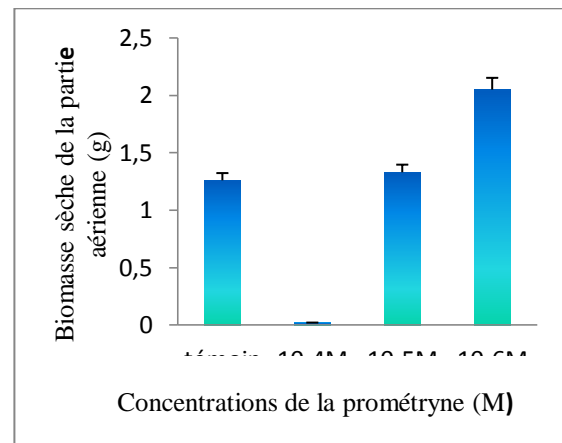
-A-



-B-



-C-



-D-

Figure 31. Effet de 3 concentrations de prométryne sur les caractères morphologiques des plantules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) inoculée par la souche R30 durant 5 semaines de culture.

- A. Longueur de la partie aérienne
- B. Longueur de la partie racinaire
- C. Biomasse sèche de la partie aérienne
- D. Biomasse sèche de la partie racinaire

IV- Discussion générale

L'objectif de notre travail, est d'étudier l'impact des herbicides sur la morphologie et la physiologie d'une légumineuse (*Arachis hypogaea* L.) dans différentes conditions d'inoculation et de non inoculation.

Dans la première partie, nous avons essayé d'analyser la symptomatologie liée à l'emploi d'un herbicide sur l'arachide en fonction de sa nature (norflurazon et prométryne), de la dose (10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M) et des conditions de culture (culture hydroponique et en pots).

Le norflurazon, herbicide appartenant à la famille des pyridazinones, semble avoir un effet négatif sur la morphologie des plantules d'arachide dont les symptômes sont visibles après un traitement de l'ordre de 10^{-6} M.

Ces symptômes concernent les parties aériennes (feuille et tige) qui perdent progressivement leur couleur verte pour devenir complètement blanches à forte concentration (10^{-4} M).

Ces observations (dépigmentation) apparaissent dès qu'il y a la percée de la tige, c'est à dire après 5-6 jours de culture.

Le « photobleaching » observé est expliqué par l'inhibition d'une enzyme clé « phytoène désaturase », enzyme responsable sur la biosynthèse des caroténoïdes et la principale cible du norflurazon (Wilkinson, 1989 ; Scalla, 1991), qui entraîne avec le temps une inhibition du développement des chloroplastes (Ben-Aziz et Koren, 1974) et par conséquent une réduction de la teneur des pigments photosynthétiques.

Il est signalé, qu'en plus des perturbations morphologiques (bleaching) et physiologiques (inhibition des enzymes), l'herbicide exerce une phytotoxicité sur les feuilles d'arachide en provoquant d'autres effets indésirables dans la synthèse de nombreux métabolites physiologiques et biochimiques tel que la modification du métabolisme lipidique (Hilton *et al.*, 1971 ; Abrous *et al.*, 1998) et l'inhibition de la réaction de Hill (Moreland et Hill, 1962 ; St John et Hilton, 1976).

D'autres auteurs tels que Christopher et Holtum, (2000) ont insisté sur l'effet inhibiteur de la plupart des herbicides sur les différentes fonctions métaboliques et sur les enzymes qui catalysent les différentes réactions biologiques.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux qui ont été mis en évidence sur le soja (Abrous *et al.*, 1998), sur une Cyanobacterium synechococcus (Linden *et al.*, 1990) et sur une algue marine (*Scenedesmus actus*) (Kunerty et boger, 1979 ; Sandman et Alibercht, 1990).

Concernant la cinétique de croissance des plantules d'arachide cultivées en pots et en culture hydroponique, l'analyse de variance a révélé un effet significatif du norflurazon. Cet effet est constaté suite à une réduction de la taille et de la biomasse de la partie aérienne et racinaire. De plus, les racines des plantules stressées sont nettement moins ramifiées que celles des témoins, ceci peut être lié au déficit de photosynthèse consécutif à la disparition partielle ou totale des pigments associés à l'acte photosynthétique, qui par conséquent, diminue l'accumulation de pool de carbone nécessaire pour la synthèse des protéines.

La réduction de la croissance d'arachide traitée par le norflurazon peut provoquer d'autres perturbations au niveau du métabolisme où le pool de carbone accumulé et réduit s'oriente vers la voie des phénylpropanoïdes (flavonoïdes) au lieu de la voie isoprénoïde (métabolites primaires : sucre, protéine, ...etc.) (Laksoo *et al.*, 2000). A partir de ce résultat, nous pouvons dire aussi que la synthèse des composés phénoliques est fonction du développement de la plante et de la répartition des carbohydrates entre le métabolisme primaire et secondaire. (Matsuki, 1996).

Dans le cas de la prométryne et contrairement au norflurazon les symptômes morphologiques ne sont pas très visibles à faibles concentrations, tandis qu' 10^{-4} M un verdissement important est observé au niveau des feuilles (vert foncé), ceci est expliqué par une perturbation dans la synthèse des pigments photosynthétiques due à un blocage dans le passage des électrons dans la membrane des thylakoïdes du à l'inhibition du PSII (cible de la prométryne). (Tissut et Severin, 1984). Ce résultat est confirmé par plusieurs auteurs, par exemple, Molander (1991), Molander *et al.* (1992) et Larsen *et al.* (1986).

Ce phénomène de « verdissement » est probablement une conséquence d'un mécanisme d'homéostasie où les cellules végétales en situation de stress augmenteraient leurs antennes pigmentaires afin de maintenir une conversion efficace entre l'énergie lumineuse et l'énergie chimique (Dahl, 1996 ; Dahl et Blanck, 1996) et éviter la dissipation de l'énergie lumineuse sous forme de chaleur. (Ducruet, 1991).

Par ailleurs, l'inhibition du PSII entraîne plusieurs effets, parmi eux, l'arrêt du dégagement d' O_2 et de la fixation du CO_2 ainsi qu'une production d' O_2 singulet (forme très active) à partir des chlorophylles excitées.

L'oxygène singulet active entrainera la destruction oxydative des constituants des thylakoides, des pigments, et accumulation de nitrites toxiques (Ducruet, 1991 ; Moreland, 1967, Tissut et Severin, 1984).

Le CO₂ non fixé provoque une accumulation de pool de carbone, qui entraine une inhibition de la biosynthèse des métabolites primaires (protéines, sucre...etc.).

L'effet de la prométryne sur la croissance en longueur des plantules d'arachide est différent. Dans le cas des plantules d'arachide traitées par la prométryne, nous constatons qu'il y a une réduction importante de la taille aérienne à forte concentration d'herbicide, due probablement à une accumulation des formes actives d'O₂ (O₂ singulet) due à une réduction de la capacité photosynthétique, après une absorption foliaire importante. Cette accumulation d'O₂ singulet aurait pour conséquence une destruction des thylakoides, et par conséquent l'inhibition de la synthèse des pigments photosynthétiques.

Contrairement à la partie aérienne, la longueur des racines est importante aux concentrations élevées en prométryne. Ceci serait probablement dû à une réaction de la plante pour développer son système racinaire afin de « fuir » la zone rhizosphérique polluée par la prométryne.

Concernant la biomasse racinaire et aérienne des plantules traitées par la prométryne, nous remarquons qu'il y a une réduction en fonction de la concentration de l'herbicide, c'est-à-dire plus la concentration est élevée, la biomasse est faible. Ce résultat est en accord avec les travaux de El Dib *et al.*, 1989 et Abou -Waly *et al.*, 1991, qui ont montré d'une manière significative l'effet négatif des différentes doses d'herbicide (triazines) sur la croissance des chlorophycées (*Scenedesmus*).

Dans l'objectif d'étudier l'influence des herbicides sur le processus symbiotique, un test d'inoculation est réalisé. Ce test consiste à mettre en évidence les deux partenaires symbiotiques (*Rhizobium- Arachis*) en contact direct avant et après application du norflurazon ou la prométryne.

Chez les plantules d'arachide non traitées par l'herbicide, les deux souches bactériennes ont montré leur capacité de pénétrer dans les tissus racinaires, et d'induire la formation des nodules, donc, elles confirment que nos bactéries sont infectives et qu'elles appartiennent aux bactéries nodulant les légumineuses.

La formation des nodules est expliquée par l' infectivité des souches bactériennes (Br12 et R30) à travers une bonne expression des gènes *nod* portés par les *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, et par conséquent une bonne communication avec la plante hôte (*Arachis*). (Zhang *et al.*, 2000).

A son tour, l'arachide assure la synthèse des photosynthétats (ex : glucides, flavonoïdes,...), nécessaire pour l'établissement de la symbiose, et dont la plupart augmentent la croissance des microorganismes.

En plus de la formation des nodules, l'inoculation des plantes a eu des effets bénéfiques sur la croissance des plants d'arachide, ceci est constaté suite à une augmentation de la biomasse aérienne et racinaire, une stimulation dans la croissance en longueur (aérienne, racinaire), et un développement important de l'arachide (plante entière). Ces résultats sont confirmés par une analyse statistique qui a révélé une différence significative entre les plantules inoculées par les souches Br12 et R30 d'une part et le témoin d'autre part.

L'amélioration dans la croissance que nous avons observée est le phénomène le plus souvent rapporté chez une légumineuse inoculée, grâce à une fixation importante de l'azote atmosphérique, qui favorise la synthèse et l'augmentation du taux de la matière organique (Roose, 1994).

La contamination des sols par les herbicides peut avoir des effets non seulement sur la plante mais aussi, sur les populations microbiennes, pour cette raison que dans la deuxième partie de notre travail, nous avons essayé d'étudier l'influence du norflurazon et de la prométryne sur la croissance de deux souches bactérienne (Br12 et R30)

Les résultats obtenus montrent que les deux souches bactériennes (Br12, R30) présentent non seulement un comportement différent au type d'herbicide (norflurazon et prométryne) mais aussi à la dose utilisée.

Cette étude microbiologique nous a permis de noter une différence de croissance entre les 2 souches bactériennes (croissance lente pour la Br12 et rapide pour la R30). Celle-ci ne semble pas constituer un facteur primordial dans l'établissement de la symbiose. Par ailleurs, le retard signalé dans la vitesse de croissance des souches bactériennes est dû au temps nécessaire pour que celles ci consomment et développent plusieurs mécanismes pour mobiliser, immobiliser, dégrader ou transformer les toxiques comme les herbicides (Gremion, 2003).

La dégradation a principalement été attribuée à une activité enzymatique, qui fait activer plusieurs réactions chimiques tel que : la désalkylation, déshalogénéation et la désamination (Bliefert *et al.*,2001) , par conséquent, l'élimination complète de la molécule avec comme seuls rejets des produits simples tels que : CH₄..., qui vont être utilisé comme source de carbone pour la flore microbienne (Coulibaly, 2005).

D'autres mécanismes de résistance aux herbicides ont été identifiés, nous citons : la biominéralisation, la séquestration, où la conversion enzymatique qui diffèrent des véritables résistances aux métaux lourds qui sont eux liés à la présence de gènes portés par des éléments génétiques mobiles tels que les plasmide (Monchy, 2007).

Dans le cas des plantules traitées par l'herbicide (norflurazon ou la prométryne), les résultats ont montré un échec dans le processus de nodulation quel que soit le type et la dose d'herbicide, ceci est probablement dû à l'incapacité des souches à pénétrer dans les tissus racinaires et d'induire la formation des nodules.

De nombreuses explications peuvent être apportées, puisque sous l'action des deux herbicides (norflurazon et prométryne) nous avons constaté une réduction importante de la croissance bactérienne à des concentrations de l'ordre de 10⁻⁴M. Ceci pourrait constituer une première hypothèse, puisque la nodulation ne peut avoir lieu qu'à une densité rhizobienne supérieure ou égale à 10⁶ bactéries. g⁻¹ de sol sec. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Rao et ses collaborateurs (2002), qui sont arrivés à dire que les bactéries du genre *Rhizobium* présentent une sensibilité vis-à-vis des herbicides.

La deuxième explication pourrait être apportée par la plantule d'arachide. En effet, nous avons noté une altération des fonctions physiologiques de la plante, particulièrement aux concentrations élevées en norflurazon et prométryne (10⁻⁴). Cette altération pourrait avoir des incidences négatives sur la production des photosynthétats, nutriments essentiels aux bactéries rhizosphériques. La troisième hypothèse permettant l'explication de la non nodulation en présence d'herbicides se situerait dans la perturbation du langage moléculaire entre les deux partenaires (*Rhizobium* et arachide), perturbation liée à une exsudation racinaire défailante. L'association *Rhizobium* –*Arachis hypogaea* est un processus complexe qui implique un échange coordonné des signaux. Cet échange nécessite la présence des métabolites primaires synthétisé par la plante (Sullivant et al.,1994) et des exopolysaccharides synthétisé par la bactérie (Kaufusi, et al., 2004) pour la reconnaissance des deux symbiontes, cependant la présence des herbicides (norflurazon et prométryne) provoque une perturbation, et modification

dans la synthèse des métabolites primaires, ceci va rendre la bactérie et la plante incapable d'établir une réaction symbiotique.

La dernière hypothèse consisterait à considérer la résultante des trois premières explications qui limiterait de manière importante la nodulation de l'arachide.

Nous pouvons noter que l'inoculation des plantules d'arachide avec les 2 souches bactériennes (Br12 et R30), même si elles ne sont pas parvenues à induire la nodulation, ont tout de même contribué à atténuer l'effet des herbicides en opérant un effet PGPR (effet promoteur de croissance racinaire) particulièrement pour la souche Br12 qui a permis une élévation racinaire remarquable même aux concentrations élevées.

Cette observation est probablement à mettre sur le compte de la production d'exopolysaccharides par ces bactéries. Il semblerait que la gangue muqueuse produite par ces bactéries (EPS) serait un moyen de se protéger contre les effets négatifs des herbicides. Ces mêmes polymères contribueraient ainsi à limiter les transferts des herbicides vers la plante par des mécanismes d'adsorption.

Conclusion

Conclusion

L'objectif général de notre travail consiste à améliorer la culture des végétaux, en particulier les légumineuses soumises aux conditions environnementales défavorables et évaluer l'impact de deux herbicides (norflurazon et la prométryne) sur la morphologie et la physiologie de la plante en présence et en absence d'inoculum bactérien. La cinétique de croissance de l'arachide cultivée en pot a montré que, les herbicides induisent un ralentissement dans l'allongement de la partie aérienne et racinaire des plantules, dont l'intensité dépend de la dose appliquée, tout au moins durant les premiers stades de développement (4 à 5 semaines de culture).

Un photobleaching est noté chez les plantules traitées par le norflurazon, qui se manifeste par un blanchissement total des plantes à forte concentration (10^{-4} M et 10^{-5} M).

Contrairement au norflurazon, les plantules traitées par la prométryne ont eu une condensation de la chlorophylle au niveau des feuilles dont la taille devient réduite.

La tolérance des souches bactériennes aux herbicides semble variable ; elles présentent une tolérance importante pour les faibles concentrations (10^{-6} M) et une sensibilité relative aux concentrations élevées (10^{-4} M).

La souche bactérienne qui a montré une croissance importante en présence des deux herbicides est la souche (R30) caractérisée par une production importante d'exopolysaccharides, polymères qui interviennent dans le dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie au cours de l'interaction.

Les deux souches bactériennes étudiées R30 et Br 12, appartenant respectivement aux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* ont montré une capacité à pénétrer les tissus racinaires et induire la formation de nodules. Elles sont de ce fait, toutes les deux, dites infectives vis-à-vis de l'arachide.

Les nodules formés en absence de prométryne et de norflurazon sont le résultat d'une série d'interactions contrôlées par des signaux moléculaire entre la plante et les bactéries.

Les exopolysaccharides produits par les *Rhizobia* et localisés au niveau des surfaces bactériennes représentent un élément important dans le processus d'infection racinaire.

La prométryne et le norflurazon, même s'ils n'ont pas d'effet significatif sur la prolifération et la croissance des deux souches bactériennes Br12 et la R30, ont inhibé la formation de nodules. Il s'agit donc d'un effet inhibiteur des deux herbicides sur l'installation de la symbiose.

Cet échec de nodulation ne serait pas du à un effet direct de l'herbicide (norflurazon ou prométryne) sur les deux souches bactériennes, mais plutôt à un effet indirect par le biais de l'action de l'herbicide sur la plante et sur la bactérie qui a probablement modifié l'environnement rhizosphérique en perturbant les échanges des signaux moléculaires entre les deux partenaires et perturbé ainsi la relation trophique.

Perspectives

Plusieurs pistes de travail peuvent être proposées comme perspectives et compléments à ce travail :

- Déterminer le mécanisme de dégradation des herbicides (norflurazon, prométryne).
- Identification des métabolites de dégradation d'herbicide par des techniques séparatives telles que : la chromatographie liquide ou gaz (HPLC ou CPG), la spectrophotométrie de masse (MS), ...etc.

Références

bibliographiques

Bibliographie

Abrous O., Kesri-Benhassaine G., Trémolières A. et Mazliak P. (1998) - Effect of norfuron on lipid metabolism in soya seedlings. *Phytochemistry*. **29**, (4): 979-985.

Abou-Waly H., Abou-Setta M.M., Nigg H.N. et Mallory L.L. (1991) - Dose-response relationship of *Anabaena flosaquae* and *Selenastrum capricornutum* to atrazine and hexazinone using chlorophyll (a) content and ¹⁴C uptake. *Aquat. toxicol.* **20**: 195-204.

Allen E.K. et Allen O.N. (1950) - Biochemical and Physiological properties of the *Rhizobia*. *Bacteriol. Rev.* **14**: 173-330.

Baudoin J.P. (2001) - Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **4**: 221– 230.

Ben-Azziz A. et Koren E. (1974) - Interference in carotenogenesis as a mechanism of action of the pyridazine herbicide Sandoz 6706, *plant physiol*, **54**: 916-920.

Benhizia Y., Goudjil H., Benguedouar A., Rosella M., Giacomini A. et Squartini A. (2004)- Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *System Appl Microbial.* **27**:462-468.

Bewley J.D. et Black M. (1994) - Seeds: Physiology of development and germination, Plenum Press, New York.

Binet P. (1989) - Métabolisme et adaptation des végétaux supérieurs aux contraintes hydriques, thermiques et salines. *Bull. Ecol*, **20** (1): 41- 49.

Bliefert C. et Perraud R. (2001)- Chimie de l'environnement Air-Eau-Sols, déchets. Edition, Paris . Bruxelles : De Boeck université. **21**: 343-350.

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

Brewin N.J. (1991) - Development of the legume root nodule. *Annual. Rev. Cell. Biol.* **7**:191-226.

Broughton W.J., Jabbouri S. et Perret X. (2000) - Keys to Symbiotic Harmony. *Journal of Bacteriology.* **182** (20): 5641-56525.

Chen W.X., Yan G.H. et Li J.L. (1988) - Numerical taxonomic study of fast – growing Soybean *Rhizobia* and proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium*. *gen.nov.Int.J.Sy.Bacterial* . **38**: 392-397.

Christopher J.T. et Holtum J.A.M. (2000) - Dicotyledons lacking the multisubunit form of the herbicide target enzyme acetyl coenzyme A carboxylase may be restricted to the family

Geraniaceae. *Austral. J. plant. Physiol.* **9**: 845 – 850.

Cronk Q., Ojeda I. et Pennington R.T. (2006) - Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Current Opinion in plant biology.* **9**: 99-103.

Coleman J., Blake-Kalff M. et Davies E. (1997) - Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.* **2**: 144.

Colin F. (2000) - Approche spatiales de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires cas de l'atrazine dans le bassin versant du sousson. *GERS.* France. Thèse de doctorat de l'ENGREF. Montpellier. France. **1**: 6-10.

Coulibaly H. (2005) - Le SCV (Semis direct sous Couverture Végétale), un élément stratégique de gestion durable des terres agricoles : une expérience française comme base de réflexion pour le Mali. Mémoire DEPA. France. **2** :13-20.

Davet P. (1996) - Vie microbienne du sol et production végétale. Edition INRA, Paris. France. 145- 161.

Davis 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.

Day D.A., Poole P.S., Tyerman S.D. et Rosendahl L. (2001) - Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cell. Mol. Life. Sci.* **58**: 61-71.

Debellé F., Moulin L., Mangin B., Dénarié J. et Boivin C. (2001) - nod Genes and Nod signals and the evolution of the Rhizobium legume symbiosis. *Acta Biochimia Polonia Mini rev.* **48** (2): 359-365.

De Faria I., Lewis GP., Sprent JI. et Sutherland JM. (1989) - Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol* : 607-619.

Deléglise A. (2001)- Vers une diminution de l'utilisation d'engrais azoté? Québec science.

Dénarié J. (2004)- Des symbioses d'une grande importance écologique et agronomique. La lettre n° 11 de l'Académie des sciences.

Duhoux E. et Nicole M. (2004)- Biologie végétale. Associations et interaction chez les plantes : 1-20 Edition DUNOD. Paris. France.

Ducruet J.M. (1991)- Les herbicides inhibiteurs du photosystème II. In « Les herbicides, mode d'action et principes d'utilisation», INRA [Ed.], sous la direction de R. Scalla : 79-114.

Duke S.O. (1990) - Overview of herbicid mechanisms action. Environmental health perspectives. **87**: 263-271.

- Edwards R., Dixon D. P., Sies H. et Lester P. (2005)** - Plant Glutathione Transferases. In *Methods in Enzymology. Academic Press.* 401 p.
- El Dib M.A., Shehata S.A. et Abou- Waly H.F. (1989)** - Response of freshwater alga *Scenedesmus* to triazine herbicides. *Water, Air, And Soil Pollut.* **48**: 307-316.
- El-Hilali I. (2006)** - La symbiose Rhizobium-Lupin : Biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de doctorat, Université Mohammed V, Rabat, Maroc.
- Ertli T., Marton A. et Földényi R. (2004)** - Effect of pH and the role of organic matter in the adsorption of isoproturon on soils. *Chemosphere.* **57**: 771-779.
- Esseling J.J. (2003)** - Nod Factor-Induced Root Hair Curling: Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application. *Plant Physiology.* **132**: 1982–1988.
- Fdil F. (2004).** Etude de la dégradation des herbicides chlorophénoxyalcanoïques par des procédés photochimique et électrochimique. Applications environnementales. Thèse de doctorat de l'université de Marne-La-Vallée. France. **1**: 8-25.
- Franssen H.J., Vijn I., Yang W.C. et Bisseling T. (1992)** - Developmental aspects of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Molec. Biol.* **19**: 89-107
- Franssen H.J., Vijn I., Yang W.C. et Bisseling T. (1992)** - Developmental aspects of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Biol.* **9**: 99-103.
- Gama A., Dumas Y. et Frochot H. (2006)** - utilisation des herbicides en foret et gestion durable. *Nature.* **320**: 33-34.
- Gremion F. (2003)** - Analysis of microbial community structures and functions in heavy metal-contaminated soils using molecular methods. Thèse de doctorat. Lausanne, EPFL.
- Gresshoff P.M. (2003)** - Post-genomic insights into plant nodulation symbioses. *Genome boil.* **4** (1): 1- 201.
- Havaux L. (1988)** - Sélection de variété de blé dur (*Triticum durum Desf*) et de blé tendre (*Triticum aestivum. L*) adaptées à la sécheresse par la mesure de l'extinction de la chlorophylle. *Agronomic,* **8** (3):193-199.
- Hilton J.L., st. John J.B., Cristiansen M.N. et Norris K.H. (1971)** - Interaction of lipidalmaterials and a pyridazinoine inhibitor of chloroplast development. *plant physiol.* **48**: 171-177.
- Holden M. (1975)** - Chlorophylls I, chemistry and biochemistry of plant pigments. Goodwin T. W. Eds., *Academic press.* New York. **2**: 1-37

- Hopkins W.G. (2003)** - Physiologie végétale. Edition de boeck. Université des Sciences et Technologie. Lille. France. **2**: 99-119.
- Howard J.B. et Rees D.C. (2000)** - Structure of the nitrogenase protein components. In Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. Triplett, EW (ed) Horizon Scientific
- Krapovickas A. et Gregory W.C. (1994)** - Taxonomia del genero *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* **8**, (1-4): 1-186
- Laaks O. K., Sillivan J.H. et Huttunen S. (2000)** - The effect of UV- Bradiation on epidermal anatomy in loblolly pine (*Pinus teada* L.) and scots pine (*Pinus Sylvestris* L.) *Plant cell and Environment*. **23**: 461-472.
- Lancelle S. A. et Torrey J.G. (1985)** - Early development of Rhizobium-induced root nodules of *Parasponia rigida*. II Nodule morphogenesis and symbiotic development. *Can J Bot*. **63**: 25-35.
- Leclerc H., Gaillard J.L. et Simonet. (1995)** - Microbiologie générale: la bactérie et le monde bactérien. *doïn editeurs* : 412-415.
- Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Prome J.C. et Denarié J. (1990)** - Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*. **344**: 781-784.
- Lewis G., Schrire B., Mackinder B. et Lack M. (2005)** - *legumes of the world*. Editor. Royal Botanical Gardens, Kew, Richmond, Surrey, U.K.
- Leyral G. et Vierling E. (2007)** - microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. 276 p.
- Madigan M. et Martink J. (2007)** - Brock Biologie des microorganismes. *Edition Person Education*. France.**11**: 599-601, 676-681.
- Majumbdar K. et Singh N. (2007)** - Effect of soil amendments on sorption and mobility of metribuzin in soils. *Chemosphere*. **66**: 630-637
- Marschner H. (1995)** - Mineral Nutrition of Higher Plants, Second Edition. *Academic press*. 889 p.
- Mateos P.F., Baker D.L., Petersen N., Velezquez E., Jimenez-Zurdo J.I., Martinez-Malina E., Squartini A., Orgambide G., Hubbell D.H. et Dazzo F.B. (2001)** - Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharides degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Can. J. Microbiol*. **47**: 475-487.
- Monchy S. (2007)** - Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH34.Thèse de doctorat. Université Libre Bruxelles.

- Moreland D. E. et Hill K.L. (1962)** - Interference of herbicides with the Hill reaction of isolated chloroplasts. *Ann. Rev. Plant physiol.* **10**: 229-236.
- Moreland D.E. (1967)** - Mechanisms of action of herbicides. *Ann. rev. Plant Physiol.* **18**: 365-386.
- Moulin L., Munive A., Dreyfus B et Boivin-Masson C. (2001)** -Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of proteobacteria. *Nature.* **411**: 948-950.
- Ngom A., Nakagawa Y., Sawada H., Tsukahara J., Wakabayashi S., Uchiumi T., Nuntagij A., Kotepong S., Suzuki A., Higashi S. et Abe M. (2004)** - a novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobacterium* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *J. gen. Appl. Microbiol.* **50**: 17-27.
- N'zoué A., Domergue O., Moulin L., Avarre J.C. et de Lajudie P. (2006)** – Tropical Legume Nodulating Bacteria. *Plant Mol. Bio.* 105-141.
- Özğür K. (2010)** –Etude du mode d'action et du devenir des herbicides. Thèse de Doctorat. Université de Grenoble.France.18p.
- Öztetik E. (2008)** - A Tale of Plant Glutathione S-Transferases: Since 1970. *Bot Rev.* **74**: 419.
- Pawłowski K. et Bisseling T. (1996)** - Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features? *Plant Cell.* **8**: 1899-1913.
- Pelletier F. (1992)** - Impact de différentes pratiques culturales sur la persistance de l'herbicide atrazine et sur la biomasse microbienne du sol. Mémoire INRS- Québec.
- Pelmont J. (1995)** - Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Office des Publications Universitaires. **2**: 541-572.
- Perret X., Staehelin C. et Broughton W.J. (2000)** - Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol Biol. Rev.* **64**: 180-201.
- Polhill R. M. et Raven P.H. (1981)** - Advances in legume systematics. Royal Botanic Gardens, Kew, England.
- Pollet A. (1982b)** - Quelques réflexions sur le développement actuel au Sénégal des légumineuses à graines cultivées (soja, niébé et arachide). Rapport de mission. 21p.
- Quézel P., et Santa S. (1963)** - Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS. Paris.
- Rao D.L.N., Giller K.F., Yeo A.R. et Flower T.J. (2002)** - The effects of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Annals of Botany.* **89**: 563-570.

- Raven., Evert. et Eichhorn. (2007)** - Biologie végétale. Edition: 2. Publié par De boeck Université. Paris. France. 653 - 660.
- Richter G. (1993)** - Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. Edition presse polytechniques et universitaires romandes. **526** : 341-352.
- Roose E. (1994)** – introduction à la gestion conservatoire de l'eau, de la biomasse et de la fertilité des sols (GCES). Bulletin Pédologique FAO. Rome. **70**: 420 p.
- Rubio L.M. et Ludden P.W. (2005)** - Maturation of nitrogenase: *a biochemical puzzle*.
- Sandmann G. (2009)** - Evolution of carotene desaturation: The complication of a simple pathway. *Arch Biochem Biophys*. **2**: 169- 483
- Sandmann G., Römer S. et Fraser P. D. (2006)** - Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metabolic Engineering*. **4**: 8-291.
- Scalla R. (1991)** - Les herbicides : mode d'action et principe d'utilisation .*chap.IV*. mecanisme d'action phytotoxique des autres familles d'herbicides. INRA. Paris
- Severin F. et Tissut M. (1991)**. Principe de l'utilisation des pesticides. *In* : « Les herbicides, mode d'action et principes d'utilisation », INRA [Ed.], sous la direction de R. Scalla, 281-332.
- Siminszky B. (2006)** -Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. *Phytochem Rev*. **5**: 445.
- Soltis D.E., Soltis P.S., Morgan D.R., Swensen S.M., Mullin B.C., Dowd J.M., et Martin P.G. (1995)** - Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc Natl, Acad Sci, USA*. **92**: 2647-2651.
- Somasegaran P. et Hoben H.J. (1994)** - Handbook for Rhizobia :Methods in legume-Rhizobia technology. *Springer*. New York. 450 p.
- St John J. B. et Hilton J.L. (1976)** - Structure versus activity of substituted pyridazinones as related to mechanism of action, *Weed Sci*, **24**: 579-582.
- Tirichine L., De Billy F. et Huguet T. (2000)** - A gene conditioning Sinorhizobium strainspecific nitrogen fixation in *Medicago truncatula* L. *Plant Physiol*. **123**: 845-851
- Perrin R. et Scharff J.P. (1997)** - Chimie industrielle. (2nd Eds). Paris. **7** : 873- 897.
- Pflugmacher S., Schröder P. Sandermann H. (2000)** - Taxonomic distribution of plant glutathione S-transferases acting on xenobiotics. *Phytochem*. **54**:267.
- Vasse J., De Billy F., Camut S. et Truchet G. (1990)** - Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol*. **172**: 4295 - 4306.

Vincent J.M. (1970) - A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publishers. Oxford.

Wei G.H., Tan Z.Y., Zhu M.E., Wang E.T., Han S.Z. et Chen W.X. (2003) - Characterization of Rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1575-1583.

Werck-Reichhart D., Hehn A. et Didierjean L. (2000) - Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trend Plant Sci.* **5**: 116.

Wilkins DA. (1957) - A Technique for the Measurement of Lead Tolerance in Plants. *Nature*, **180**: 37-3

Wilkinson R.E. (1989) - EPTC reserved carotenogenic inhibition by norflurazon. *Pesticide. biochim .physiol.* **33**: 257-263.

Zakhia F. et De Lajudie P. (2001) - Taxonomy of Rhizobia. *Agronomie.* **21**:569-576.

Zhang X., Turner S.L., Wu Guo X., Yang H.J., Debellé F., Yang G.P., Dénarié J., Young J.P.W. et Di Li F. (2000) -The Common Nodulation Genes of *Astragalus sinicus* *Rhizobia* Are Conserved despite Chromosomal Diversity Applied and Environmental Microbiology. **66**: 2988- 2995.

Annexes

Annexe1

Pour la culture des bactéries, nous avons utilisé deux milieux : T.S.A et Y.E.M.A.

Composition du milieu T.S.A.

Tryptic Soy Broth	3g
Agar agar	15g
Eau distillée (qsp)	1000ml

Composition du milieu Y.M.A (Vincent, 1970).

Mannitol	10g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ - 7H ₂ O	0.2g
Extrait de levure	0.4g
NaCl	0.1g
Rouge de Congo 1%	10ml
Eau distillée	1000ml

Le pH des deux milieux de culture est ajusté à pH=7 et la stérilisation est assurée par autoclavage à 120 °C pendant 20 min

Annexe 2

Pour l'inoculation des plantules d'arachide, nous avons utilisé le milieu TY.

Tryptone	5g
Extrait de levure	3g
Eau distillée	1000ml

Le pH est ajusté à 7 et la stérilisation est assurée par autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

Annexe 3

Pour la culture d'arachide en conditions hydroponiques, nous avons retenu le milieu minéral de Knop (Knop, 1865) dont la composition est la suivante :

Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	4.33mg
KNO ₃	0.25g
KPO ₄	0.25g
MgSO ₄	0.25g
FeSO ₄ .7H ₂ O	1mg
Eau distillée (qsp)	1000ml

Summary

Biological fixation of nitrogen is the primary mechanism of incorporation of nitrogen in the biosphere; it is to convert dinitrogen to ammonia, available form for plants.

The bacterium-legume symbiosis is one of the largest tracts of this transformation; it may be subject to positive or negative factors.

Our job is to test the effect of two herbicides (norflurazon and prometryn) on growth of seedlings of peanut (*Arachis hypogaea* L.), two bacterial strains involved in the symbiosis (R30, BR12) and the symbiosis itself (bacterium interaction - legume).

Initially, we conducted a morphological and physiological affects the growth of seedlings grown in pots and in hydroponic conditions.

In the second part, a test of inoculation of two strains of Rhizobium (R30, BR12) is performed in the presence of two herbicides to assess the impact on symbiosis.

The results showed that:

- The degree of tolerance in→ plants and bacteria differ not only by the type of herbicide, but also by the doses used.
- The reduced growth and→ development of peanut seedlings in the presence of herbicides is due to physiological disturbances, or morphological, generated by the action of photosynthesis inhibiting herbicides.
 - The seedlings treated with norflurazon present a slowdown in the growth of stems and roots. In addition, a phenomenon of photobleaching occurs and results in depigmentation of seedlings.
 - Seedlings treated with prometryn show a slowdown in the growth of the aerial part and high elongation of roots by cons leaves are small and have a green color.

The inoculation test was positive in the absence of herbicides saw the formation of nodules. This confirms the infectivity of inoculated bacterial strains and specificity of symbiotic relationship.

In the presence of both herbicides at different concentrations (10⁻⁴, 10⁻⁵ and 10⁻⁶ M), the nodulation process is affected, since the seedlings of peanut (*Arachis hypogaea* L.) grown in pots do not present nodule. However a significant stimulation of root growth was observed in the presence of norflurazon, prometryn unlike that causes an inhibition of seedling growth (noted at the aerial part and roots). The same results were observed in hydroponic conditions.

Keywords: Groundnut (*Arachis hypogaea* L.), bacteria, Rhizobium, Bradyrhizobium symbiosis, inoculation, nodulation, herbicide, norflurazon, prometryn.

ملخص

إن تثبيت الازوت من أهم الآليات التي تتبعها النباتات لتحويل ثنائي الازوت N₂ إلى NH₃ حتى تستعمله في نموها. التعايش "بكتيريا - باقوليات" من أهم آليات هذا التحول غير أنها قد تكون معرفة لعوامل مفيدة أو ضارة .

هذه الدراسة تهدف إلى معرفة تأثير الأسمدة (Norflurazon و Prométryne) على نمو الفول السوداني, نمو البكتيريا (R30, Br12) وعلى التعايش نفسه (فول سوداني-بكتيريا) .

أولاً: قمنا بدراسة مورفولوجية و فيزيولوجية ، لنمو نبات الفول السوداني المعالج بالأسمدة.

ثانياً: قمنا بتطبيق الأسمدة على سلالات من نوع (R30, Br12) المكونة للعقد الجذرية على جذور نبات الفول السوداني النتائج المتحصل عليها أظهرت أن:

- درجة تحمل النباتات و البكتيريا لا تختلف حسب نوع الأسمدة فقط لكن بالتركيز المستعملة أيضاً.
- انخفاض نمو و تطور نباتات الفول السوداني في وجود الأسمدة يعود إلى اضطرابات فيزيولوجية و مورفولوجية ناتجة عن تخريب الأسمدة لعملية التركيب الضوئي.
- النباتات المعالجة بال Norflurazon أظهرت من جهة انخفاضاً في نمو السيقان و الجذور و من جهة أخرى بياض النبات.

- النباتات المعالجة بال Prométryne بينت أيضاً انخفاضاً في نمو السيقان و الأوراق بينما نمو الجذور زاد

* ظاهرة التعايش أظهرت نتائج ايجابية في غياب الأسمدة نظراً لظهور العقد الجذرية, دليل على ان بكتيريا (R30, Br12) قادرة على تثبيت الازوت و خاصة بالتعايش مع الفول السوداني إما في وجود الأسمدة و باختلاف التراكيز: (10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ M)

لم نلاحظ تشكل العقد الجذرية بالمقابل نلاحظ نمو هام للجذور في وجود Norflurazon وعدم نمو النباتات المعالجة بال Prométryne

الكلمات المفتاحية : الفول السوداني , بكتيريا , تعايش , العقد الجذري, أسمدة Prométryne, Norflurazon