

**UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
HOUARI BOUMEDIENNE
(USTHB/ALGER)**

FACULTÉ DES SCIENCES BIOLOGIQUES

THÈSE

**Présentée pour l'obtention du diplôme de :
Magister en Sciences Biologiques**

Spécialité : *Ecobiologie et Amélioration Végétale*

Par :

Nassima LASSOUANE

SUJET

***Régulation du métabolisme des substances phénoliques chez
le soja (*Glycine max L.*) : Effet de l'obscurité et d'un
herbicide (le norflurazon).***

Soutenue publiquement le *06 Juillet 2004* devant le jury composé de :

Mme BOUGUEDOURA N.	Professeur (FSB/USTHB)	Président
Mlle AID F.	Professeur (FSB/USTHB)	Directeur de thèse
Mme BELKEBIR A.	Chargée de cours (FSB/USTHB)	Examineur
Mme HOUMANI Z.	Maître de conférences (Univ. Blida)	Examineur
Mme GACEB R.	Chargée de cours (FSB/USTHB)	Examineur

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Physiologie Végétale de la Faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB, sous la direction de Mlle AID Fatiha, Professeur à l'USTHB. Je tiens à lui exprimer l'hommage de mon profond respect pour son soutien incessant, sa disponibilité et pour ces précieux conseils et ses encouragements tout au long de ce travail.

Je présente mes sincères remerciements à Mme BELKEBIR A, Chargée de cours à l'USTHB, pour m'avoir suggéré le sujet et pour avoir eu l'extrême gentillesse de suivre la réalisation de ce travail, pour ces précieux conseils, ces orientations et ces encouragements.

Je remercie vivement Mme BOUGUEDOURA N, Professeur à l'USTHB pour l'honneur qu'elle me fait en présidant les membres de jury et surtout pour la chance qu'elle nous a donné en ouvrant la post-graduation ; et pour qui j'ai beaucoup d'estime et de considération.

J'exprime également mes vifs remerciements à Mme HOUMANI Z, Maître de conférence à l'université de Blida, qui me fait l'honneur d'être membre de jury et d'examiner ce travail.

Mes profonds remerciements s'adressent à Mme GACEB R, Chargée de cours à l'USTHB, pour qui j'ai beaucoup de respect et de considération, et pour l'honneur qu'elle me fait de faire partie du jury pour la deuxième fois.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à toute l'équipe du Laboratoire de Physiologie Végétale. Je cite mesdames : Abrous O., Abdelkrim F., Brahim L et Mlles Zegaoui Z., Boulahia K ainsi que messieurs : Djebbar R., Taibi M pour leurs encouragements et leur sympathique compagnie.

Que toutes les personnes omises involontairement trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements.

Dédicace

En signe de respect, de reconnaissance et d'amour, je dédie ce modeste travail :

A mon père et ma mère, qui demeurent les deux personnes au monde qui me sont très chères, pour leur patience et sacrifices durant toutes mes années d'études.

A ma sœur Fatiha pour son soutien permanent et surtout pour son aide précieuse pour la réalisation de ce manuscrit.

A mes sœurs Mounia et Yasmine et mon cher frère Nadjib pour leur précieuse affection, et leurs encouragements incessants.

A souhila berka pour son soutien moral, son aide et son amitié, je la remercie profondément.

A mes amis Nedjma, Dinar, Lamia, Zahra, Ali pour leurs encouragements et pour les meilleurs instants qu'on a passé ensemble.

A mes amis d'études Souhila Benlalli et Hanane pour leur amitié et leur disponibilité.

A mes amis et collègues en post-graduation ; Hafida, Nada, Samia et Yasmina pour leur amitié et surtout pour les bons moments passés en leur compagnie.

Que cette thèse soit le symbole de mon amour à tout ceux qui m'aime.

Résumé

Les plantules de *Glycine max* L sont soumises à deux stress différents : absence de lumière et application d'un herbicide appartenant à la famille des pyridazinones, le norflurazon (4-chloro-5(méthylamino)-2-[3-(trifluorométhyl)phényl]-3(2H) pyridazinone).

L'application des deux stress provoque des réponses aussi bien au niveau de la morphologie que de la physiologie des plantules.

L'obscurité provoque l'étiollement des plantules. Le norflurazon à forte concentration (10^{-4} M) réduit la croissance et provoque le blanchissement des plantules ; cette décoloration des feuilles est un effet secondaire conséquence d'une diminution de la quantité des chlorophylles.

Les deux stress entraînent également une diminution de l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), qui a pour conséquence la réduction du pool d'acides cinnamiques. Les acides cinnamiques synthétisés sont orientés vers la biosynthèse des flavonoïdes plutôt que vers celle des acides phénols.

De plus, le norflurazon stimule la synthèse des anthocyanes, et favorise la synthèse des aglycones flavoniques chez les jeunes feuilles, alors que l'obscurité favorise la synthèse des anthocyanes ainsi que celle des aglycones flavoniques chez les feuilles très âgées.

Mots clés : *Phénylalanine ammonia-lyase (PAL), anthocyanes, aglycones flavoniques, acides phénols, chlorophylles, caroténoïdes, norflurazon, obscurité, Glycine max L.*

Summary

The seedlings of *Glycine max* L are subjected to two different stress : absence of light and application of herbicide to belong to the family of the pyridazinone, the norflurazon (4-chloro-5(méthylamino)-2-[3-(trifluorométhyl)phényl]-3(2H) pyridazinone).

The application of the two stress as well causes answers to the level of the morphology and the physiology of the seedlings.

The darkness causes the etiolation of the seedlings. The norflurazon with strong concentration (10^{-4} M) reduced the growth and causes the whitening of the seedlings ; this bleaching of the sheets is a side effect consequence of a reduction in the quantity of chlorophylls.

The two stress also involve a reduction in the activity of the phenylalanine ammonia-lyase (PAL), which has as a consequence the reduction of the pool of cinnamic acids. The synthesized cinnamic acids are directed towards the biosynthesis of the flavonoids rather than towards that of the phenolic acids.

Moreover, the norflurazon stimulates the synthesis of the anthocyanins, and supports the synthesis of the flavonic aglycones at the young sheets, whereas the darkness supports the synthesis of the anthocyanins like that of the flavonic aglycones at the very old sheets.

Key words : *Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), anthocyanins, flavonic aglycones, phenolic acids, chlorophylls, carotenoids, norflurazon, darkness, Glycine max L.*

Sommaire

Sommaire

1 – Introduction	1
2 – Synthèse bibliographique	3
2.1 – Les composés phénoliques	3
2.1.1 – Classification.....	3
2.1.1.1 – Les composés en C ₆ C ₃	3
2.1.1.2 – Les composés en C ₆ C ₁	4
2.1.1.3 – Les composés mixtes en C ₆ C ₃ C ₆	5
– Les flavonoïdes.....	5
– Les isoflavonoïdes.....	8
2.1.2 – Biogenèse des composés phénoliques.....	8
2.1.3 – Biosynthèse des flavonoïdes.....	12
2.1.4 – Relation entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire.....	14
2.1.5 – Phénylpropanoïdes et protection contre le stress.....	16
2.2 – Le soja	19
2.3 – Les herbicides	22
3 – Matériels et méthodes	26
3.1 – Matériel végétal	26
3.2 – Traitements	26
3.3 – Méthodes utilisées	27
3.3.1 – Extraction et dosage des pigments foliaires.....	27

3.3.2 – Extraction et dosage de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL).....	27
3.3.3 – Dosage des protéines.....	28
3.3.4 – Extraction et dosage des flavonoïdes.....	29
3.3.5 – Extraction et dosage des acides phénols.....	31
3.3.6 – Méthode d’analyse statistique.....	32
4 – Résultats et discussions.....	34
4.1 – Effet de l’obscurité et du norflurazon sur la morphologie des plantules de soja.....	34
4.2 – Les pigments chlorophylliens.....	37
4.2.1 – Effet de l’obscurité sur la teneur en pigments chlorophylliens des feuilles des plantules de soja.....	37
4.2.2 – Effet du norflurazon sur la teneur en pigments chlorophylliens des feuilles des plantules de soja.....	38
4.2.3 –Discussion.....	40
4.3 – Effet de l’obscurité et du norflurazon sur le métabolisme phénoliques des feuilles de plantules de soja.....	41
4.3.1 – Etude de l’activité de la phénylalanine ammonia lyase (PAL) des feuilles des plantules de soja.....	42
4.3.1.1 – Effet de l’obscurité sur l’activité de la PAL des feuilles des plantules de soja.....	42
4.3.1.2 – Effet du norflurazon sur l’activité de la PAL des feuilles des plantules de soja.....	42
4.3.1.3 – Discussion.....	43
4.3.2 – Effet de l’obscurité et du norflurazon sur les composés phénoliques des feuilles des plantules de soja.....	44

4.3.2.1 – Les anthocyanes.....	44
4.3.2.1.1 – Effet de l’obscurité sur la teneur en anthocyanes des feuilles des plantules de soja.....	45
4.3.2.1.2 – Effet du norflurazon sur la teneur en anthocyanes des feuilles des plantules de soja.....	46
4.3.2.1.3 – Discussion.....	46
4.3.2.2 – Les aglycones flavoniques.....	48
4.3.2.2.1 – Effet de l’obscurité sur la teneur en aglycones flavoniques des feuilles des plantules de soja.....	48
4.3.2.2.2 – Effet du norflurazon sur la teneur en aglycones flavoniques des feuilles des plantules de soja.....	49
4.3.2.2.3 – Discussion.....	50
4.3.2.3 – Les acides phénols.....	51
4.3.2.3.1 – Effet de l’obscurité sur la teneur en acides phénols des feuilles des plantules de soja.....	51
4.3.2.3.2 – Effet du norflurazon sur la teneur en acides phénols des feuilles des plantules de soja.....	52
4.3.2.3.3 – Discussion.....	53
5 – Discussion et conclusion générales.....	55
6 – Références bibliographiques.....	61

Liste des figures

Liste des tableaux et des photographies

Abréviations

Abréviations

%	: Pourcentage.
°C	: Degré Celsius.
µg	: Microgramme.
µl	: Microlitre.
3-PGA	: 3-Phosphoglycérate.
ADN	: Acide désoxyribonucléique.
ADP	: Adénosine diphosphate.
AG	: Acide gibbérilique.
AIA	: Acide indoyleacétique.
al	: Collaborateur.
ARN	: Acide ribonucléique.
ARNm	: Acide ribonucléique messenger.
ATP	: Adénosine triphosphate.
Chl (a+b)	: Chlorophylles totales.
Chl a	: Chlorophylles <i>a</i> .
Chl b	: Chlorophylles <i>b</i> .
CHS	: Chalcone synthase.
C_{x+c}	: Caroténoïdes totaux.
DFR	: Dihydroflavonol réductase.
DHA-P	: 3-Désoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate.
DOXP	: 1 Désoxy-D-xyllulose 5-phosphate.
DXS	: 1 Désoxy-D-xyllulose 5-phosphate synthase.
E4P	: Erythrose-4 phosphate.
Fig	: Figure.
g	: Gramme.
G3P	: Glyceraldehyde-3-phosphate.
INPV	: Institut National de la Protection des Végétaux.
j	: Jour.

J/N	: Jour/nuit.
L	: Litre.
M	: Molaire.
mg	: Milligramme.
min	: Minute.
ml	: Millilitre.
MVF	: Matière végétale fraîche.
MVS	: Matière végétale sèche.
N	: Normalité.
NADP⁺	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée).
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite).
nm	: Nanomètre.
Obs	: Obscurité.
PAL	: Phénylalanine ammonia-lyase.
PEP	: Phosphoenolpyruvate.
P_i	: Phosphate inorganique
SAB	: Sérum albumine bovine.
T	: Témoin.
trs	: Tours.
UV	: Ultraviolet.
λ	: Longueur d'onde.

Introduction

1 - Introduction

Les interactions plante-environnement mettent en jeu de nombreux métabolites dits secondaires qui illustrent bien les formidables capacités de synthèse de la véritable usine chimique que constitue la plante. Ces composés ont été regroupés dans la catégorie des métabolites dits secondaires, d'une part, parce qu'ils dérivent des métabolites primaires mais aussi parce qu'ils ne sont pas nécessaires au fonctionnement de base de la cellule ; ces produits ont été pendant longtemps considérés comme composés métaboliques inactifs, parfois assimilés à des produits de déchets ou d'excrétion.

Les travaux de ces trois dernières décennies contribuent à démontrer que ces molécules, au-delà d'un intérêt industriel, sont actuellement reconnues comme métabolites ayant une grande importance dans les processus biochimique et physiologique des plantes ; par ailleurs, ils sont étroitement impliqués dans les interactions plante-environnement (Harborne, 1988 ; Rosenthal et Berenbaum, 1991). Ils sont le fruit de l'évolution qui a mis en place des chaînes de réactions enzymatiques nouvelles et complexes qui résultent souvent de phénomène de coévolution entre la plante, les autres organismes et son environnement (Benveniste et *al.*, 2000).

Les composés phénoliques appartiennent à une des familles chimiques représentatives des produits du métabolisme secondaire ; ce sont des molécules spécifiques du règne végétal et microbien. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées. Ce sont des dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont principalement issus de la voie du shikimate et/ou de celui des polyacétates (Bruneton, 1993).

Les plantes pilotent leur développement en réponse aux signaux environnementaux et cette « plasticité phénotypique » est une caractéristique fondamentale du règne végétal. Les contraintes de l'environnement ou stress auxquels sont soumises les plantes peuvent être groupées en quelques grands types : sécheresse (stress hydrique), carence en éléments nutritifs, abondance de substances chimiques, contraintes mécaniques, éclaircissement excessif ou insuffisant, températures trop basses ou trop élevées...etc. Les plantes manifestent une capacité remarquable à percevoir les paramètres physico-chimiques de l'environnement et peuvent déclencher des spectres parfois très complexes de réponses moléculaires, métaboliques et morphogénétiques ; parmi ces derniers les modifications du métabolisme des composés phénoliques soit par stimulation ou par inhibition de la synthèse de ces composés.

La cellule végétale, autotrophe vis-à-vis du carbone, a su définir diverses stratégies pour s'adapter à son environnement. Certaines de ces stratégies se basant sur la synthèse de métabolites, reposent sur des phénomènes d'attraction, de répulsion, d'inhibition de croissance de partenaires parasites ou prédateurs ; elles peuvent également intervenir dans l'adaptation aux paramètres physiques de l'environnement. Les plantes semblent ainsi avoir mis en place des modalités adaptatives, le plus souvent efficaces.

Etant donné l'extrême diversité chimique des molécules mises en jeu, il est envisageable que certaines espèces végétales phyllogénétiquement proches aient développé des solutions différentes pour résoudre un problème identique.

Parmi les nombreux travaux effectués à ce jour sur le mode d'action des herbicides, beaucoup portent sur la photosynthèse, mécanisme spécifique des végétaux ; or il existe d'autres processus biochimiques propres aux plantes telle que la synthèse des composés phénoliques dont l'étude mériterait d'être approfondie. A ce titre, leur étude devrait donc être particulièrement intéressante, car si les différentes étapes de la biogenèse des substances phénoliques sont complètement élucidées, malheureusement nos connaissances sur le rôle qu'elles jouent dans la vie des plantes sont souvent très réduites et peu connues.

De plus, la régulation de la biosynthèse des composés phénoliques est très complexe et certainement différente d'une espèce à une autre.

De nombreux facteurs interviennent dans la régulation des voies de biosynthèse des substances phénoliques, parmi les facteurs les plus importants, nous pouvons citer :

- ❖ Les facteurs abiotiques (température, salinité, stress hydrique, lumière UV...etc).
- ❖ Les traumatismes.
- ❖ Les infections parasitaires, bactériennes, fongiques ou virales.

Dans ce contexte il nous a semblé intéressant d'étudier la régulation du métabolisme des substances phénoliques par deux stress qui sont l'obscurité et le norflurazon, herbicide appartenant à la famille des pyridazinones, sur une légumineuse le soja [*Glycine max* L.]. Le soja a fait l'objet de plusieurs études dans notre laboratoire depuis de nombreuses années. Plusieurs enzymes catalysent les différentes réactions du métabolisme des substances phénoliques. Nous avons choisi la Phénylalanine ammonia-lyase (PAL), enzyme clé du métabolisme des substances aromatiques. Elle est responsable de la transformation de la phénylalanine en acide cinnamique, précurseur de la biosynthèse des composés phénoliques.

L'objectif de notre étude est d'établir l'effet de l'obscurité et du norflurazon sur :

- ❖ La morphologie de la plante.
- ❖ La quantité de pigments chlorophylliens (chlorophylles *a* et *b*, caroténoïdes).
- ❖ Le métabolisme des composés phénoliques en étudiant :
 - L'activité de la PAL.
 - La quantité de flavonoïdes (anthocyanes et aglycones flavoniques).
 - La quantité d'acides phénols.

Synthèse

bibliographique

2.1 - Les composés phénoliques

Les tissus végétaux contiennent une grande variété de substances à fonction phénol qui sont groupées sous le terme de composés phénoliques, polyphénols ou les dérivés phénylpropanes. Ce sont des groupes chimiquement hétérogènes, parmi les monomères (tels que les phénylpropanes et les acides phénols) certains sont solubles uniquement dans les solvants organiques (aglycones flavoniques, acides phénols,...), d'autres sont solubles dans l'eau (anthocyanes...). Les polymères tels que les tanins et la lignine sont insolubles (Taiz et Zeiger, 1998).

Les composés de ce groupe important de métabolites secondaires contiennent exclusivement du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène. Ils possèdent en commun un noyau aromatique, portant un ou plusieurs substituants hydroxylés. Souvent, les composés phénoliques se présentent liés à des oses surtout lorsqu'ils sont en solution dans le suc vacuolaire (Ribereau-Gayon, 1968). Leur structure de base est le

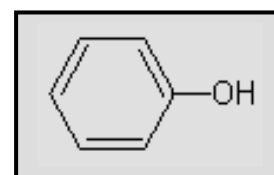


Figure 1. Structure de base des composés phénoliques

2.1.1 – Classification.

Les composés phénoliques les plus largement répandus sont regroupés en trois classes.

2.1.1.1 – Les composés en C_6C_3 (phénylpropanoïdes).

Se sont des composés à noyau aromatique simple comportant une chaîne latérale à trois atomes de carbone, la structure de base est représentée dans la figure 2. De nombreux dérivés se forment à partir de l'acide cinnamique grâce à des substitutions du cycle aromatique. Ces dérivés de type phénylpropane ou acides phénolcarboxyliques (acides cinnamiques) sont à l'origine de la synthèse de nombreuses substances, telles que la lignine, les flavonoïdes et les stilbènes (Richter, 1993).

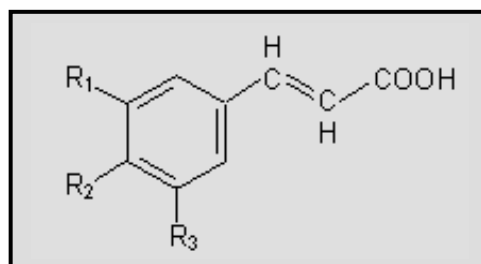


Figure 2. Formule de base des phénylpropanoïdes (composés en C_6C_3).

parmi ces composés nous distinguerons :

- Les **acides cinnamiques** qui sont en général les constituants des essences végétales, substances synthétisées par de nombreuses espèces végétales. Ces composés se distinguent entre eux par :

- Le nombre et la disposition des groupements OH et $-OCH_3$ (Tableau I);

- La présence ou l'absence de la double liaison de la chaîne latérale ;
- La présence de dérivés produits à la suite d'une réduction de la fonction acide.

Tableau I. Structure de certains phénylpropanoïdes.

Composés en C ₆ C ₃	Substitutions		
	R ₁	R ₂	R ₃
<i>Cinnamate</i>	H	H	H
<i>p-coumarate</i>	H	OH	H
<i>Acide cafeïque</i>	OH	OH	H
<i>Acide férulique</i>	OCH ₃	OH	H
<i>Acide sinapique</i>	OCH ₃	OH	OCH ₃
<i>Trihydroxycinnamate</i>	OH	OH	OH

- Les **coumarines** qui proviennent de la cyclisation des acides *ortho*-hydroxycinnamique sont très répandus chez les dicotylédones (Fabales, Asteracées) notamment dans les racines et les écorces. Les **furocoumarines** sont présentes chez de nombreuses Ombellifères et Rutacées ; elles dérivent de l'ombelliférone par condensation avec une unité isoprénique (Guignard, 2000).
- Les **esters d'acide cinnamique** sont largement répandus chez les végétaux. L'acide chlorogénique, dont les propriétés se rapprochent des tanins, est présent dans l'ensemble du règne végétal ; l'acide rosmarinique ou «tanin des Lamiacées» chez le romarin (Guignard, 2000).
- Les **lignanes** sont formés par condensation de deux unités phénylpropanoïdes (C₆C₃), ces composés sont largement réponsus chez les végétaux supérieurs.

Les composés en C₆C₃ sont présents dans divers tissus ; ils participent, chez les graines, aux mécanismes d'inhibition tégumentaire (au moment de la germination, l'oxydation des phénols capte une partie de l'oxygène nécessaire à la reprise de l'activité respiratoire de l'embryon, ce qui retarde la percée de la radicule (exp. Colza,...)) (Guignard, 2000).

2.1.1.2 - Les composés en C₆C₁ (les acides phénols).

Ces composés sont considérés comme des dérivés de l'acide cinnamique, du point de vue structure et biosynthèse. Car ils résultent du raccourcissement par β -oxydation de la chaîne latérale de certains phénylpropanoïdes.

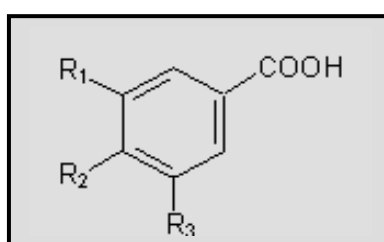


Figure 3. Formule de base des acides phénols (composés en C₆C₁).

Ces substances sont soit hydroxylées et/ou *O*-méthylées (Tableau II). Ce sont des composés à noyau aromatique simple, dont la structure de base est représentée dans la figure 3.

Tableau II. Structure de certains acides phénols (composés en C_6C_1).

Composés en C_6C_1	Substitutions		
	R_1	R_2	R_3
<i>Benzoate</i>	H	H	H
<i>p</i> -hydroxybenzoate	H	OH	H
Acide protocatéchique	OH	OH	H
Acide vanillique	OCH ₃	OH	H
Acide syringique	OCH ₃	OH	OCH ₃
Acide gallique	OH	OH	OH

Dans les plantes, les dérivés phénoliques ont une action protectrice contre l'attaque des micro-organismes, en particulier en se déposant dans les parois cellulaires (Guignard, 2000).

2.1.1.3 - Composés mixtes en $C_6C_3C_6$.

Les flavonoïdes et les isoflavonoïdes sont des composés caractérisés par un squelette de base à 15 atomes de carbone, constitué de deux cycles benzéniques (A et B) reliés par un chaînon de 3 carbones. Les flavonoïdes sont des composés en $C_6C_3C_6$ dont le noyau B est relié au carbone en position 2 de l'hétérocycle (Fig.4a), alors que chez les isoflavonoïdes, il est attaché à l'hétérocycle au niveau de la position 3 (Fig.4b).

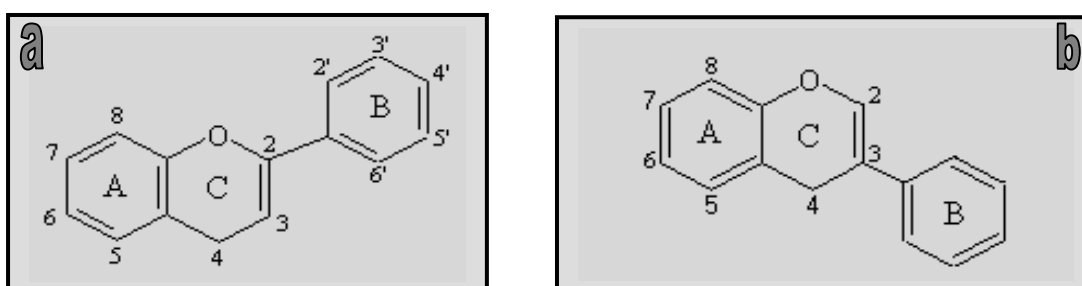


Figure 4. Squelette de base des flavonoïdes (a) et des isoflavonoïdes (b).

❖ Les flavonoïdes.

Les flavonoïdes représentent une large classe de composés phénoliques très diversifiée ; ce sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux. Ils se trouvent dissous dans la vacuole à l'état d'hétéroside ou sont des constituants de plastes particuliers : les chromoplastes. Les flavonoïdes existent dans la nature sous forme libre ou polymérisée (ce sont les tanins condensés).

Il existe différentes sous classes de flavonoïdes, les composés de chaque sous classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements

hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et sur l'hétérocycle, ainsi que par la présence ou l'absence de la double liaison dans l'hétérocycle. A l'état naturel, très souvent les flavonoïdes sont trouvés sous forme de glycosides, une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées, la partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone. Les flavonoïdes les plus importants sont : les anthocyanes, les flavones et les flavonols.

Les anthocyanes sont des composés en $C_6C_3C_6$ dont l'hétérocycle a une double liaison entre les carbones 3 et 4 et un hydroxyle en position 3. Ce sont des pigments solubles dans l'eau ; et les seules molécules du règne végétal capables de produire une vaste gamme de couleurs, susceptibles de donner des teintes allant du jaune-orange au bleu, en passant par le pourpre et le rouge. Cette aptitude à colorer les fruits et les pétales des fleurs permet aux plantes d'exercer un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant une étape fondamentale de leur reproduction. Une fois la pollinisation réalisée, certaines plantes en modifiant leur composition en flavonoïdes changent de couleur en fonction du pH du milieu pour éviter une seconde rencontre avec leurs pollinisateurs qui leur serait néfaste (Winkel-Shirley, 2002).

Les pro-anthocyanes sont prédominantes dans le suc vacuolaire. Dans les cellules vivantes, elles sont composées d'un chromophore «anthocyanidine» et d'un ou plusieurs sucres (Fig.5).

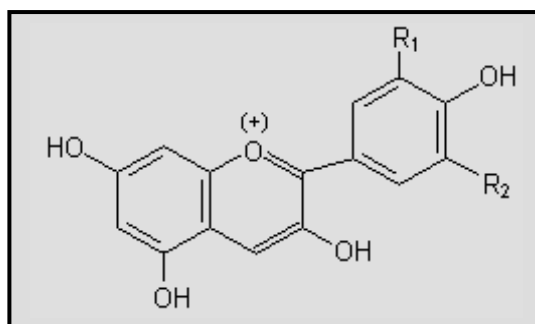


Figure 5. structure de base des anthocyanidines

Près de 17 anthocyanidines sont trouvés dans la nature. Les plus importantes sont décrites dans le tableau III.

Tableau III. Structure des anthocyanidines les plus répandus.

Anthocyanidines	Substitutions		Couleurs
	R ₁	R ₂	
<i>Cyanidine</i>	OH	H	<i>Bleu – rouge</i>
<i>Pelargonidine</i>	H	H	<i>Orange – rouge</i>
<i>Delphinidine</i>	OH	OH	<i>Violet – bleuté</i>
<i>Peonidine</i>	OCH ₃	H	<i>Rose – rouge</i>
<i>Malvidine</i>	OCH ₃	OCH ₃	<i>Violet</i>
<i>Pétunidine</i>	OCH ₃	OH	<i>Violet</i>

Les feuilles des Gymnospermes (Camm *et al.*, 1993 ; Krol *et al.*, 1995) et des Angiospermes (Tignor *et al.*, 1997 ; Bongue-Bartelsman et Phillips, 1995 ; Woodall et Stewart, 1998) accumulent les anthocyanes dans leurs tissus. Ces anthocyanes se rencontrent non seulement dans les fleurs et les fruits, mais aussi dans les tiges, souvent à l'état d'hétéroside (Deysson, 1982). Elles peuvent être localisées dans les racines, par exemple de *Impatiens glandulifera* (Mumford, 1990). De plus, les anthocyanes sont généralement accumulées dans les vacuoles des tissus périphériques exposés à une lumière directe, tel que l'épiderme supérieur des feuilles (Mc Clure, 1975 ; Chalker-Scott, 1999), elles sont aussi accumulées au niveau du mésophylle (Mc Clure, 1975).

Puisque les anthocyanes s'accumulent dans la vacuole des cellules les plus externes (épiderme, hypoderme) ce qui les rend visibles et surtout, en raison de leur absorption dans l'UV, explique leur rôle d'écran vis à vis de ce rayonnement, dont 95% à 99% peuvent être absorbés.

Les flavones et flavonols présentent des structures en $C_6C_3C_6$. Ils comportent une double liaison en position 2 et 3 de l'hétérocycle, et une fonction cétone en position 4. Formellement, les flavonols sont des dérivés des flavones par addition d'un nouveau groupe hydroxyle en position 3 (Ribereau-Gayon, 1968) (Fig.6a,b). Ce sont des substances phénoliques incolores qui interagissent avec des anthocyanes pour intervenir dans la co-pigmentation des fleurs et fruits (Brouillard *et al.*, 1997). Ce sont des pigments sous forme libre, généralement lipophiles. Ils sont présents dans les fleurs, et également dans les feuilles chlorophylliennes. Généralement, ces flavonoïdes absorbent la lumière à des longueurs d'ondes plus courtes (région UV-B du spectre) que les anthocyanes (Taiz et Zeiger, 1998).

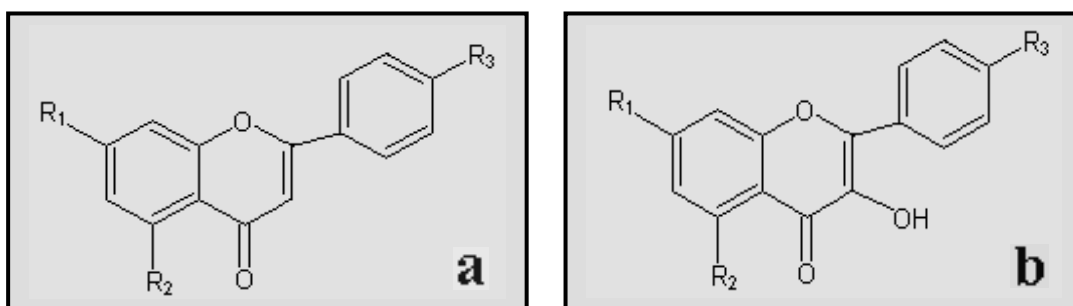


Figure 6. structure de base des flavones (a) et flavonols (b).

Ces composés s'accumulent souvent dans les couches épidermiques des feuilles et des tiges. Ces composés protègent les tissus sous-jacents des feuilles contre les radiations UV.

Par ailleurs, les flavonols présentent des propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes, en interagissant de manière complexe avec diverses hormones de croissance. Ainsi le kaempferol et la quercétine sont des représentants caractéristiques, sous forme d'aglycones des flavonols, ils sont impliqués dans la régulation par la lumière, de la croissance des jeunes pousses chez le petit pois (Hopkins, 1999).

Le kaempferol inhibe la croissance des plantes par stimulation de l'activité de l'auxine oxydase. Cet effet est neutralisé par la quercétine qui exerce un rôle totalement opposé, car elle stimule la synthèse de l'auxine (Hopkins, 1999).

Les flavones et les flavonols interviennent aussi, en tant que signaux dans l'établissement des symbioses entre les bactéries du genre *Rhizobium* et les légumineuses.

❖ Les isoflavonoïdes.

Les isoflavonoïdes sont des composés en C₆C₃C₆, existant principalement chez les légumineuses et sont connus par leurs rôles anti-microbiens (Fig.4b).

La classe des isoflavonoïdes a fait l'objet de nombreuses études, ses dernières années. Le rôle naturel des isoflavonoïdes est dans l'établissement des symbioses entre les bactéries du genre *Rhizobium* et les légumineuses. Ces composés sont exsudés par la plante, induisant l'expression du gène *nod* responsable de la nodulation chez les légumineuses (Van Rhijn et Vanderleyden, 1995 ; Pueppke, 1996).

Ces composés fonctionnent aussi comme phytoaléxines ; ces dernières sont synthétisées pour défendre la plante contre certains stress (micro-organismes infectieux, froid, rayon UV...) (Richter, 1993). L'isoflavone « daidzène » est le précurseur majeur des phytoaléxines incluant médicarpine et glycéolline, lesquels sont produits respectivement chez le médicago et le soja (Blount et al., 1992 ; Graham, 1995).

Une autre isoflavone « genistein » aurait une activité antifongique (Rivera-Vargas et al., 1993), elle est aussi le précurseur d'une phytoaléxine « kievitone » produite par *Phaseolus vulgaris* (Garcia-Arenal et al., 1978).

2.1.2 - Biogenèse des composés phénoliques.

Les composés phénoliques dérivent des grands carrefours métaboliques primaires ou centraux, ces orientations métaboliques secondaires restent par ailleurs toujours réversibles (Bioley et al., 1987). La voie de l'acide shikimique associée à la voie du malonate aboutit à la synthèse des principaux composés phénoliques (Fig.7).

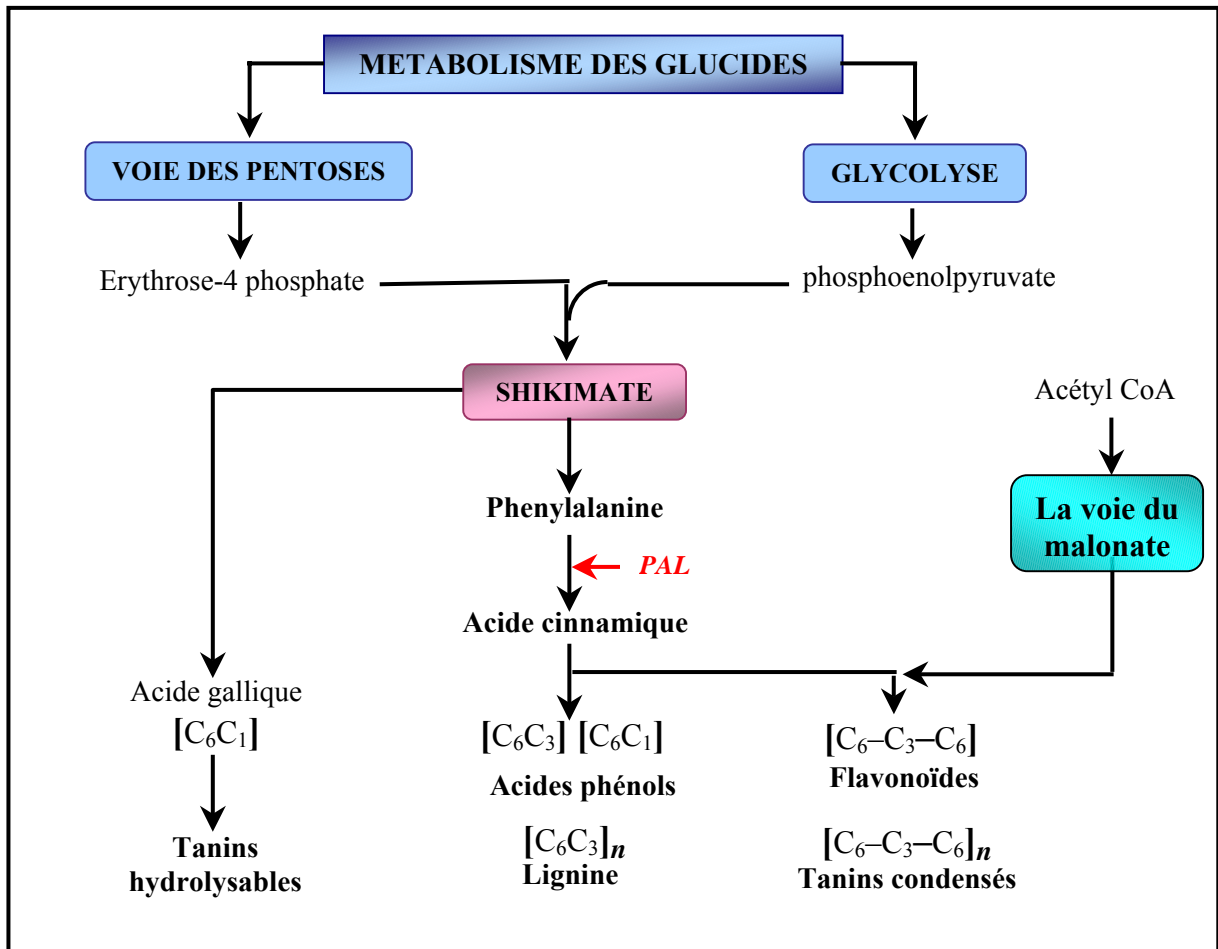


Figure 7. Les différentes voies de biosynthèse des composés phénoliques chez les plantes supérieures (Taiz et Zeiger, 1998).

La formation des composés aromatiques à partir des glucides par l'intermédiaire de l'acide shikimique a été démontrée par Davis (1955).

Cette voie représente le principal mode d'accumulation des phénols dans les plantes (Ribereau-Gayon, 1968). Elle utilise les produits de la glycolyse (PEP) et de la voie des pentoses phosphates (E4P). Elle débute par la condensation du *phosphoenolpyruvate* (PEP) avec l'*erythrose 4-phosphate* qui aboutit après cyclisation à la formation de l'acide shikimique. Le shikimate se condense avec une nouvelle molécule de PEP et permet la formation de l'acide préphénique qui, par décarboxylation et déshydratation, est à l'origine de l'acide phénylpyruvique. La transamination de l'acide phénylpyruvique conduit à la formation de la phénylalanine (Guignard, 1996) (Fig.8).

Cette voie est très importante, non seulement pour la biosynthèse des polyphénols, mais également pour le métabolisme général de la plante, puisqu'elle fournit des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane).

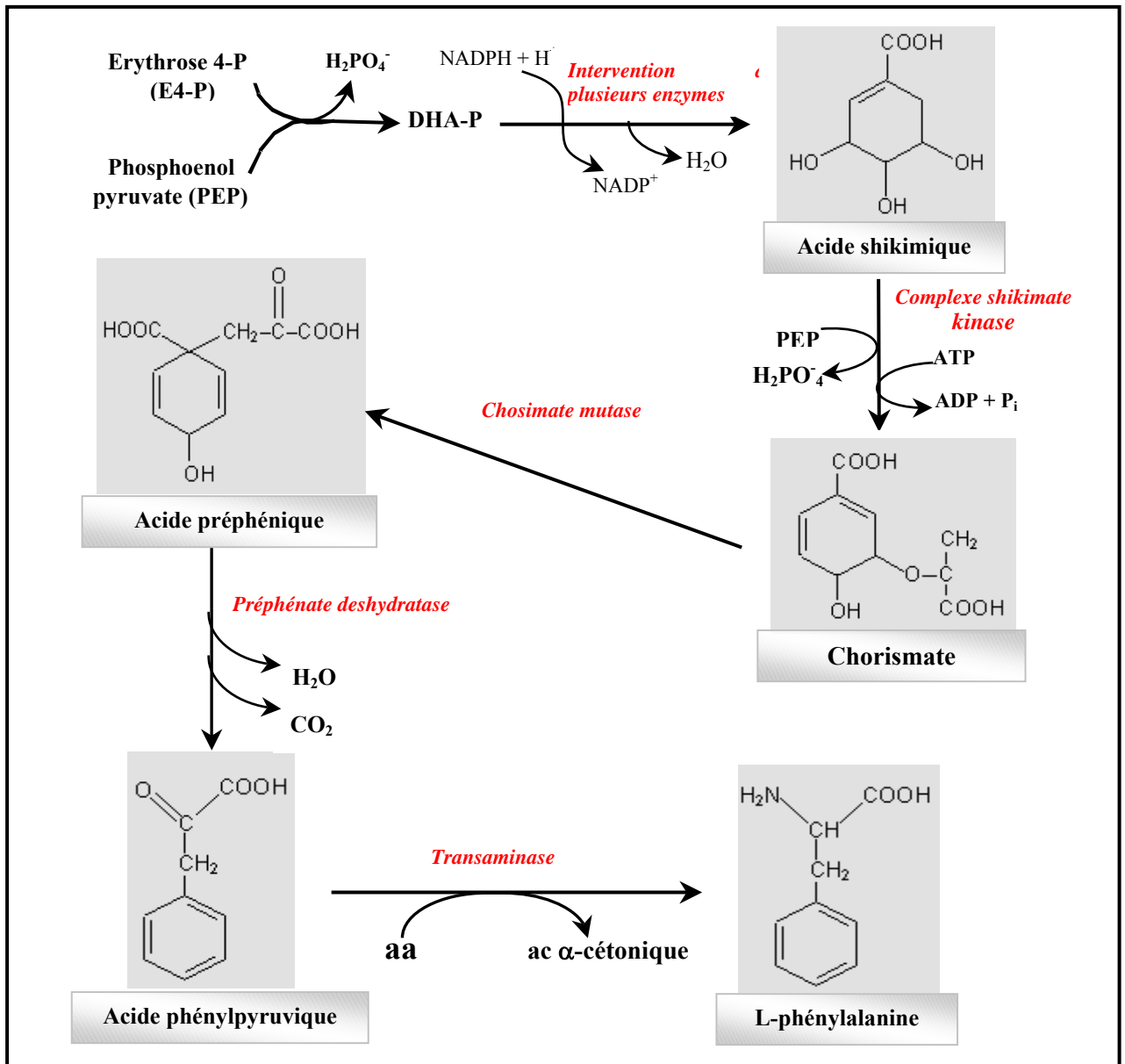


Figure 8. Formation de la phénylalanine par transamination de l'acide phénylpyruvique (Guignard, 1996).

L'articulation entre la voie de l'acide shikimique, et la voie des dérivés de l'acide cinnamique est assurée surtout par la Phénylalanine ammonia-lyase (PAL) (Koukol et Conn, 1961)(Fig.9).

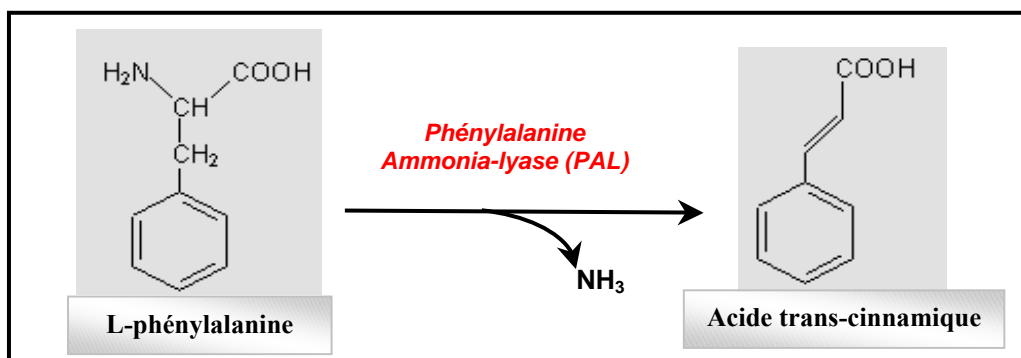


Figure 9. Formation de l'acide trans-cinnamique par désamination de la phénylalanine.

Une étape fondamentale et irréversible de la biosynthèse des phénylpropanoïdes est le passage de la voie de la biosynthèse des acides aminés aromatiques vers celle des acides cinnamiques, « plaque tournante » de la synthèse des composés aromatiques. Cette première étape est catalysée par une enzyme : la phénylalanine ammonia-lyase (PAL). La PAL est la première enzyme du métabolisme des composés aromatiques (Hahlbrock et Schell, 1989 ; Dixon et Paiva, 1995 ; Wehetten et Sederof, 1995 ; Campbell et Sederoff, 1996), elle est présente chez les plantes supérieures et les champignons et absente dans les cellules animales et les bactéries (Guignard, 2000).

En dehors de sa présence importante au niveau de la fraction soluble de la cellule végétale, la phénylalanine ammonia-lyase a été également décrite dans divers organites ou fractions cellulaires : chloroplaste, mitochondrie, péroxysomes, microsomes de différents végétaux (Guignard, 2000). Au niveau d'une seule cellule, il existe plusieurs voies de biosynthèse des substances phénoliques. Stafford (1969) démontre une localisation microsomale de la PAL. Depuis plusieurs années cette enzyme mise en évidence chez de très nombreux végétaux, fait l'objet d'études poussées. La PAL existe sous différentes formes : soit facilement soluble (Koukol et Conn, 1961 ; Durst, 1974), soit partiellement associée (Amrhein et Zink, 1971 ; Alibert *et al.*, 1977) ou intimement liée à des structures membranaires (Czichi et Kindl, 1975).

La PAL est présente sous forme d'isoenzymes multiples, chaque isoenzyme est composée de 4 polypeptides de 75 Kda. Chez plusieurs espèces de plantes, les sous-unités de la PAL sont codées par une famille multigénique, et chaque gène peut être soumis à une régulation distincte, en réponse au stress ou/et au développement (Edwards et Gatehouse, 1999). Ainsi, la phénylalanine ammonia-lyase existe dans différents compartiments cellulaires, trois enzymes de la PAL ont été reportées chez les feuilles d'épinard (*Spinacia oleracea L.*) ; deux d'entre elles sont chloroplastiques et une cytosolique, chacune avec des mécanismes de régulation différents (Nishizawa *et al.*, 1979).

L'activité de la PAL est aussi régulée par la lumière (par le système thioredoxine) dans les tissus photosynthétiques (Edward et Gatehouse, 1999). Les plantes développent des réponses différentes en changeant le mécanisme d'activation et de désactivation de la voie des phénylpropanoïdes. Zucker (1965) est le premier à observer sur des tranches de tubercules de pomme de terre, que l'activité de la PAL était grandement stimulée par la lumière blanche. Des études de l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase sur des préparations de plantules étiolées, provenant de plusieurs familles végétales distinctes, ont montré que dans pratiquement chaque circonstance, la lumière augmentait l'activité de la PAL et que des différences remarquables existaient entre les espèces (Amrhein et Zenk, 1971).

Le phytochrome, pigment récepteur de la lumière intervenant dans de nombreux mécanismes d'adaptation (photopériodisme...) active la synthèse de la PAL (Guignard, 1996). L'activation ou l'inhibition de la PAL est régulée par de nombreux facteurs externes, telles que la lumière (Camm et Towers, 1973), les agressions parasitaires, les blessures (Wong *et al.*, 1975), les infections (Hopkins, 1999), les irradiations ainsi que les radiations rouges et ultraviolettes et les substances chimiques (Engelsma, 1974).

2.1.3 - Biosynthèse des flavonoïdes.

L'acide cinnamique est transformé en acide para-coumarique, par addition du groupement hydroxyle en présence de la *cinnamate 4-hydroxylase*, puis le coumarate est activé en coumaroyl-CoA, cette réaction est catalysée par la *coumaroyl-CoA ligase* (Fig.10).

La synthèse des flavonoïdes débute par la formation d'un squelette en C₆C₃C₆, constitué de deux noyaux nommés A, B et un hétérocycle C. Ces structures résultent de deux voies de biosynthèse différentes, le noyau B et les trois carbones de l'hétérocycle dérivent de la voie de l'acide shikimique (il constitue l'unité phénylpropanoïde), les six carbones composant le noyau A dérivent de la condensation de trois unités acétate via la voie du malonate (Lea et Leegood, 1999).

La fusion des deux parties nécessite une étape de condensation du *p*-coumaroyl CoA avec trois molécules de malonyl CoA pour former la trihydroxychalcone, puis la chalcone ; cette réaction est catalysée par la *chalcone synthase*. L'isomérisation de la chalcone par la *chalcone isomérase* conduit à la formation de la flavanone. La chalcone est un intermédiaire caractéristique de la synthèse de divers flavonoïdes ; elle est en équilibre avec la flavanone, cet équilibre étant contrôlé par une *chalcone isomérase*.

La conversion de la flavanone vers les dérivés des flavonoïdes est contrôlée par trois oxygénases distinctes. Chez les légumineuses l'*isoflavone synthase* catalyse la réaction pour la formation des isoflavones, précurseurs de la classe des isoflavonoïdes. Les flavones sont formés après une étape de réduction de la flavanone formant une double liaison en position 2-3 de l'hétérocycle ; cette réduction est catalysée par une *flavone synthase*. Les dihydroflavonols sont formés par hydroxylation de la flavanone (formation d'un hydroxyle au niveau de l'hétérocycle) par la *flavanone 3-hydroxylase*.

Au niveau de cette étape intermédiaire, les dihydroflavonols conduisent à deux sous classes :

- Les flavonols formés par réduction des dihydroflavonols, cette réaction est catalysée par la *flavonol synthase* (les flavonols peuvent provenir de l'hydroxylation en position 3 des flavones).
- Les flavanes-diols sont synthétisés par hydroxylation des dihydroflavonols, catalysée par la *dihydroflavonol réductase*. Les flavandiols donnent naissance aux anthocyanes par déshydroxylation (les flavandiols sont des précurseurs directs des anthocyanes). Ils peuvent par polymérisation former les pro-anthocyanes (tanins condensés).

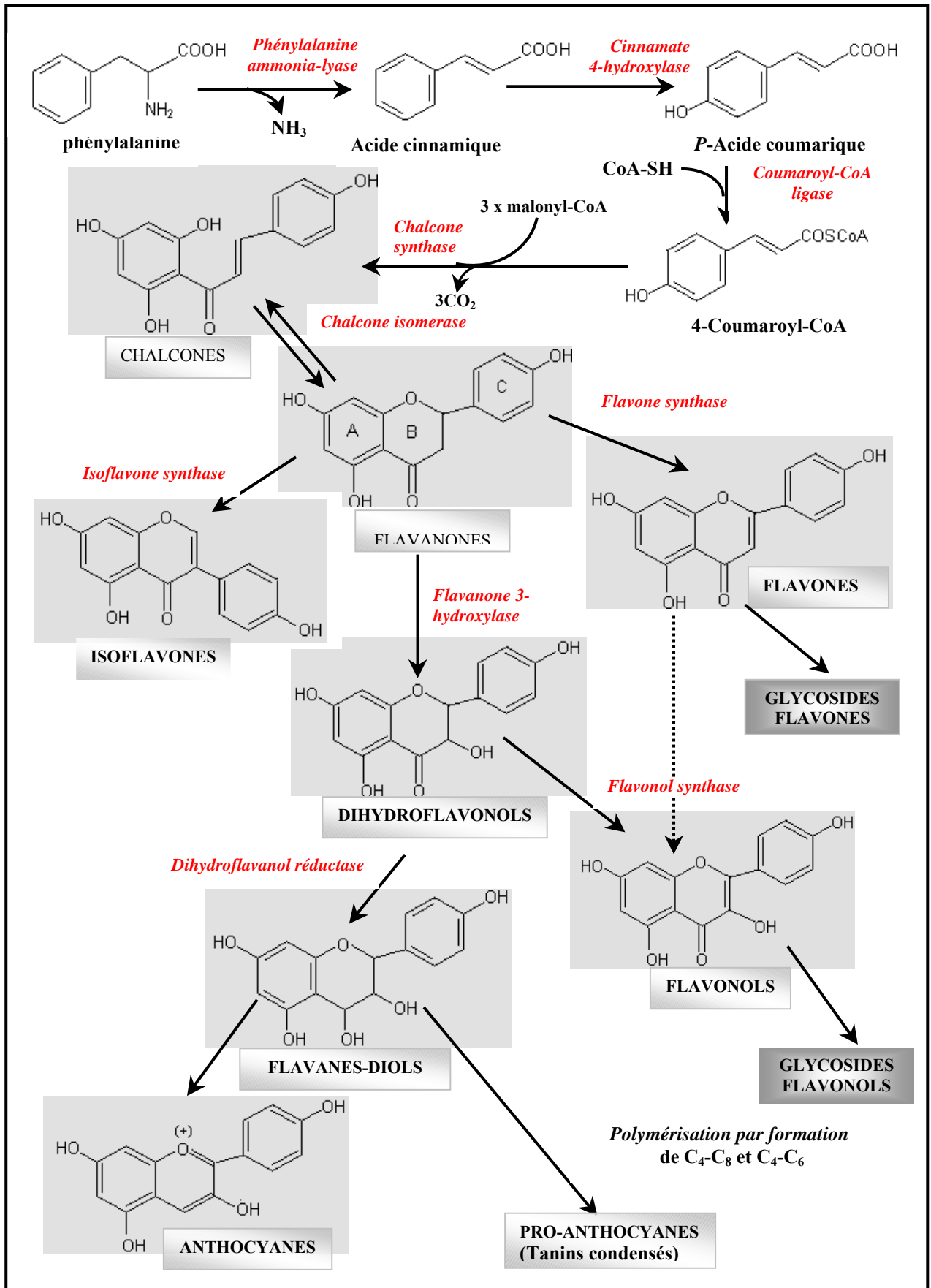


Figure 10. Schéma de biosynthèse des flavonoïdes chez les plantes (d'après Edwards et Gatehouse, 1999) (modifié).

- **Régulation de la biosynthèse des flavonoïdes.**

La lumière est un des facteurs qui contrôle la biosynthèse des flavonoïdes. Ce sont les irradiations du bleu et de l'ultraviolet qui induisent spécifiquement la synthèse des glucosides de Flavones et de Flavonols en augmentant l'activité de la synthèse de *novo* des enzymes. L'augmentation de la concentration de l'ARN messenger est responsable de l'augmentation de la vitesse de synthèse de *novo* de l'enzyme phénylalanine ammonia-lyase (PAL) par la lumière. Il est intéressant de noter que les enzymes de la voie de biosynthèse sont affectées différemment par une stimulation lumineuse : un premier groupe, composé de la *phénylalanine ammonia-lyase*, de l'*acide cinnamique 4-hydroxylase* et de la *p-coumaryl-CoA ligase* montre déjà, après environ 2 heures, une augmentation d'activité dont le maximum est atteint après 17 à 23 heures ; un second groupe, comprenant les enzymes spécifiques de la synthèse des flavonoïdes (*flavanone synthase* et *oxydase*, *7-O-glycosyl transférase...*) voit son activité apparaître après environ 4 heures et les activités spécifiques maximales sont atteintes seulement après 28 à 40 heures. Les deux groupes d'enzymes subissent, malgré une induction commune, des régulations différentes (Richter, 1993). Des études faites sur Pétunia et Arabidopsis ont fourni de nouvelles preuves démontrant que la lumière UV favorise la synthèse des flavonols (Rayan et *al.*, 2001-2002).

D'autres facteurs que la lumière ont une action inductrice : Les stress abiotiques (températures extrêmes, la salinité, le manque d'eau et l'absence de substances nutritives) et biotiques (attaque par des pathogènes) activent la synthèse des flavonoïdes ; les vitesses de synthèse des enzymes du métabolisme général des phénylpropanoïdes augmentent considérablement ; chacune est corrélée avec l'augmentation de la concentration à l'état stationnaire des ARNm spécifiques (Richter, 1993).

Ainsi des suspensions de cellules de persil réagissent au traitement par des éliciteurs, préparés à partir de parois cellulaires de *Phytophthora megasperma f.glycinea*, en synthétisant de *novo* des furanocoumarines. On observe simultanément une synthèse de *novo* de la phénylalanine ammonia-lyase et de la p-coumaryl-CoA ligase, qui catalysent la synthèse de la p-coumaryl-CoA ; cette synthèse va de pair avec une augmentation correspondante des ARNm spécifiques.

L'ensemble de ces résultats permet de conclure que les cellules répondent à l'effet de la lumière bleue ou des rayons UV et aux éliciteurs en augmentant la vitesse de transcription de tout gène, dont les produits jouent un rôle déterminant dans l'augmentation de la résistance aux UV ou d'une défense contre l'infection. Il a été observé une stimulation analogue par la lumière ultraviolette pour la synthèse des flavonoïdes (Richter, 1993).

Des études ont montré que les cytokinines stimulent l'accumulation des anthocyanes chez *Arabidopsis*, et cette augmentation est peut être due à une augmentation du taux des transcrits (Deikman et Hammer, 1995).

2.1.4 – Relation entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire.

Le métabolisme est un processus dynamique, les molécules sont constamment en turnover, il comporte toujours deux phases concomitantes et inverses, la synthèse (anabolisme) et la dégradation (catabolisme) qui sont toujours en équilibre.

Les plantes produisent une large gamme de composés organiques qui n'ont pas un rôle direct dans la croissance et le développement. Ces substances sont connues sous le nom de métabolites secondaires, produits secondaires ou produits naturels, contrairement aux métabolites primaires (chlorophylles, acides aminés, nucléotides, carbohydrates simples ou lipides), les métabolites secondaires (terpènes, composés phénoliques et alcaloïdes) n'ont pas des rôles reconnus dans les processus fondamentaux tels que la photosynthèse, la respiration, le transport de solutés et l'assimilation des nutriments...etc.

Aussi, les métabolites secondaires diffèrent des métabolites primaires par leur distribution restreinte dans le règne végétal, les métabolites secondaires particuliers sont spécifiques à certaines espèces de plantes ou à un groupe d'espèces taxonomiquement reliées, alors que les métabolites primaires existent dans l'ensemble des espèces du règne végétal.

La glycolyse est considérée comme un métabolisme intermédiaire entre le métabolisme primaire contenant des molécules composant la base de la machinerie moléculaire des cellules, et le métabolisme secondaire contenant une variété de molécules organiques (Hopkins, 1999).

Les métabolites secondaires se divisent en trois groupes chimiques distincts : les terpènes, les composés phénoliques et les alcaloïdes. La figure 11 montre sous un aspect simplifié les voies impliquées dans la biosynthèse des métabolites secondaires et leur connexion avec le métabolisme primaire. Les composés phénoliques sont des substances aromatiques formés via la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acide malonique. Les produits secondaires azotés, tels que les alcaloïdes sont fondamentalement synthétisés à partir des acides aminés.

Sans tenir compte du rôle des produits secondaires, il n'y a pas de différence fondamentale entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire, des réactions chimiques similaires prennent place, et dans les deux cas des molécules complexes sont synthétisées à partir de simples précurseurs par des enzymes multiples catalysant les réactions, la seule différence est dans le degré du flux de carbone dans les voies respectives et dans la façon dont elles sont régulées.

Alors que, le métabolisme primaire a l'avantage d'utiliser la majorité du carbone, de l'azote et du sulfate des plantes (Edwards et Gatehouse, 1999), seulement 20% du carbone total de la plante passe dans le métabolisme secondaire (Jensen, 1985).

Egalement, alors que le métabolisme primaire est sujet de régulation complexe par l'action des enzymes allostériques, ce type de régulation semble être absent à partir des dernières étapes de la voie du métabolisme secondaire, bien que normalement dans les premières étapes

de cette voie, souvent au niveau du point de divergence vers les produits secondaires est sujet de régulations complexes.

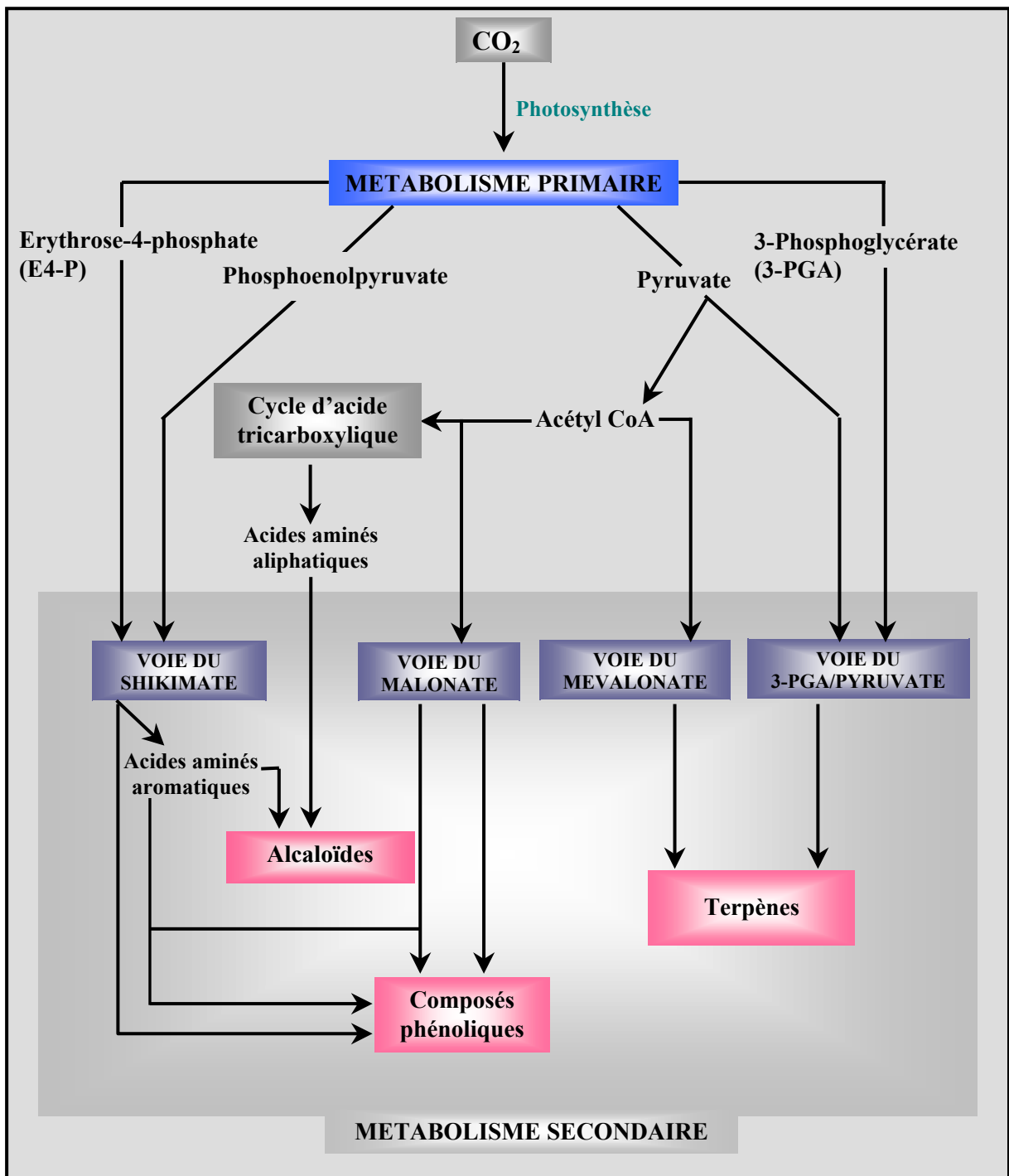


Figure 11. Schéma illustrant la relation entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire (Taiz et Zeiger, 1998)

2.1.5 – Phénylpropanoïdes et protection contre le stress.

De nombreux phénylpropanoïdes sont induits par les stress biotiques et abiotiques (Fig.12).

La forte **lumière blanche** augmente la synthèse des anthocyanes et les flavones ; ces composés atténueraient l'élévation de la lumière qui atteint les cellules photosynthétiques

(Beggs et al., 1987). La synthèse des anthocyanes est liée au métabolisme des sucres et paraît être sous la dépendance du phytochrome, comme tous les flavonoïdes.

Les **radiations UV** provoquent la synthèse des esters flavoniques et des esters du sinapate chez *Arabidopsis*, les isoflavonoïdes et les psoralènes chez d'autres espèces (Hahlbrock, 1981 ; Beggs et al., 1985 ; Li et al., 1993 ; Lois, 1994).

Ces composés absorbant les UV procurent une sorte de protection contre les dommages causés à l'ADN induisant la mort des cellules. Les plantes doivent se défendre contre les UV-B tout en permettant la pénétration des radiations photosynthétiquement actives (PAR) à travers les couches de cellules externes pour assurer la photosynthèse au niveau du mésophylle, pour cela les plantes élaborent une grande gamme de composés pour se défendre contre les UV-B (Jordan, 2002).

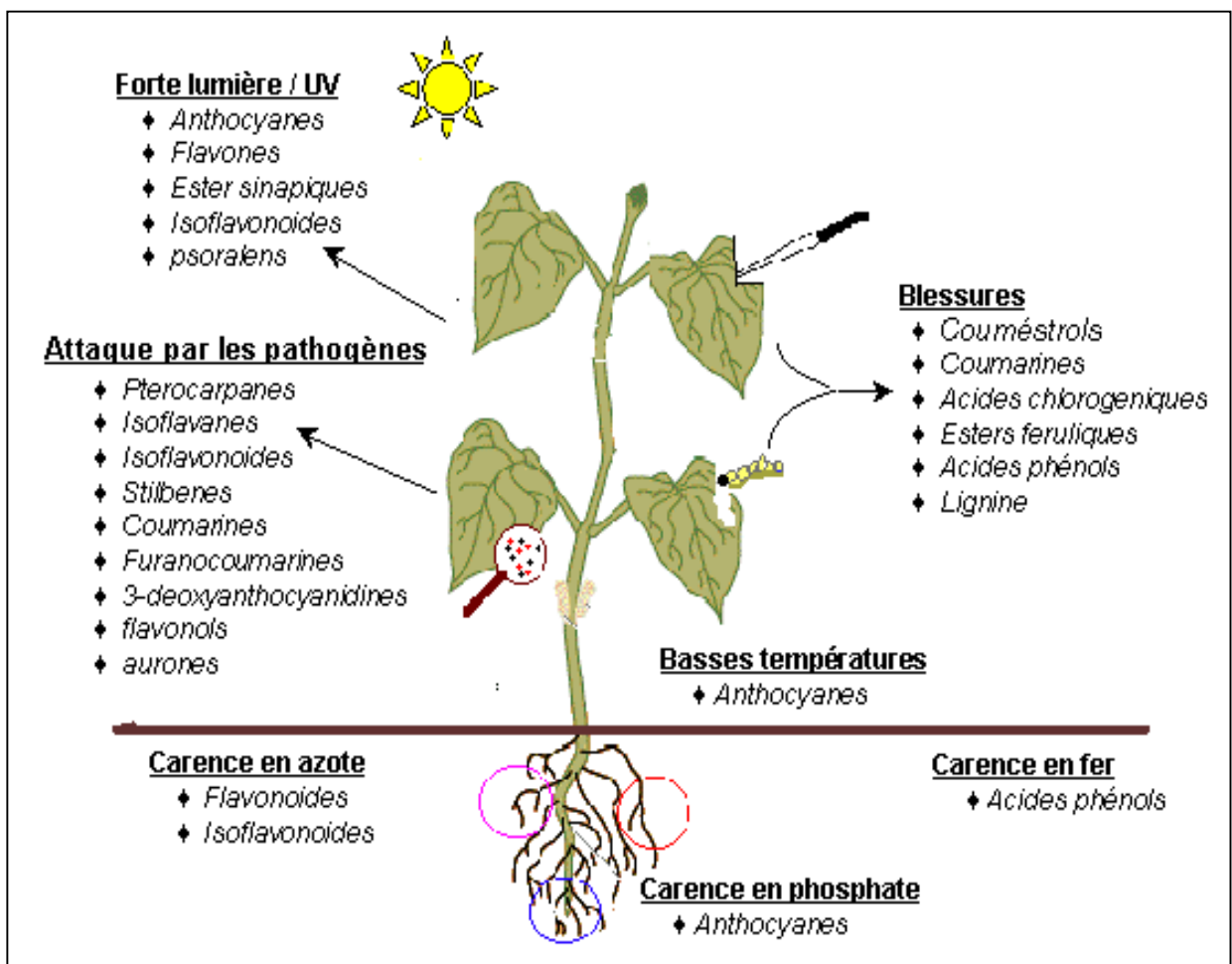


Figure 12. Exemples de composés phénoliques synthétisés en cas de différents stress chez les végétaux supérieurs (Dixon et Paiva, 1995).

Plusieurs phénylpropanoïdes sont synthétisés en réponse à des **attaques pathogènes**, parmi ces composés nous citons les flavonoïdes [3-dioxyanthocyanidines, flavonols (exp., quercétine, kaempferol) et les aurones], les coumarines ainsi que les composés anti-microbiens connus sous le nom de phytoalexines, ils incluent les pterocarpanes

(exp., glyceolline), isoflavonoïdes, stilbenes, psoralènes, (Bailey et Mansfield, 1982 ; Dixon et *al.*, 1995).

Les **blessures** induisent l'accumulation des flavonols comme le kaempferol et ses glycosides (Mo et *al.*, 1992 ; Van der Meer et *al.*, 1992 ; Vogt et *al.*, 1994).

Ces flavonoïdes peuvent prévenir des infections microbiennes dans un autre environnement riche en nutriments. Les blessures induisent aussi la synthèse des acides phénols, esters du cinnamate (tel que l'acide chlorogénique), coumarines, lignine...etc, ces produits peuvent agir directement comme composés de défense ou peuvent servir comme précurseurs pour la synthèse d'autres composés polyphénoliques (Hahlbrock et Scheel, 1989 ; Bernardis et Lewis, 1992).

Les **basses températures** favorisent la synthèse des anthocyanes (Deysson, 1982 ; Christie et *al.*, 1994 ; Leng et *al.*, 1993 ; Tignor et *al.*, 1997). Ces composés peuvent aussi être accumulés sous un stress osmotique (Dutt et *al.*, 1991 ; Wettstein et *al.*, 1962). La production et la localisation des anthocyanes dans les racines, les tiges et spécialement dans les tissus foliaires peuvent permettre aux plantes de développer une résistance à de nombreux stress environnementaux (Chalker-Scott, 1999).

Le **stress nutritionnel**, notamment la **carence en phosphate** induit l'accumulation des anthocyanes chez plusieurs plantes (Cobbina et Miller, 1987).

Chez les légumineuses la **carence en azote** provoque la synthèse des flavonoïdes et les isoflavonoïdes par induction du gène *nod* qui est impliqué dans la formation des nodosités (Graham, 1991 ; Wojtaszek et *al.*, 1993). Par ailleurs, la **carence en fer** peut causer une libération croissante des acides phénoliques, ces derniers semblent avoir un rôle dans la solubilisation et l'assimilation des métaux (Marschner, 1991).

2.2 - Le soja

Originaire de l'Extrême-Orient, le soja est une légumineuse cultivée depuis plus de trois mille ans. Le soja est utilisé dans l'alimentation humaine sous forme de produits traditionnels (le lait facilement assimilable et le tofu...). Sa culture s'est développée en Amérique, et plus récemment en Europe et presque dans le monde entier.

Le Soja cultivé, appartient à la famille des Papilionacées, à la tribu des phaséolées. Il s'agit d'une plante annuelle, herbacée, à tige dressée, ramifiée, non volubile et peut atteindre une hauteur d'un mètre (Photo 1).

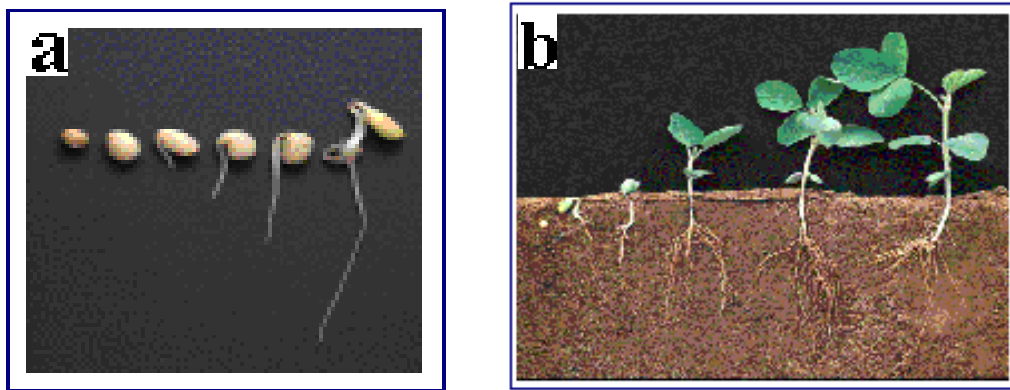


Photo 1. Différents stades de développement du soja, germination (a) et croissance (b).

Les premières feuilles sont simples, opposées et ovales, tandis que les suivantes sont trifoliées et alternes, les folioles sont ovales et pubescentes. Le système racinaire, à nodosité est formé d'une racine pivotante où prend naissance un système de racines latérales (Photo 1a,b). La plante est couverte de fins trichomes.

Les fleurs de type papilionacées sont très petites, insérées directement à l'aisselle des feuilles par petites grappes de 2 à 5. Elles sont blanches, mais peu visible (Photo 2a,b). Les gousses, brunes et pileuses, droites ou légèrement courbées, mesurent à maturité de 3 à 7 cm de long et contiennent 1 à 4 graines, rarement 5 (Photo 2c). Les gousses brunissent rapidement en séchant. Les graines de forme sphériques plus ou moins allongées, ont un tégument crème, noir parfois vert, jaune, avec un hile bien visible (Photo 2d).

Le cycle de développement peut être décomposé en trois phases (Boyeldieu, 1991).

- ❖ La **phase de croissance végétative** qui dure de 30 à 40 jours au cours de laquelle la plante met en place la plus grande part de son feuillage et de ses racines. La croissance ne peut s'effectuer que lorsque le sol, entre 5 et 10 cm de profondeur, atteint la température de 10 C°.

Au cours de cette phase, les nodules se développent lentement et ne sont pratiquement pas fonctionnels, la plante utilise l'azote minéral du sol.

- ❖ La *phase de reproduction* dure de 35 à 50 jours et couvre floraison et fructification. L'activité physiologique de la plante est à son maximum et les nodosités lui fournissent l'azote. C'est la période où les besoins en eau sont les plus élevés, et où la plante est très sensible à la sécheresse.
- ❖ La *Phase de maturation des fruits* dure entre 30 et 50 jours.

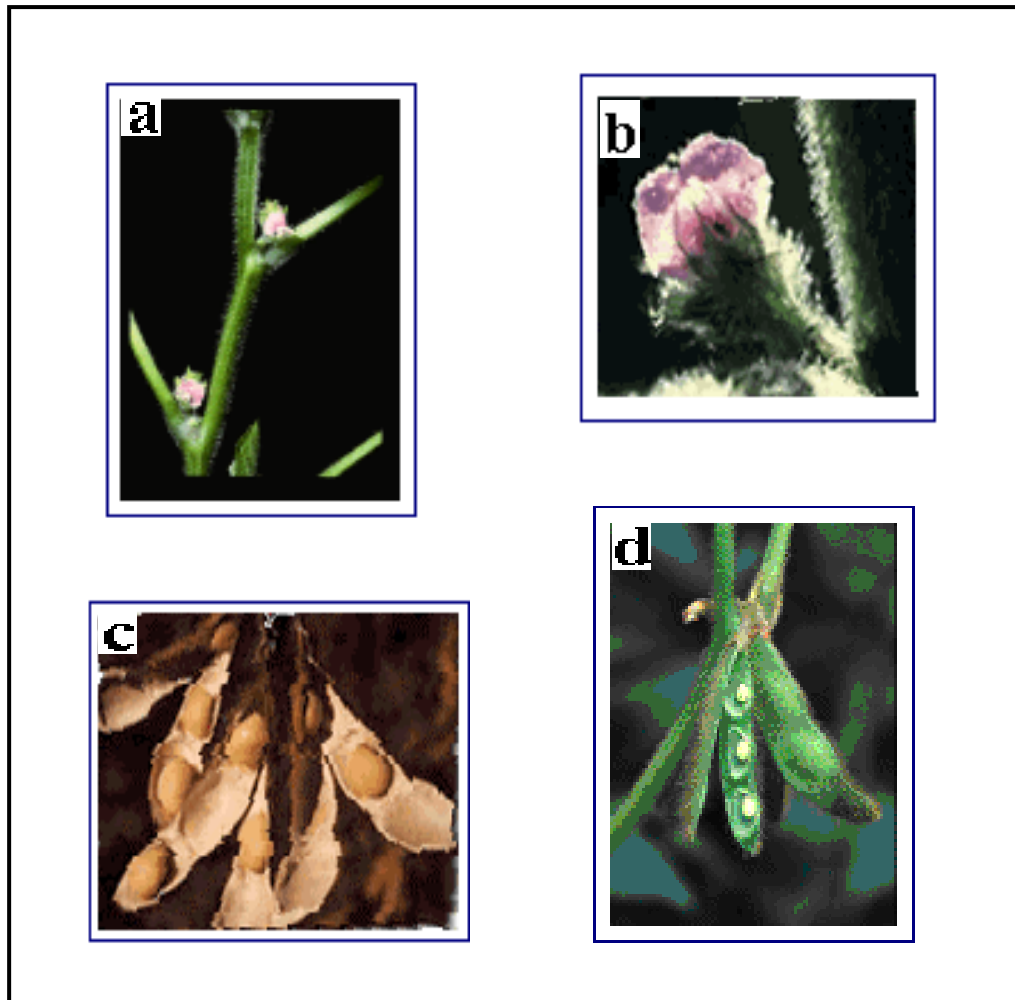


Photo 2. Aspect externe de la fleur de soja (a et b), et du fruit (c et d).

Intérêt et utilisation du soja.

Le soja, comme les autres légumineuses, présente de nombreux atouts pour la gestion de la rotation des cultures (c'est une plante idéale dans les assolements de production céréalière), et pour la préservation de l'environnement. Car il fixe l'azote atmosphérique et absorbe l'azote minéral présent dans le sol, le soja ne demande pas de complément sous forme d'engrais azotés, donc le soja est une véritable «plante écologique».

« Plante à succès », le soja est cultivé principalement pour sa graine, qui a plusieurs usages dans les secteurs alimentaires et industriels. Il peut être utilisé dans une vingtaine de produits, qui peuvent être simples (graines fraîches ou grillées), ou plus élaborés et fermentés (tofu qui est une viande reconstituée, sauce soja, l'huile et margarine ...) ou non fermentés (tonyu, farine utilisée pour l'alimentation humaine ou animale...).

Le soja constitue une des principales sources d'huile comestible et de protéines destinées à l'alimentation animale (le tourteau de soja qui sert de supplément alimentaire pour le bétail). Dans le secteur industriel, les usages du soja sont divers allant de la production de levures et d'anticorps, à la fabrication de savons et de désinfectants, la peinture et les vernis, le plastique industriel, et l'encre d'imprimerie.

« Plante miracle », riche en protéines végétales, en graisses polyinsaturées et sans cholestérol, le soja favorise l'équilibre nutritionnel. Une substance bénéfique est issue du soja: la lécithine connue pour sa capacité à combattre les maladies cardio-vasculaires et le cholestérol.

2.3 - Les herbicides

Le nom commun «herbicide» ou produit herbicide, s'applique plus particulièrement aux produits phytosanitaires qui possèdent la propriété d'éliminer les adventices, en agissant sur une de leurs fonctions vitales. En plus de cette faculté, un herbicide doit posséder des propriétés de sélectivité, lui permettant de détruire diverses espèces d'adventices tout en sauvegardant la plante cultivée (Scalla, 1991).

Les herbicides sont des produits aux structures chimiques très diverses et complexes. Bien que chaque produit ait ses propriétés particulières, les herbicides d'une même famille présentent des structures chimiques semblables et de nombreuses caractéristiques communes. Le nombre de famille chimique ayant des propriétés herbicides dépasse actuellement la vingtaine, les cibles cellulaires de ces molécules sont également très variées.

2.3.1 - Les mécanismes d'action phytotoxique.

Les mécanismes susceptibles de provoquer une action phytocide dans une plante ainsi que les sites d'action où ceux-ci peuvent s'exercer sont nombreux et variés. En effet, toute modification ou perturbation d'un processus métabolique peut provoquer des effets herbicides, si celles-ci concerne une fonction essentielle, l'effet peut être léthal. Cependant, une perturbation peut être suffisante sans être mortelle pour la plante, un effet régulateur, limitant ou bloquant la croissance ou le développement d'un adventice peut correspondre à l'effet recherché.

Les symptômes plus ou moins visibles d'une perturbation dans la plante, peuvent indiquer le site d'action probable d'un herbicide. Les recherches en génétique, en biochimie, en biotechnologie, réalisent des progrès dans la connaissance des sites et des mécanismes d'action des substances herbicides.

Les principaux mécanismes d'action des herbicides sont brièvement citer ci-dessous :

➤ **Les inhibiteurs de la photosynthèse et de la respiration.** Un grand nombre d'herbicides ont comme mode d'action phytotoxique principale la réduction de l'activité photosynthétique des plantes.

- Les *triazines*, les *diazines*, et les *dérivés de l'urée* dont le plus connu est la DCMU, qui rentre en compétition avec le pool des plastoquinones, il se combine très fortement au site de fixation de la quinone B (Qb) sur la protéine D₁, empêchant ainsi la réoxydation de la quinone A (Qa), et interrompt donc les mouvements des électrons (Heller et *al.*, 1995).
- Les *pipryridiles* tels que le paraquat et le diquat, inactivent le système de transfert d'électrons photosynthétiques au niveau du PSII, arrêtant l'assimilation du CO₂ et donc la nutrition carbonée (Dodge, 1982).
- Les *hydroxybenzonnitriles* (tels que les bromoxynil, ioxynil) et les *dinitrophénols* (tels que le dinoterbe, le dinitro-orthocresol (DNOC)...) sont des herbicides

découplants, ils agissent sur les membranes cellulaires, empêchant l'énergie produite au cours des réactions d'oxydoréduction cellulaire (mitochondrie) d'être mise en réserve sous forme d'ATP (Tissut et Severin, 1984).

➤ **Les inhibiteurs de la synthèse des acides aminés.**

- Les *organo-phosphorés* dont le plus connu est le glyphosate, inhibiteur de la synthèse des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine), il agit en inhibant spécifiquement l'activité de l'enoilpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase (EPSP synthétase) (Duke, 1990), en annihilant l'accumulation de l'acide shikimique (Freysinet, 1990), et réduit l'activité de la PAL (Cole et *al.*, 1980 ; Duke et *al.*, 1985). Le gluphosinate inhibe la glutamine synthétase (Duke, 1990), enzyme responsable de la formation de la glutamine à partir du glutamate.
- Les *imidazolinone* (tel que l'imazamethabenz) (Shaner et Reider, 1986), les *triazolopyrimidines* et les *sulfonylurées* (chlorsulfuron, sulfosulfuron) (Chaleff et Ray, 1984, Khelifa, 2002) inhibent la biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (leucine, valine) essentiels à la croissance végétale en bloquant l'activité de l'acétohydroxyacide synthétase (AHAS) appelée également acétolactate synthétase (ALS) (Ray, 1984 ; Everaere et *al.*, 1990).

➤ **Les inhibiteurs de la division cellulaire.**

- Les carbamates (le barbane, le chloropropane,...) (Lehnen et Vaughn, 1992), les dinitroanilines (le trifluraline, le nitraline et le butraline) (Lignowski et Scott, 1972), le propyzamide (benzamides) (Ackashi et *al.*, 1988), inhibent la division cellulaire au cours de la métaphase en bloquant la polymérisation de la tubuline.

➤ **Les inhibiteurs de la synthèse des lipides.**

- Les *cyclohexanediones* tel que l'alloxydime, les aryloxyphénoxypropionates, diclofopmethyl et analogues bloquent la synthèse des acides gras par inhibition de l'acétyl coenzyme A carboxylase (Duke, 1990).
- Les *thiocarbamates* sont des inhibiteurs de la synthèse des acides gras à chaîne longue, et des alcanes (C₂₁ à C₃₇) constitutifs des cires cuticulaires (Kolattukudy et Brown, 1974).

- **Les phytohormones de synthèse.** Appelés aussi *herbicides auxiniques*, sont des composés qui à partir d'une certaine concentration deviennent herbicides (Tissut et Severin, 1984). Ces auxines de synthèse bloquent entièrement le système de circulation polarisée de l'auxine vraie, l'acide indoylacétique, annulant ainsi les effets propres de celle-ci, c'est donc probablement en prenant la place de l'auxine vraie, que les auxines de synthèse provoquent différents troubles chez la plante (blocage de la photosynthèse, exagération de la respiration, apparition de malformations morphologiques...etc) causant une mort lente. L'herbicide auxinique le plus connu est le 2-4 D (acide 2-4 dichloro-phénoxyacétique) qui stimule la production d'éthylène provoquerait des déformations et des croissances aberrantes dans les tissus jeunes (Gauvrit et Gaillardon, 1986).

➔ **Les inhibiteurs de la synthèse des caroténoïdes.**

- Les *aminotriazoles* (amitrole) sont parmi les inhibiteurs de la formation des caroténoïdes. Ils empêchent la formation du neurosporène, de l' α et du β carotène (Burns et al., 1971).
- Les *pyridazinones* constituent une famille importante d'herbicides affectant plusieurs fonctions du métabolisme cellulaire, cette famille est représentée par : le norflurazon, SAN 9785, pyrazon, metflurazon, SAN 133-410H et SAN 9774. La figure 15 illustre quelques herbicides de la familles des pyridazinones.

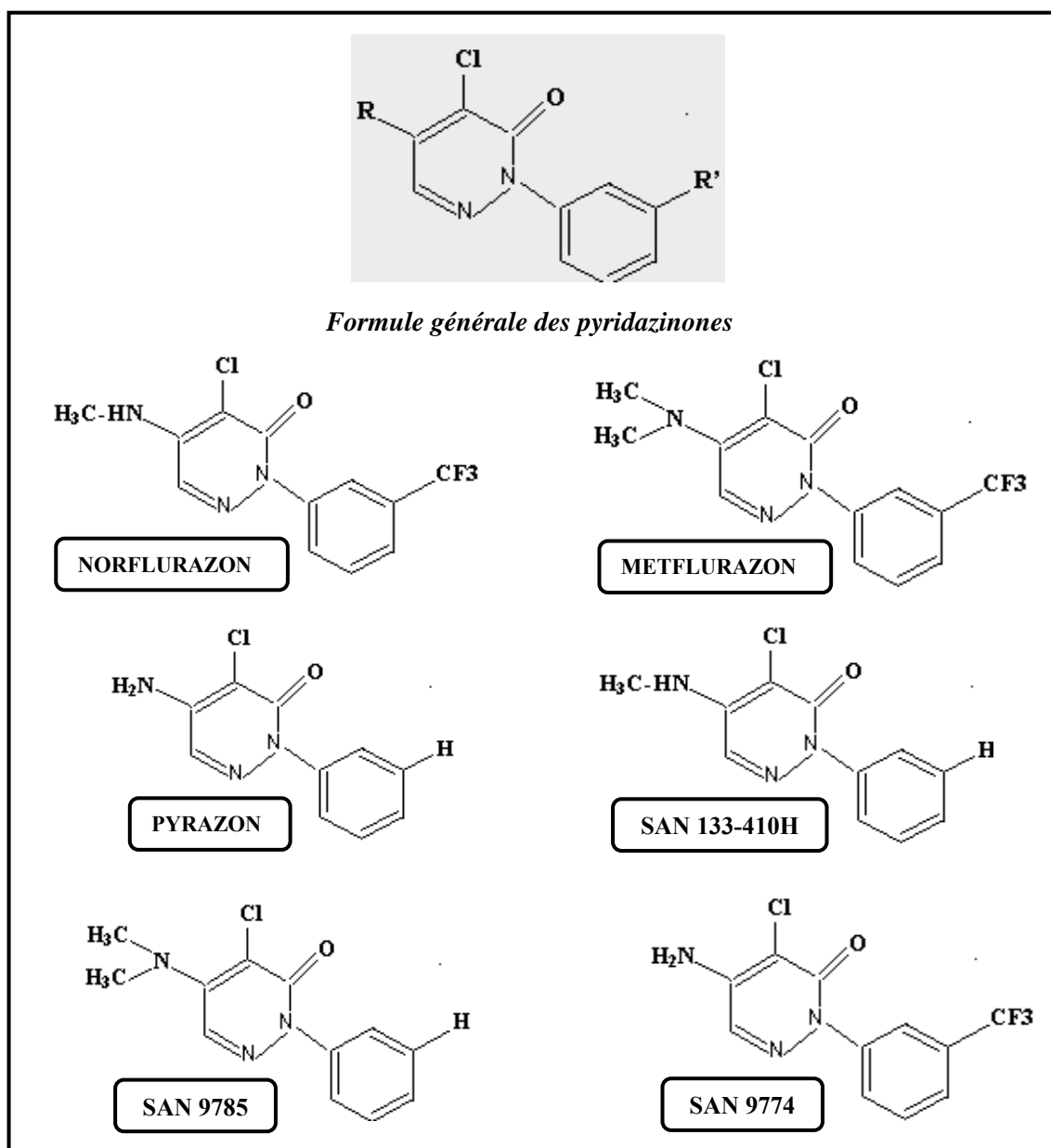


Figure 13. Structure des différents herbicides de la famille des pyridazinones.

Le tableau IV résume l'influence de quelques dérivés de Pyridazinones sur le métabolisme cellulaire. La phytotoxicité de cette famille dépend donc du degré de méthylation de la fonction amine et aussi de la présence et de l'absence du groupe trifluorométhyl sur le noyau aromatique (Scalla, 1991).

Les Pyridazinones provoquent l'altération de la structure du chloroplaste (Hilton et *al.*, 1971 ; Khan et *al.*, 1977 ; Davis et Harwood, 1983) et la photodestruction des ribosomes chloroplastiques (Bartels et Hydes, 1970). Ils réduisent donc l'activité photosynthétique.

Tableau IV. Exemples des dérivés des pyridazinones et leur influence sur le métabolisme cellulaire.

Nom	Effets	Références
Pyrazon	<ul style="list-style-type: none"> Inhibition de la réaction de Hill. 	Hilton et <i>al.</i> , 1969
SAN 9785	<ul style="list-style-type: none"> Modification du métabolisme lipidique (inhibition de la désaturation du C_{18:2} en C_{18:3}). Inhibition de la réaction de Hill. 	St John et Hilton, 1976 Norman et St John, 1987.
Norflurazon	<ul style="list-style-type: none"> Inhibition de la synthèse des caroténoïdes. 	Khan et Young, 1977. Scalla, 1991. Abrous et <i>al.</i> , 1998.
Metflurazon	<ul style="list-style-type: none"> Modification du métabolisme lipidique. Inhibition de la réaction de Hill. 	
SAN 133-410H	<ul style="list-style-type: none"> Perturbation du métabolisme lipidique. 	Rajasekharan et Sastry, 1987.
SAN 9774	<ul style="list-style-type: none"> Inhibition de la sn-glycerol 3 phosphate acyl transférase. 	

D'autres effets physiologiques ont été enregistrés comme la réduction du taux d'acide abscissique (St John, 1982) et la chélation de certains cations indispensables au métabolisme cellulaire, c'est le cas du Mg²⁺ (élément constitutif du noyau tétrapyrrolique des chlorophylles) (Mannan et Bose, 1985 ; Bose et *al.*, 1992).

Le norflurazon ralentit la croissance et surtout empêche la formation de pigments chloroplastiques : les feuilles et les tiges qui apparaissent alors sont de type albinos. Par ailleurs, les feuilles déjà formées au moment du traitement restent habituellement vertes ; c'est sur les organes qui se développent par la suite que se manifeste la chlorose. En outre, le norflurazon inhibe la biosynthèse des caroténoïdes, en bloquant l'enzyme clé de la voie de leur biosynthèse qui est la « phytoène désaturase » (Duke, 1990 ; Chamowitz et *al.*, 1993 ; Bramley, 1994). Le norflurazon entraîne donc une déficience en chlorophylles par manque de protection par les caroténoïdes, de ce fait, il induit le photobleaching.

Matériels & Méthodes

3 - Matériels & Méthodes

3.1 - Matériel végétal.

Ce travail a été effectué sur les graines de soja, *Glycine max* L., variété sponsor, fournies par Rustica-semences Mondonville-France.

3.1.1 - Mise en culture.

Les graines de soja sont désinfectées avec de l'eau de Javel pendant dix minutes. Elles sont ensuite rincées abondamment à l'eau, puis imbibées dans de l'eau distillée pendant trois heures. Les graines sont ensuite mises à germer dans des boîtes de pétri tapissées d'une double couche de papier absorbant à raison de dix graines par boîte, et arrosées tous les jours avec de l'eau distillée pour maintenir l'humidité à l'intérieur des boîtes. Dès la percée de la racine, les plantules sont transférées dans des pots à raison de vingt plantules par pot, qui sont ensuite mis dans une chambre de culture avec une photopériode de 16/8, J/N et une thermopériode de 24°C le jour, 18°C la nuit.

3.2 - Traitements.

Le norflurazon est un herbicide commercialisé sous le nom de « ZORIAL » de formule chimique : **4-chloro-5(méthylamino)-2-[3-(trifluorométhyl)phényl]-3(2H)-pyridazinone**.

Il appartient au groupe des pyridazinones, c'est un produit phytosanitaire, non inflammable. Il se présente sous forme d'une poudre cristalline, de couleur marron ; son poids moléculaire est de **303.7 g**, sa solubilité dans l'eau est de **28 mg.L⁻¹** à 23°C ; il est également soluble dans l'alcool éthylique, ainsi que dans l'acétone. Sa durée de vie et sa stabilité au stockage dans son emballage d'origine est de quatre ans à une température de 25°C (index phytosanitaire, 1993).

La formule brute du norflurazon est : **C₁₂ H₉ Cl F₃ N₃O** et sa formule développée est représentée par la figure 14.

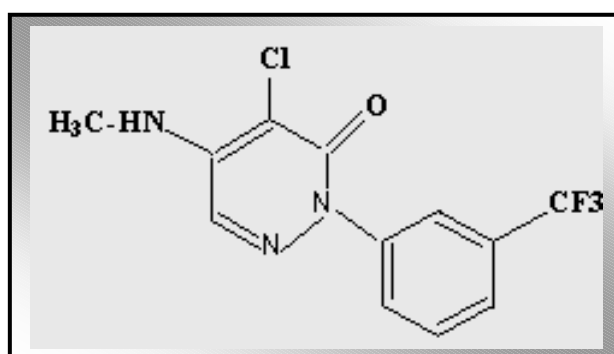


Figure 14. Formule développée du norflurazon

Les plantes sont séparées en trois lots :

- ❖ Le premier lot est placé à la lumière ; il est considéré comme lot témoin.
- ❖ Le deuxième lot est placé à l'obscurité.
- ❖ Le troisième lot est traité par des concentrations différentes de norflurazon [$10^{-6}M$, $10^{-5}M$, $10^{-4}M$ et $10^{-3}M$].

3.3 - Méthodes utilisées.

3.3.1 - Extraction et dosage des pigments foliaires.

0.1 g de feuilles trifoliées (MVF) sont broyées à sec puis dans 10 mL d'acétone à 80% à froid. Le broyat est centrifugé à $3000 \text{ trs.min}^{-1}$ pendant 10 min ; le surnageant qui contient les pigments est récupéré. L'absorbance est lue aux longueurs d'ondes suivantes après étalonnage du spectrophotomètre grâce à un blanc préparé à partir de 10 mL d'acétone à 80%.

$\lambda_a = 647 \text{ nm}$ et $\lambda_b = 663 \text{ nm}$ pour les chlorophylles *a* et *b*.

$\lambda_c = 470 \text{ nm}$ pour les caroténoïdes.

les teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes sont déterminées selon les équations de Lichtenthaler (1987).

$$\text{Chl } a = 12.25 \cdot \text{DO}[\lambda_b] - 2.79 \cdot \text{DO}[\lambda_a] \quad \mu\text{g.mL}^{-1}$$

$$\text{Chl } b = 21.5 \cdot \text{DO}[\lambda_a] - 5.1 \cdot \text{DO}[\lambda_b] \quad \mu\text{g.mL}^{-1}$$

$$\text{Chl } a+b = 7.15 \cdot \text{DO}[\lambda_b] + 18.71 \cdot \text{DO}[\lambda_a] \quad \mu\text{g.mL}^{-1}$$

$$C_{x+c} = \frac{1000 \cdot \text{DO}[\lambda_c] - 1.82 \cdot \text{Chl } a - 85.02 \cdot \text{Chl } b}{198} \quad \mu\text{g.mL}^{-1}$$

Les teneurs en pigments foliaires sont exprimées en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de MVF (Pour chaque point trois extractions ont été réalisées).

3.3.2 - Extraction et dosage de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL).

L'extraction de la PAL est réalisée selon la méthode de Hoagland et *al.*(1979) sur les premières feuilles trifoliées de soja pour les trois traitements (lumière, obscurité et herbicide). L'activité de la PAL est déterminée par la quantité d'acide cinnamique formée à partir d'une quantité donnée de son précurseur, la phénylalanine.

0.5 g de matière végétale fraîche sont broyées à froid dans 6 mL de solution tampon de borate de sodium 0.1N, pH 8.8. Le broyat est centrifugé à froid pendant 15 min à $3000 \text{ trs.min}^{-1}$. Les protéines contenues dans le surnageant sont précipitées par le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2$

SO₄ à 70% de saturation et après 30 min de centrifugation à 3000 trs.min⁻¹, les protéines contenues dans le culot sont récupérées par 4 mL de tampon Borate de sodium 0.1N, pH 8.8.

L'activité de la PAL est déterminée par la quantité d'acide cinnamique formée par heure et par quantité de protéines.

La réaction enzymatique est effectuée dans une étuve à 37°C pendant 1 heure, le milieu d'incubation renferme :

- 1 mL d'extrait enzymatique.
- 1 mL de tampon de borate de sodium 0.1N, pH 8.8.
- 1 mL de phénylalanine à 6.10^{-2} M.

La réaction enzymatique est arrêtée par une acidification du milieu (3 gouttes d'acide chlorhydrique à 6N). L'acide cinnamique formé pendant la réaction est extrait trois fois dans une ampoule à décanter par 3 mL d'éther diéthylique. Deux phases se forment, la phase supérieure contient l'acide cinnamique, tandis que la phase inférieure est rincée deux fois avec l'éther diéthylique afin de récupérer la totalité de l'acide cinnamique.

La solution étherée contenant l'acide cinnamique est dosée au spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 269$ nm. Une courbe étalon est réalisée en parallèle à l'aide d'une solution mère d'acide cinnamique à 0.1 mg.mL⁻¹. Une gamme à des concentrations croissantes [1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 8, 9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$] est préparée (Fig.15).

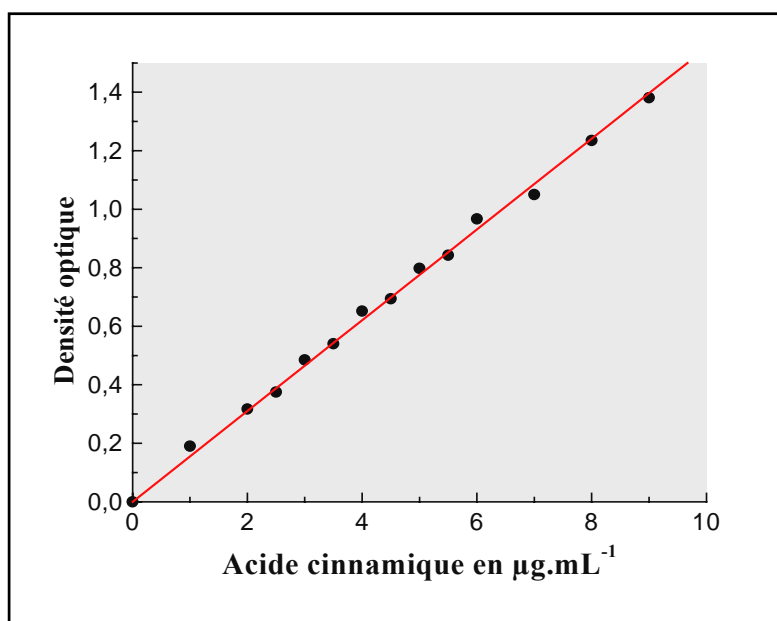


Figure 15. Courbe d'étalonnage de l'acide cinnamique.

3.3.3 - Dosage des protéines.

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de Bradford (1976) sur l'extrait ayant servi à mesurer l'activité PAL. Cette méthode consiste à utiliser le bleu de coomassie [G250] qui forme un complexe de coloration bleue avec les protéines.

La coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présentes. La coloration se développe rapidement et reste stable pendant une heure ; le maximum d'absorption du complexe protéine-bleu de coomassie est à $\lambda = 595 \text{ nm}$.

A 100 μL d'extrait protéique sont ajoutés 3 mL de réactif de Biorad. L'ensemble est homogénéisé et laissé à incuber quelques minutes. La courbe étalon est réalisée à partir d'une solution mère de BSA à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Les concentrations suivantes [0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$] ont été utilisées (Fig.16). Les quantité de protéines sont exprimées en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de MVF.

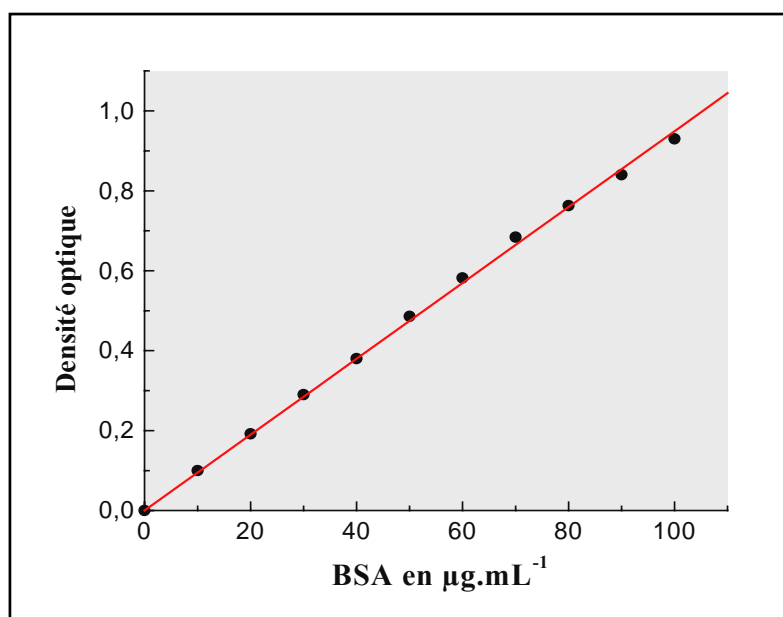


Figure 16. Courbe d'étalonnage des protéines.

3.3.4 - Extraction et dosage des flavonoïdes.

Le protocole d'analyse repose sur l'hydrolyse acide des hétérosides du matériel végétal suivie d'une extraction des aglycones (Bath-Smith, 1954 ; Lebreton et *al.*, 1967 amélioré par Laracine, 1984). Il permet à la fois le dosage des :

- ❖ **Anthocyanidines** : obtenues lors du traitement acide par transformation des proanthocyanidines natives correspondantes.
- ❖ **Aglycones flavoniques** : obtenus par rupture des liaisons osidiques des hétérosides natifs.

0.5 g de matière végétale fraîche (feuilles trifoliées) sont broyées à sec, puis hydrolysées au bain marie bouillant par 40 mL d'acide chlorhydrique (HCl) 2N, pendant 40 min. L'oxygène est fourni par insufflation d'air toutes les 10 min ; Il permet l'oxydation des proanthocyanidines en anthocyanidines correspondantes. Après refroidissement, les aglycones flavoniques sont extraits à trois reprises par 5 mL d'éther diéthylique dans une ampoule à décanter.

- **La phase aqueuse (hypophase)** contenant les anthocyanes est filtrée afin d'éliminer les traces de débris végétaux, le volume total est mesuré et les anthocyanes sont dosés à une longueur d'onde de $\lambda = 520$ nm.
- **L'épiphase éthérée** contenant les aglycones flavoniques est évaporée à sec à l'air libre. Les aglycones flavoniques sont repris par 5 mL d'éthanol à 95%, une lecture de l'absorbance est réalisée à une longueur d'onde de $\lambda = 280$ nm.

3.3.4.1 - Méthodes de calcul.

a - Les anthocyanes.

La teneur en proanthocyanes (le rendement de la transformation des proanthocyanes en anthocyanes étant pratiquement constant dans des conditions standardisées) exprimée comme équivalent procyanidine est donnée par la formule suivante :

$$T \text{ (en \% ou en mg / g)} = \eta \cdot \frac{DO}{\epsilon} \cdot M \cdot V \cdot \frac{d}{P}$$

où :

η : facteur de corrélation du rendement de la transformation des proanthocyanes en anthocyanes (de l'ordre de 17 %). coefficient correctif = 6.

M : masse molaire de la procyanidine ($M=306$).

ϵ : coefficient d'absorption molaire de la cyanidine ($\epsilon = 347000$).

DO : densité optique.

V : volume de l'extrait (phase aqueuse) en mL.

d : facteur de dilution.

P : poids frais du matériel analysé.

Soit :

$$T \text{ (en \% ou en mg/ g)} = 5.2 \cdot 10^{-2} \cdot (DO) \cdot \frac{V \cdot d}{P}$$

b - Aglycones flavoniques.

La teneur en aglycones flavoniques exprimée comme équivalent quercétine est calculée selon la formule suivante :

$$T \text{ (en \% ou en mg / g)} = \frac{DO}{\epsilon} \cdot M \cdot V \cdot \frac{d}{P}$$

où :

- M** : masse molaire de la quercétine (M = 302).
ε : coefficient d'absorption molaire de la quercétine (ε = 23000).
DO : densité optique.
V : volume de la solution éthanolique d'aglycones flavoniques.
d : facteur de dilution.
P : poids frais du matériel hydrolysé.

Soit :

$$T \text{ (en \% ou en mg / g)} = 1.3 \cdot 10^{-2} \cdot (\text{DO}) \cdot \frac{V \cdot d}{P}$$

3.3.5 - Extraction et dosage des acides phénols.

Les acides phénols sont extraits et dosés selon une technique établie par Ribereau-Gayon (1968), qui consiste à réaliser une hydrolyse alcaline des composés phénoliques naturels du matériel végétal, libérant les acides phénols de leurs combinaisons esters (-CO-O-C-) suivie d'une hydrolyse acide destinée à rompre les liaisons acétals (-C-O-C-) intervenant dans les combinaisons de type hétérosidique des acides phénols ; ainsi ces derniers sont séparés de la phase aqueuse par de l'éther diéthylique.

0.2 g de matière végétale sèche (feuilles) sont mis à macérer dans 30 mL d'eau distillée pendant 24 heures sur agitateur afin d'extraire les composés phénoliques naturels.

A 20 mL du filtrat récupéré, 1.5 g de soude en pastille (NaOH) sont ajoutés. L'hydrolyse alcaline des esters d'acides phénols est réalisée à une température ambiante pendant 2 heures dans une chambre à vide afin de libérer les acides phénols de leurs combinaison esters tout en empêchant leur oxydation. Cette hydrolyse alcaline est suivie d'une hydrolyse acide par addition à l'extrait de 3.3 mL d'acide chlorhydrique (HCl) pur nécessaire pour obtenir une solution à 2N.

Les acides phénols ainsi libérés sont extraits par 10 ml d'éther diéthylique (5 mL à deux reprises). L'extrait étheré est séché à l'air libre, puis récupéré par 5 mL d'éthanol à 95°. La solution éthanolique obtenue servira pour le dosage des acides phénols.

L'estimation quantitative des acides phénols totaux de chaque extrait végétal est réalisée à l'aide d'une méthode basée sur la grande oxydabilité des acides phénols.

Le réactif de Folin et ciocalteu utilisé est un mélange de bleu de tungstène et de molybdène, la coloration produite «absorption maximale entre 725 nm et 750 nm» est proportionnelle aux phénols totaux consiste à comparer les dosages à une gamme étalon préparée dans les mêmes conditions que le dosage proprement dit.

La courbe étalon est établie avec l'acide gallique, acide phénol de la série des acides benzoïques, à partir d'une solution mère d'acide gallique à 0.15 mg.mL⁻¹ (Fig.17).

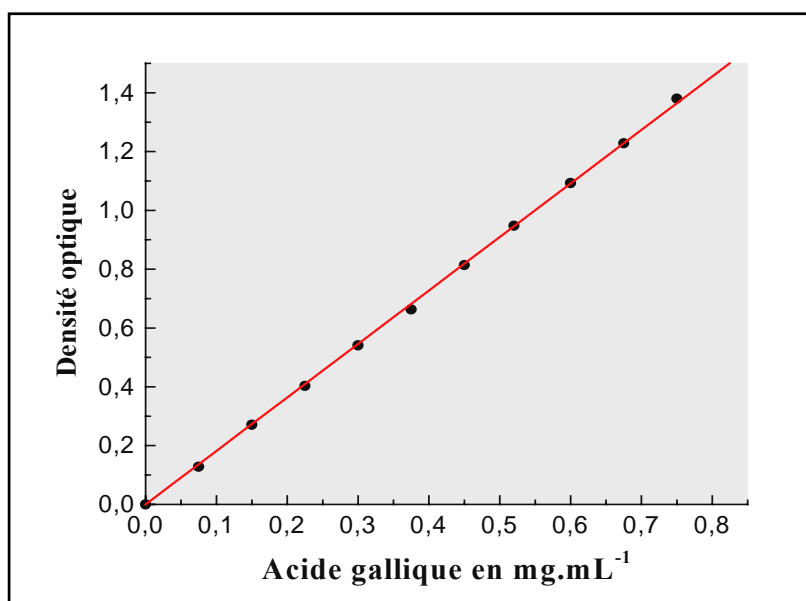


Figure 17. *Courbe d'étalonnage des acides phénols.*

◆ **Mode opératoire :**

Le dosage des acides phénols est réalisé sur 0.5 mL de l'extrait phénolique, complété à 5 mL avec de l'eau distillée, auquel sont rajoutés 0.25 mL de réactif de Folin et ciocalteus. Les tubes sont agités au vortex. Après 3 minutes d'incubation, 0.5 mL de la solution de carbonate de sodium ($\text{Na}_2 \text{CO}_3$) à 20% sont ajoutés ; l'ensemble est homogénéisé puis placé au bain-marie bouillant pendant 1 minute pour accélérer la réaction.

Après une heure de refroidissement, la densité optique est mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de $\lambda = 725 \text{ nm}$.

Les lectures sont faites après étalonnage du spectrophotomètre grâce à un blanc préparé à partir de 5 mL d'eau distillée additionnée de 0.25 mL du réactif du Folin.

3.3.6 - Méthode d'analyse statistique.

Les différences entre les moyennes ont été déterminées sur chaque lot de résultats, grâce à l'analyse de la variance (comparaison de plusieurs moyennes) qui est une technique relativement ancienne ; elle peut être simple ou multiple selon le nombre de facteur à tester.

L'analyse de la variance simple (Anova = Analysis of Variance) s'intéresse à l'effet d'un traitement sur une seule variable ou facteur ; il n'est cependant pas rare d'étudier simultanément les effets de deux ou de plusieurs variables (Manova = Multiple Analysis of Variance).

F a une valeur théorique de 1. Les fluctuations d'échantillonnage de F seront connues si on connaît la probabilité pour que F soit dans un intervalle entourant 1 et délimité par des valeurs ou encore le risque d'erreur correspondant à cet intervalle.

Sa valeur de niveau P_0 où $P_0 = 5\%$ (ou bien 0.05) ou $P_0 = 1\%$ (ou bien 0.01), représente un indice décroissant de la fiabilité à l'acceptation d'un résultat observé P (avec $P =$ pourcentage observé ; et $P_0 =$ pourcentage théorique).

Si $P < P_0$, la différence est dite significative ;

Si $P > P_0$, la différence est dite non significative.

Tous les tests sont calculés à partir de l'application STATISTICA 5.1 pour Windows.

Résultats & Discussions

4 – Résultats & discussions

4.1 - Effet de l'obscurité et du norflurazon sur la morphologie des plantules de soja.

Les observations et les différentes analyses réalisées sur des plantules de soja au stade premières feuilles trifoliées permettent de voir l'effet de l'absence de lumière, ainsi que l'effet d'un herbicide qui appartient à la famille des Pyridazinones «norflurazon» sur la morphologie et la physiologie des plantes.



Photos 3. *Plantules de soja au stade premières feuilles trifoliées.*

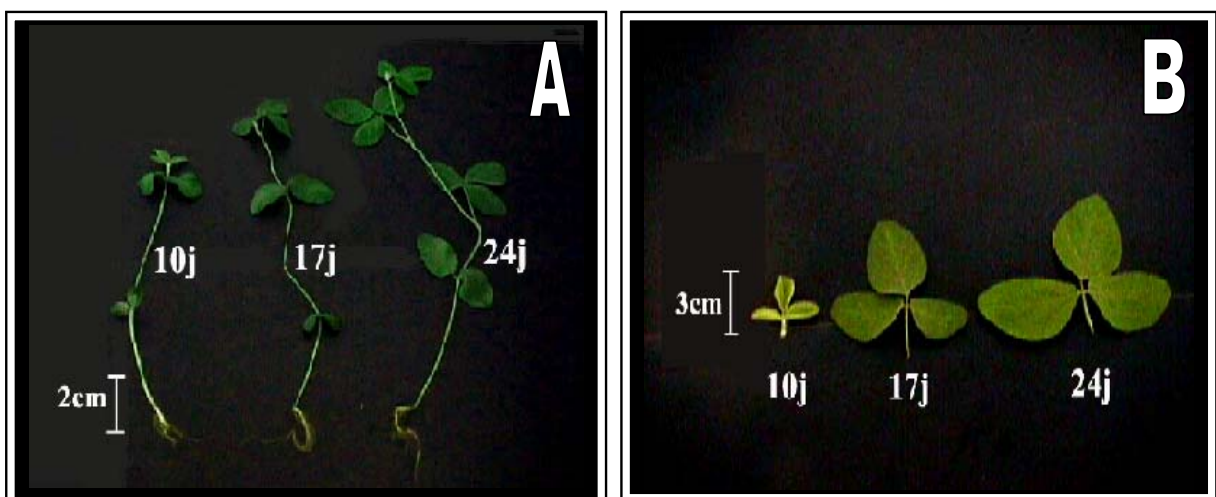


Photo 4. *Plantules (A) et feuilles (B) de soja témoins durant trois stades de développement.*

Les plantules croissant à la lumière (témoins) sont vigoureuses et présentent des feuilles de couleur verte. Les premières feuilles sont unifoliées (feuilles embryonnaires), les feuilles trifoliées se répartissent sur de nombreuses ramifications (Photos 3 et 4).

Comparativement aux plantules témoins, les plantules croissant à l'obscurité sont démesurément allongées, plus frêles et leurs feuilles sont réduites, dépigmentées et de couleur jaunâtre, c'est le phénomène d'étiollement (Photos 5A,B).

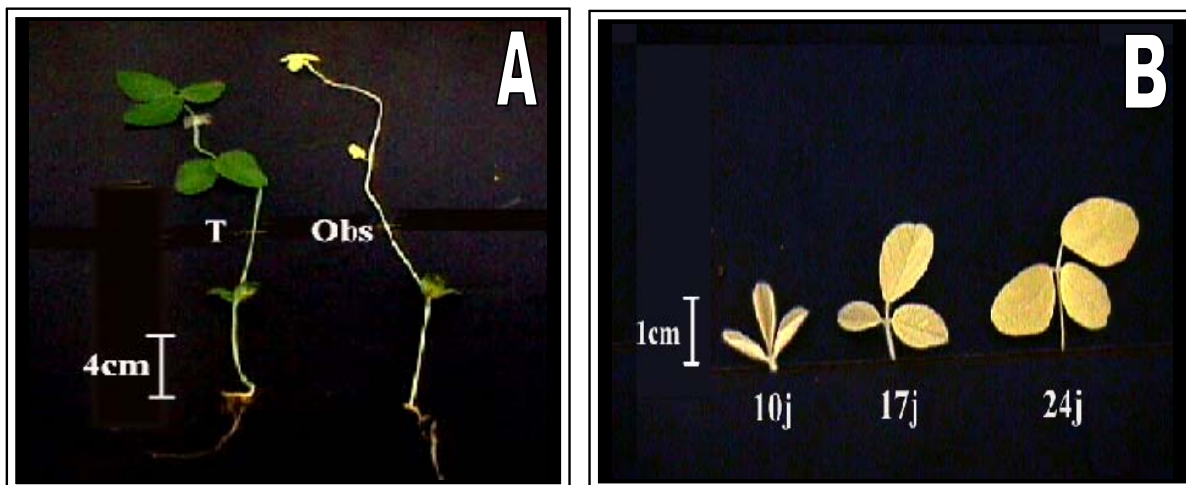


Photo 5. Effet de l'obscurité sur les plantules (A) et feuilles (B) de soja.

Le norflurazon est un herbicide appliqué généralement en présemis ou en prélevée, c'est un herbicide systémique d'application racinaire et à action foliaire. Il est absorbé par les racines, puis transporté par les vaisseaux de bois jusqu'aux feuilles où il exerce son action.

Le traitement par cet herbicide à différentes concentrations $10^{-6}M$, $10^{-5}M$, $10^{-4}M$ et $10^{-3}M$ est effectué sur les plantules après la formation de la feuille embryonnaire. Les observations ont été réalisées sur des plantules au stade première feuille trifoliée. La photo n°6 montre que les plantules témoins sont bien développées. Les plantules traitées sont plus petites, la réduction de la croissance des plantules traitées est dépendante de la dose appliquée.

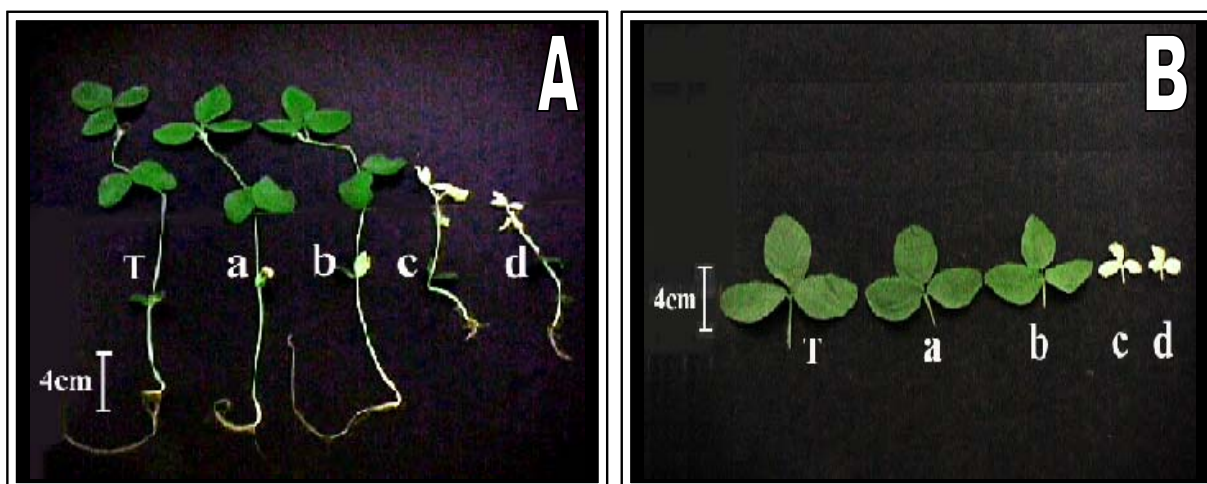


Photo 6. Effet du norflurazon sur les plantules (A) et les feuilles de soja (B) (les différentes concentrations du norflurazon : a = $10^{-6}M$, b = $10^{-5}M$, c = $10^{-4}M$, d = $10^{-3}M$).

Comparées aux plantules témoins, les plantules traitées au norflurazon aux doses $10^{-6}M$ et $10^{-5}M$, ne présentent pas de différences morphologiques notables (du point de vue taille et pigmentation) leur taille est sensiblement la même que celle des témoins (Photo 6A,B).

L'effet caractéristique de l'herbicide «norflurazon» aux doses $10^{-4}M$ et $10^{-3}M$ est le blanchissement des plantules entières, les feuilles sont soit entièrement ou partiellement chlorotiques. Cette dépigmentation débute par la base des feuilles et se propage au milieu du limbe foliaire (dépigmentation partielle), et parfois vers l'extrémité des feuilles (dépigmentation totale), c'est le phénomène de photobleaching qui entraîne la formation de plantes albinos (Duke et *al.*, 1982).

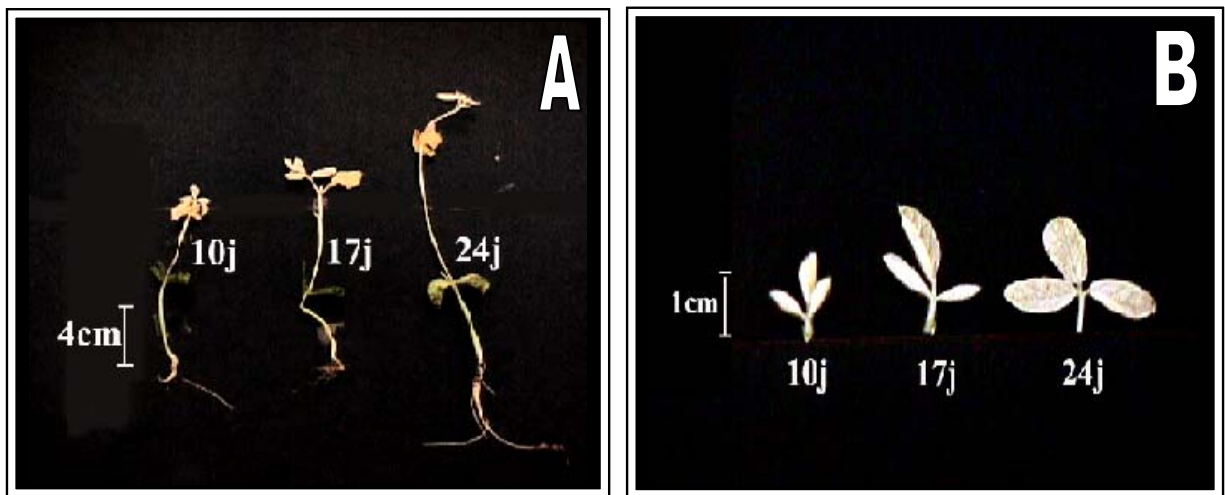


Photo 7. Effet du norflurazon à la dose $10^{-4}M$ sur les plantules (A) et feuilles (B) de soja durant trois stades de développement.

En plus de ce blanchissement, les plantules traitées présentent un ralentissement dans leur croissance, marqué par une réduction de la taille des tiges et des racines. De plus, les racines des plantules stressées comparées à celles des plantules témoins sont moins ramifiées. Les plantules stressées sont totalement desséchées et on remarque une absence de reprise d'activité des méristèmes apicaux et axillaires après la formation de la première feuille trifoliée (Photo 7A,B).

4.1.1 – Discussion.

Dans notre étude, les deux stress, obscurité et le norflurazon, agissent sur la morphologie de la plante de manière très différente. Les plantules croissant à l'obscurité présentent des feuilles réduites et jaunâtres ; néanmoins, la taille des tiges et des racines est affectée. Nous constatons une augmentation de la taille des plantules en longueur par prolongement excessif des entrenœuds par rapport au témoin et une diminution de l'épaisseur des tiges, c'est le phénomène d'étiollement. Par ailleurs, nous avons remarqué un léger flétrissement des feuilles dû probablement à une perte d'eau de ces dernières.

Le norflurazon a un effet négatif sur la croissance des plantules de soja. En effet, les plantules traitées à l'herbicide présentent une baisse de croissance par rapport aux plantules témoins ;

cette baisse est d'autant plus prononcée que la dose en herbicide est importante. Le norflurazon provoque également une accélération de la sénescence des feuilles. Sous l'effet d'une dose 10^{-4} M de norflurazon, les plantules sont albinos. Des résultats similaires (blanchissement) ont été mis en évidence sur le soja (Abrous *et al.*, 1998), sur une algue marine (*Scenedesmus actus*) (Kunert et Böger, 1979) et sur *Cyanobacterium synechoccus* (Linden *et al.*, 1990).

La dépigmentation et la réduction de la taille des plantules ayant reçues l'herbicide à de fortes doses (10^{-4} M et 10^{-3} M) ne peut être que le résultat de nombreuses perturbations des processus biochimiques et physiologiques, telles l'inhibition de la synthèse des caroténoïdes, dégradation des pigments chlorophylliens et la réduction de la synthèse des lipides (Abrous *et al.*, 1998).

4.2 - Les pigments chlorophylliens.

Suite à l'étiollement, à la dépigmentation et au blanchissement observés, nous avons étudié le taux des pigments chlorophylliens dans les feuilles des plantules de soja âgées de 17 jours.

4.2.1 - Effet de l'obscurité sur la teneur en pigments chlorophylliens des feuilles des plantules de soja.

Les résultats de la figure 18 montrent que chez les plantules de soja témoins, les taux de chlorophylles *a*, chlorophylles *b* et caroténoïdes atteignent respectivement $1.970 \pm 0.066 \mu\text{g.g}^{-1}$, $0.885 \pm 0.138 \mu\text{g.g}^{-1}$ et $0.524 \pm 0.033 \mu\text{g.g}^{-1}$. En revanche chez les plantules mises à l'obscurité, le taux de chlorophylles *a* et *b* et caroténoïdes atteignent respectivement $0.023 \pm 0.008 \mu\text{g.g}^{-1}$, $0.013 \pm 0.003 \mu\text{g.g}^{-1}$ et $0.064 \pm 0.011 \mu\text{g.g}^{-1}$. Les tests statistiques montrent des différences hautement significatives au seuil de 1% par rapport aux témoins.

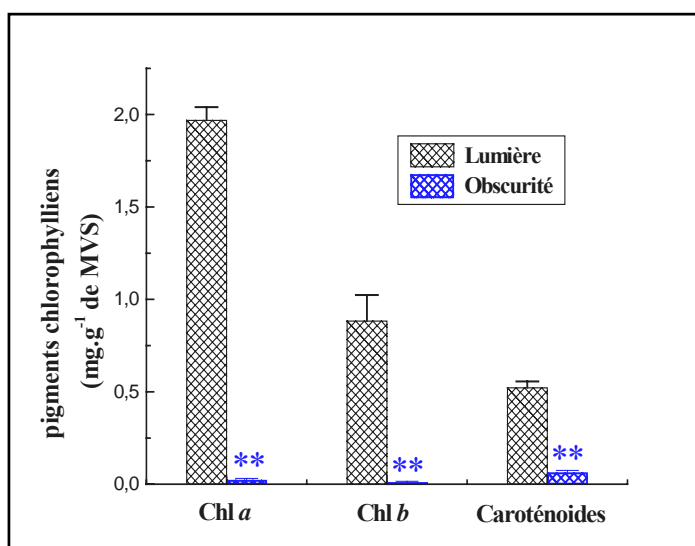


Figure 18. Evolution de la Teneur en chlorophylles *a* et *b* et en caroténoïdes des feuilles des plantules de soja âgées de 17 jours témoins et mises à l'obscurité (chaque valeur est la moyenne de trois manipulations différentes, ** $P < 0.01$ représente le niveau de significativité entre le témoin et le traité).

Nous notons une réduction de 98% de la teneur en chlorophylles *a* et *b* et de 86% pour la teneur en caroténoïdes dans les feuilles de plantules de soja mises à l'obscurité comparativement aux plantules témoins.

4.2.2 - Effet du norflurazon sur la teneur en pigments chlorophylliens des feuilles des plantules de soja.

Les pigments chlorophylliens des feuilles de plantules de soja moyennement âgées (17 jours), traitées par des concentrations croissantes de norflurazon 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M et 10^{-3} M ont été dosés. Les résultats montrent que chez le témoin, le taux de chlorophylles *a* et *b* est respectivement de $1.970 \pm 0.066 \mu\text{g.g}^{-1}$ et $0.885 \pm 0.138 \mu\text{g.g}^{-1}$; après traitement aux doses 10^{-6} M et 10^{-5} M, le taux de chlorophylles *a* et *b* est respectivement de $1.325 \pm 0.032 \mu\text{g.g}^{-1}$ et $0.508 \pm 0.015 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour la dose 10^{-6} M et de $1.014 \pm 0.093 \mu\text{g.g}^{-1}$ et $0.372 \pm 0.035 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour la dose 10^{-5} M ; les différences sont hautement significatives au seuil de 1%.

Pour les doses 10^{-4} M et 10^{-3} M du norflurazon, nous notons une absence totale de chlorophylles *a* et *b*, avec des différences hautement significatives (Fig.19A).

Il est à remarquer que les feuilles de plantules de soja traitées au norflurazon aux doses 10^{-6} M et 10^{-5} M demeurent vertes, et avec des réductions d'environ 30% et 50% pour la chlorophylle *a* respectivement pour les doses 10^{-6} M et 10^{-5} M comparativement aux témoins. Concernant la chlorophylle *b* la réduction par rapport aux témoins est plus importante, nous notons une baisse de 45% et 60% respectivement pour les doses 10^{-6} M et 10^{-5} M (Fig.19A).

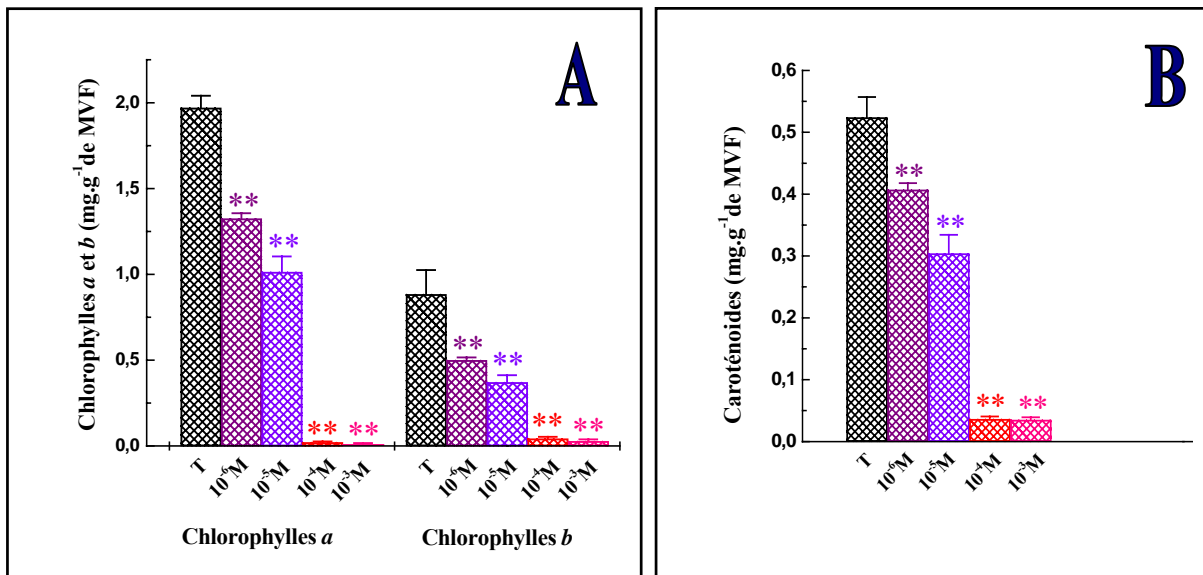


Figure 19. Evolution de la teneur en chlorophylles *a* et *b* (A) et en caroténoïdes (B) des feuilles des plantules de soja témoins et traitées au norflurazon (chaque valeur est la moyenne de trois manipulations différentes, ** $P < 0.01$ représente le niveau de significativité entre les témoins et les traités).

Concernant la teneur en caroténoïdes, le témoin présente un taux de $0.524 \pm 0.033 \mu\text{g.g}^{-1}$. Après traitement au norflurazon, cette teneur diminue de manière hautement significative (au

seuil de 1%) en fonction des doses du norflurazon 10^{-6}M , 10^{-5}M , 10^{-4}M et 10^{-3}M . Nous enregistrons respectivement des taux de $0.407 \pm 0.011 \mu\text{g.g}^{-1}$, $0.304 \pm 0.030 \mu\text{g.g}^{-1}$, $0.036 \pm 0.004 \mu\text{g.g}^{-1}$ et $0.035 \pm 0.004 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Fig.19B).

Le norflurazon réduit la teneur en caroténoïdes ; cette réduction est d'autant plus importante que la dose est élevée. En effet, les réductions enregistrées sont respectivement d'environ 20%, 40% pour les doses 10^{-6}M , 10^{-5}M , et de 93% pour les deux fortes doses du norflurazon (10^{-4}M et 10^{-3}M). Selon nos résultats l'effet de la dose 10^{-4}M sur la teneur en chlorophylles *a* et *b* et en caroténoïdes est similaire à celui de la dose 10^{-3}M , les deux concentrations du norflurazon provoquent le blanchissement des plantules.

Tableau V. *Rapports Chlorophylle a/b et Chlorophylle(a+b)/Caroténoïdes des première feuilles trifoliées des plantules de soja témoins, mises à l'obscurité et traitées au norflurazon..*

	Témoins	Obscurité	Concentrations en norflurazon			
			10^{-6}M	10^{-5}M	10^{-4}M	10^{-3}M
Rapport Chl <i>a/b</i>	2.22 ± 0.30	1.76 ± 0.31	2.60 ± 0.01	2.72 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.10 ± 0.05
Rapport Chl (<i>a+b</i>) Caroténoïdes	5.45 ± 0.59	0.56 ± 0.12	4.49 ± 0.05	4.56 ± 0.38	0.24 ± 0.04	0.17 ± 0.02

Les résultats du rapport chlorophylles *a/b* résumés au niveau du tableau V montrent que celui du témoin est de 2.22, ce dernier diminue pour les feuilles étiolées pour atteindre une valeur de 1.76, ce qui signifie que la chlorophylle *a* est plus affectée par l'obscurité que la chlorophylle *b*.

Concernant les feuilles des plantules traitées au norflurazon, le rapport chlorophylle *a/b* augmente légèrement pour atteindre 2.60 et 2.72 respectivement pour les doses 10^{-6}M et 10^{-5}M , Cette variation du rapport montre que c'est plutôt la chlorophylle *b* qui serait la plus affectée. Par contre, pour les feuilles des plantules traitées aux doses 10^{-4}M et 10^{-3}M , le rapport chlorophylle *a/b* diminue fortement par rapport au témoin, il est respectivement de 0.34 et 0.10. Cela signifie que les quantités de chlorophylles *a* et *b* sont très faibles et qu'elles sont affectées de la même manière par le norflurazon.

L'examen du même tableau montre que le rapport *chlorophylles totales/caroténoïdes* chute chez les feuilles étiolées ; il passe de 5.45 chez les feuilles de plantules témoins à 0.56 chez les plantules stressées. Ces résultats montrent que les chlorophylles (*a+b*) sont les plus affectée que les caroténoïdes.

Le norflurazon provoque une baisse de taux de pigments photosynthétiques. Toutefois, le rapport *chlorophylles totales/caroténoïdes* diminue pour les doses faibles de norflurazon, il passe de 5.45 chez les feuilles des plantules témoins à 4.49 et 4.56 respectivement pour les doses 10^{-6} M et 10^{-5} M. Ceci montre que les chlorophylles sont légèrement plus affectées que les caroténoïdes par le norflurazon. Par ailleurs, les fortes concentrations du norflurazon (10^{-4} M et 10^{-3} M) provoquent une diminution du rapport chlorophylles (*a+b*)/caroténoïdes par rapport au témoin, il est respectivement de 0.24 et 0.17.

4.2.3 - Discussion.

Lors de notre étude, nous remarquons que l'obscurité provoque une diminution de la teneur en caroténoïdes et une absence quasi-totale de chlorophylles, entraînant le phénomène d'étiollement. En effet, les plantules développées à l'obscurité ne synthétisent pas les chlorophylles, mais accumulent plutôt son précurseur : la protochlorophyllide (Schoefs et *al.*, 2000). La transformation de la protochlorophyllide en chlorophylle nécessite obligatoirement de la lumière.

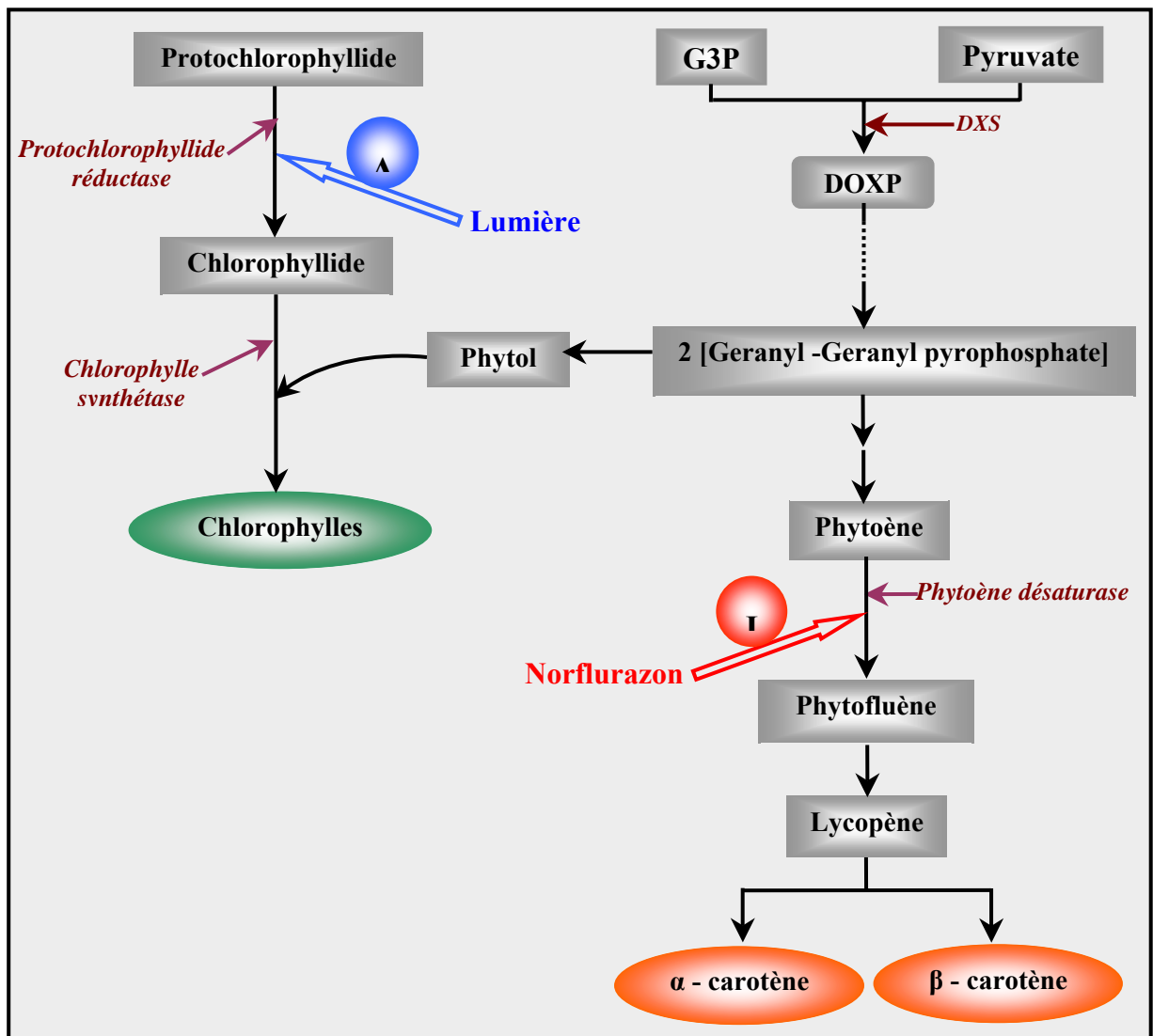


Figure 20. Effet de la lumière et du norflurazon sur la biosynthèse des pigments chlorophylliens (A : activation, I : inhibition).

Selon nos résultats, les plantules étiolées contiennent de très faibles quantités de chlorophylles. Des études ont montré que les plantes qui se sont développées à l'obscurité, peuvent contenir de petites quantités de chlorophylles (Durchan et *al.*, 1992). Cependant, cette chlorophylle n'est probablement pas synthétisée au cours de cette période, mais proviendrait plutôt d'un reliquat de la chlorophylle contenue dans l'embryon (Böddi et *al.*, 1999).

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet du norflurazon sur la teneur en pigments chlorophylliens. Le norflurazon entraîne des réductions très importantes de la teneur en chlorophylles et en caroténoïdes. Cette réduction est fonction de la dose appliquée. Pour les doses 10^{-6} M et 10^{-5} M bien que les feuilles soient vertes, le taux de pigments photosynthétiques diminue, de l'ordre de 30 à 60% pour les chlorophylles et de 10 à 40% pour les caroténoïdes.

Néanmoins, le norflurazon à de plus fortes concentrations (10^{-4} M et 10^{-3} M) en plus de son effet sur la croissance et la morphologie (réduction de la taille, les racines sont moins ramifiées, accélération de la sénescence...) des plantules de soja, provoque le blanchissement des feuilles. Ce type de bleaching a été mis en évidence pour la première fois par Bartels et *al.*, (1967) puis par Burns et *al.*, (1971) sur les radis en utilisant l'aminotriazole et par Bartels et Watson (1978) en utilisant les pyridazinones. Des résultats similaires (blanchissement) ont été mis en évidence également sur le soja (Abrous et *al.*, 1998 ; Lassouane, 2000).

Le norflurazon entraîne une altération du chloroplaste (Khan et *al.*, 1979 ; Duke, 1985 ; Joshi et *al.*, 1994), une photodestruction des ribosomes chloroplastiques (70s) (Bartels et Hyde, 1970) et une diminution de l'activité photosynthétique liée à l'absence plus ou moins totale des pigments (Hilton et *al.*, 1969).

La forte diminution des caroténoïdes est due au blocage de leur biosynthèse par inhibition du fonctionnement de la phytoène désaturase, enzyme clé de la biosynthèse des caroténoïdes, principale cible du norflurazon (Wilkinson, 1989 ; Scalla, 1991 ; Bramley, 1994). Cette enzyme permet la desaturation du phytoène en phytofluène ce qui a pour conséquence l'accumulation du phytoène (Ridley, 1982 ; Linden et *al.*, 1990) (Fig.20).

La diminution du taux de chlorophylles dans les tissus prétraités serait un processus secondaire, provoqué par la photo-oxydation des chlorophylles due à une absence de photo-protection des chlorophylles par les caroténoïdes (Bartels et Hyde, 1970 ; Burns et *al.*, 1971 ; Kummel et Grimme, 1975).

Nos résultats sont en accord avec ceux de nombreux auteurs, qui utilisent des pyridazinones substituées. Ainsi Bartels et Hyde (1970) observent une diminution du taux des chlorophylles et des caroténoïdes chez les plantes supérieures traitées au SAN 6706. Lichtenthaller et Keleudgen (1977) ont noté un effet similaire sur les plantules de radis (*Raphanus*) et d'orge (*Hordeum*) toujours traitées au SAN 6706.

4.3 - Effet de l'obscurité et du norflurazon sur le métabolisme phénolique des feuilles des plantules de soja.

Le métabolisme des substances phénoliques est régulé par l'activité de plusieurs enzymes ; la première étape nécessaire pour la synthèse des squelettes phénylpropanoïdes chez les plantes

supérieures est la désamination de la L-phénylalanine, aboutissant à la formation de l'acide trans-cinnamique (Dixon *et al.*, 1992 ; Kacperska, 1993). Cette réaction est catalysée par la PAL, laquelle est considérée comme étant l'enzyme clé permettant le passage du métabolisme primaire au métabolisme secondaire, et principalement vers la biosynthèse des composés phénoliques (Kacperska, 1993 ; Rösler *et al.*, 1997).

❖ 4.3.1 - Etude de l'activité de la Phénylalanine Ammonia-Lyase (PAL) des feuilles des plantules de soja.

Cette étude a été réalisée sur des plantules de soja âgées de 17 jours, dans des conditions normales de luminosité (16/8, J/N), à l'obscurité, et en présence du norflurazon à différentes concentrations. L'activité de la PAL est exprimée en μg d'acide cinnamique formé par heure par mg de protéines foliaires.

4.3.1.1 - Effet de l'obscurité sur l'activité de la PAL des feuilles des plantules de soja.

La figure 21 représente l'activité de la PAL à la lumière et à l'obscurité. Nous remarquons que l'activité PAL la plus importante est observée à la lumière ; elle est de l'ordre de $54.14 \pm 14.35 \mu\text{g.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines. Cette activité est plus réduite à l'obscurité ; elle est de $12.74 \pm 1.7 \mu\text{g.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines, avec une différence hautement significative au seuil de 1% comparativement au témoin. En effet nous constatons une baisse de 76% par rapport au témoin. Ces résultats montrent que l'activité de l'enzyme est lumière dépendante où elle est activée par la lumière.

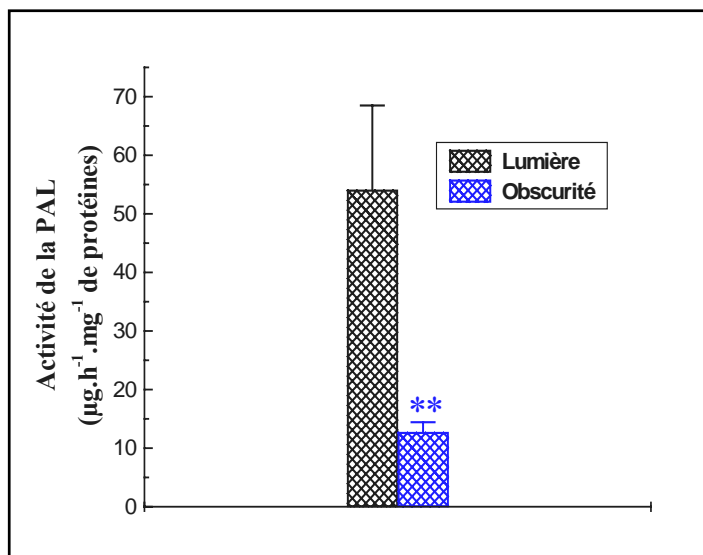


Figure 21. Effet de l'obscurité sur l'activité de la PAL des feuilles des plantules de soja (chaque valeur est la moyenne de trois manipulations différentes, ****P < 0.01** représente le niveau de significativité entre le témoin et le traité).

4.3.1.2 – Effet du norflurazon sur l'activité de la PAL des feuilles des plantules de soja.

La figure 22 illustre l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase en fonction des différentes concentrations du norflurazon montre une diminution de l'activité de la PAL.

A des doses élevées, le norflurazon provoque une diminution très importante de l'activité PAL des feuilles des plantules analysées. En effet, la quantité d'acide cinnamique formée par heure et par mg de protéines passe de $54.14 \pm 14.35 \mu\text{g}$ dans les plantules témoins à $28.00 \pm 7.00 \mu\text{g}$ pour la dose 10^{-4}M et de $18.74 \pm 2.08 \mu\text{g.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines foliaires pour la dose 10^{-3}M avec des différences hautement significatives au seuil 1% pour la dose 10^{-3}M et significatives au seuil de 5% pour la dose 10^{-4}M du norflurazon.

A partir des doses de 10^{-6}M et 10^{-5}M , nous constatons une baisse de l'activité mais dans des proportions plus faibles qui sont respectivement de 39.04 ± 4.60 , $32.48 \pm 2.50 \mu\text{g.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines foliaires, le test statistique montre une différence significative au seuil de 5% pour la dose 10^{-5}M du norflurazon, en revanche, elle ne l'est pas pour la dose 10^{-6}M .

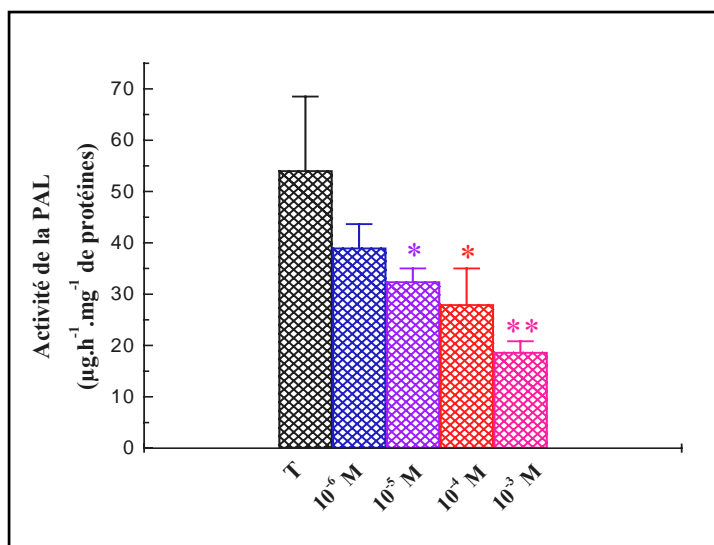


Figure 22. Effet du norflurazon sur l'activité de la PAL des feuilles des plantules de soja (chaque valeur est la moyenne de trois manipulations différentes, ** $P < 0.01$ et * $P < 0.05$ représente le niveau de significativité entre les témoins et les traités).

Le norflurazon inhibe l'activité de la PAL ; l'intensité de l'inhibition augmente avec la concentration de l'herbicide. Les réductions d'activité enzymatique enregistrées sont de 30%, 45%, 50% et 65% respectivement pour les doses 10^{-6}M , 10^{-5}M , 10^{-4}M et 10^{-3}M du norflurazon comparativement au témoin.

Le norflurazon provoque donc, même à des concentrations très faibles (10^{-5}M), une diminution significative de l'activité phénylalanine ammonia-lyase des feuilles de plantules de soja.

4.3.1.3 - Discussion :

L'analyse des résultats obtenus chez les feuilles mises à l'obscurité révèle une diminution très importante de l'activité PAL ; cette baisse est probablement due à une régulation par la lumière. La PAL est donc une enzyme lumière dépendante (Richter, 1993).

En ce qui concerne les feuilles des plantules de soja traitées au norflurazon, l'activité de la PAL diminue en fonction des doses appliquées. Des résultats similaires ont été observé par Vallée (1975) en faisant une étude comparative de l'activité de la PAL chez une dicotylédone (le tabac) et une monocotylédone (le blé) en appliquant deux herbicides différents (piclorame qui est un herbicide auxinique et atrazine appartenant à la famille des triazines). Il a constaté que les modifications de l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase, après application d'une substance à caractère herbicide semble différente chez les monocotylédones et les dicotylédones, et dépend surtout du type d'herbicide employé (Vallée et *al.*, 1975).

4.3.2 - Effet de l'obscurité et l'herbicide sur les composés phénoliques des feuilles des plantules de soja.

4.3.2.1 - Les anthocyanes.

Nous avons suivi l'évolution de la quantité d'anthocyanes durant les trois stades de développement des feuilles des plantules de soja.

La quantité d'anthocyanes des feuilles témoins augmente en fonction de l'âge de la feuille, elle est de $5.13 \pm 0.37 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS chez les feuilles jeunes (de 10 j), puis elle augmente de 26% pour atteindre une valeur de $6.93 \pm 1 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS chez les feuilles âgées de 17 j avec une différence significative au seuil de 5%, les anthocyanes s'accumulent fortement pour atteindre une valeur de $10.00 \pm 2.02 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS chez les feuilles de plantules âgées de 24j, soit le double de la quantité trouvée dans les feuilles des plantules jeunes (Fig.23) avec une différence hautement significative au seuil de 1%.

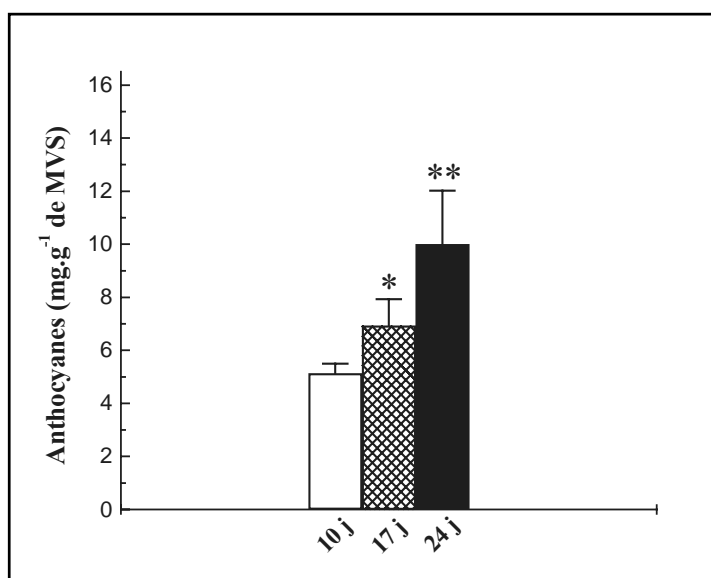


Figure 23. Evolution de la teneur en anthocyanes des feuilles des plantules témoins de soja durant la croissance (chaque valeur est la moyenne de trois manipulations différentes, ** $P < 0.01$ et * $P < 0.05$ représente le niveau de significativité entre les témoins aux différents stades de développement).

Ces résultats montrent que la quantité d'anthocyanes augmente avec l'âge de la plante. Les feuilles des plantules plus âgées sont caractérisées par une forte accumulation d'anthocyanes

4.3.2.1.1 – Effet de l'obscurité sur la teneur en anthocyanes des feuilles des plantules de soja.

Concernant les feuilles des plantules de soja étiolées, la teneur en anthocyanes est de $5.90 \pm 0.45 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS chez les jeunes feuilles, puis elle est de $7.28 \pm 0.05 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS chez les feuilles âgées (17 j), ensuite nous notons chez les feuilles très âgées (24 j), une valeur de $9.43 \pm 0.45 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS (Fig.24).

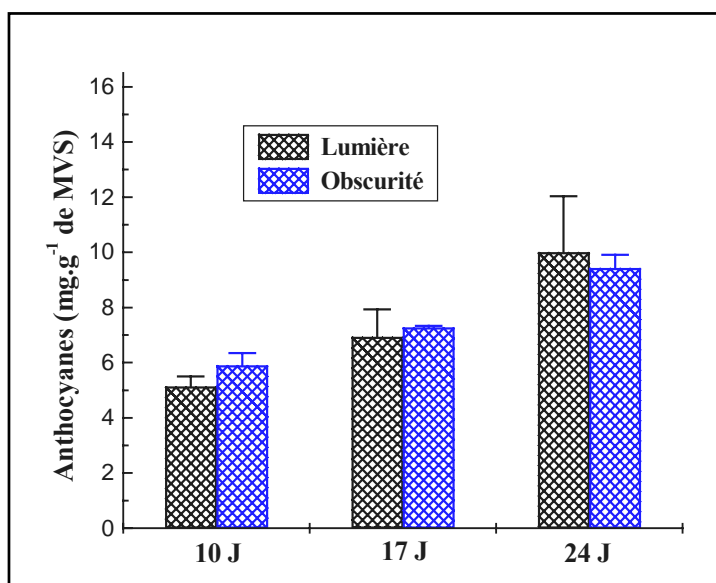


Figure 24. Evolution de la teneur en anthocyanes dans les feuilles des plantules de soja durant la croissance à la lumière et à l'obscurité (chaque valeur est la moyenne de trois manipulations différentes, le niveau de significativité est nulle).

Le taux d'anthocyanes chez les plantes témoins et étiolées varie peu, en effet les différences entre les deux lots ne sont pas significatives au seuil de 5%.

Chez les feuilles étiolées l'accumulation des anthocyanes durant les différents stades de développement se fait de la même manière que chez les feuilles témoins. Les tests statistiques montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les plantules témoins et les plantules stressées, cela indique que la synthèse des anthocyanes n'est pas affectée par l'absence de la lumière.

4.3.2.1.2 - Effet du norflurazon à 10^{-4}M sur la teneur en anthocyanes des feuilles des plantules de soja.

Les plantules de soja sont traitées au norflurazon à une concentration de 10^{-4}M avant l'apparition des premières feuilles trifoliées. Nous avons choisi cette concentration d'herbicide parce qu'elle provoque le blanchissement des feuilles. La plante devient albinos et les feuilles sont peu développées.

La teneur en anthocyanes des feuilles de plantules de soja traitées au norflurazon est semblable quelque soit le stade de développement. Des teneurs de $10.24 \pm 0.53 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS, $11.71 \pm 0.13 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS et de $10.98 \pm 0.35 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS chez les feuilles âgées de 10j, 17 et 24 jours respectivement sont enregistrées (Fig.25).

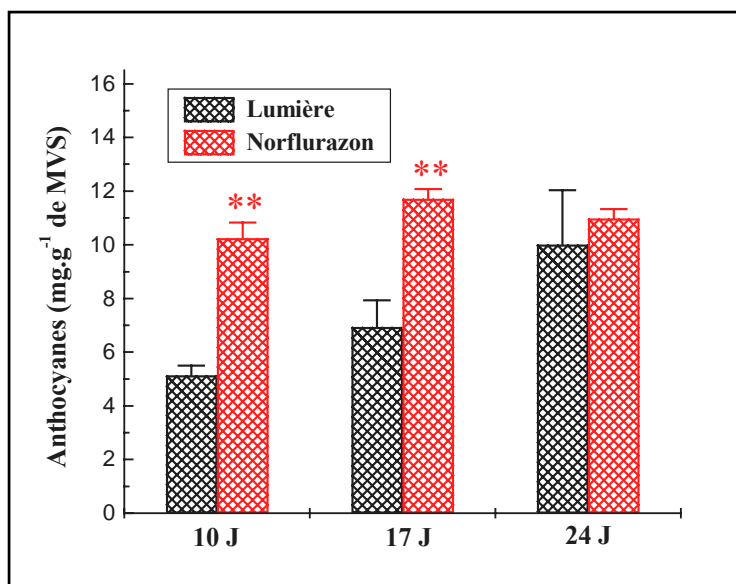


Figure 25. Evolution de la teneur en anthocyanes dans les feuilles durant la croissance des plantules soja traitées au Norflurazon (chaque valeur est la moyenne de trois manipulations différentes, ****P < 0.01** représente le niveau de significativité entre les témoins aux différents stades de développement).

La quantité d'anthocyanes des feuilles formées après le traitement est plus importante que celle du témoin pour les feuilles jeunes et moyennement âgées ; cette quantité augmente de manière hautement significative au seuil de 1%, de 50% et 41% respectivement pour les feuilles de 10 jours et de 17 jours. Par ailleurs, chez les feuilles plus âgées (24 j), le taux d'anthocyanes est presque égale à celui du témoin. Toutefois, la différence n'est pas significative au seuil de 5% comparativement au témoin (Fig.25).

4.3.2.1.4 – Discussion.

L'ensemble des résultats montrent que la teneur en anthocyanes des feuilles de plantules témoins augmente légèrement en fonction du stade de développement pour atteindre son maximum dans les feuilles les plus âgées (Fig.26).

L'accumulation des anthocyanes, après irradiation UV a été signalée au cours du vieillissement (Lindoo et Caldwell, 1978 ; Balakumar et al., 1993 ; Dunning et al., 1994 ; Mazza et al., 1999). En effet, les fortes concentrations d'anthocyanes protègent les plantes et les tissus contre les radiations UV (Takahashi et al., 1991 ; Stapleton et Walbot, 1994 ; Bürger et Edwards, 1996), et réduisent le potentiel des dommages photo-oxydatives des cellules (Hoch et al., 2001).

Par ailleurs, des photorécepteurs tel que le phytochrome seraient impliqués dans la synthèse des anthocyanes (Mol et *al.*, 1996). Il existerait deux voies de synthèse anthocyanes avec des régulations différentes : l'UV-B qui induirait la synthèse des anthocyanes, alors que le phytochrome modulerait la quantité des anthocyanes (Takeda et Abe, 1992 ; Reddy et *al.*, 1994). En outre, l'induction de la synthèse des anthocyanes est peut-être régulée aussi par les stades de développement de la plante ou par les paramètres environnementaux (Shichijo et *al.*, 1993).

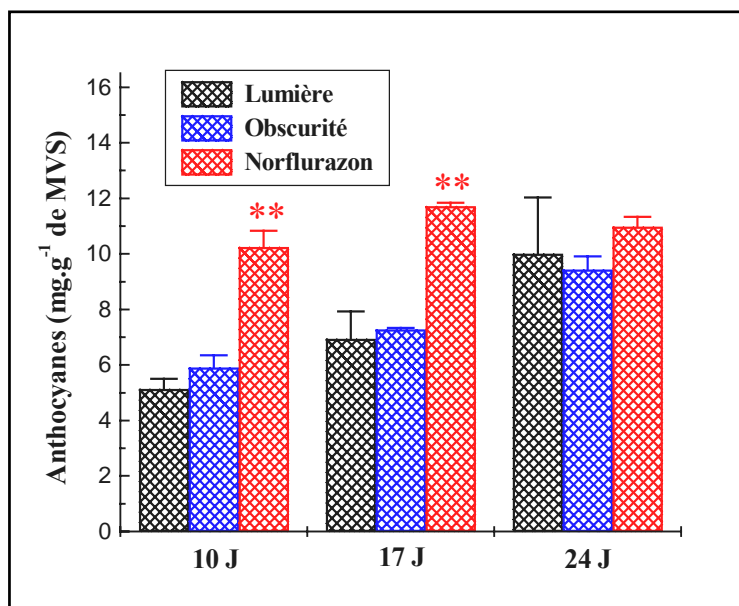


Figure 26. Effet de l'obscurité et l'herbicide sur la teneur en anthocyanes des feuilles des plantules de soja (chaque valeur est la moyenne de trois manipulations différentes, ** $P < 0.01$ représente le niveau de significativité entre les témoins aux différents stades de développement).

En ce qui concerne les plantules mises à l'obscurité, l'évolution de la teneur en anthocyanes suit la même allure que celles des témoins quelque soit le stade de développement. Donc l'absence de la lumière ne semble pas affecter la teneur en anthocyanes ; l'UV-B ne peut pas être le seul photoinducteur. Les différents stress environnementaux peuvent induire la sénescence des feuilles (Nozzolillo et *al.*, 1990 ; Krol et *al.*, 1995), et provoquent une forte pigmentation en anthocyanes (Drumm-Herrel et Mohr, 1985 ; Krause et *al.*, 1995 ; Hoch et *al.*, 2001).

L'application du norflurazon sur des plantules de soja donnent des réponses différentes de celles mises à l'obscurité. Comparant les plantules traitées au norflurazon durant les trois stades de développement, nous notons presque la même quantité d'anthocyanes avec des différences non significatives entre les trois stades, ainsi, nous constatons que le norflurazon favorise l'accumulation des anthocyanes durant les deux premiers stades physiologiques (10 j et 17 j), où nous notons à leur niveau des différences hautement significatives entre les plantules traitées au norflurazon et les plantules témoins au seuil 1%, alors que chez les plantules très âgées, on enregistre aucune différence significative comparativement au témoin.

L'accumulation des anthocyanes est un signe de vieillissement de la feuille, en favorisant cette accumulation dès le stade jeune (10 j), le norflurazon accélère la sénescence des plantules de soja.

4.3.2.2 - Les aglycones flavoniques.

L'évolution des aglycones flavoniques est suivie en fonction du stade de développement des feuilles de plantules de soja.

4.3.2.2.1 – Effet de l'obscurité sur la teneur en aglycones flavoniques des feuilles des plantules de soja.

Nos résultats montrent que les feuilles jeunes (10 j) des plantules témoins âgées de 10 jours accumulent une quantité importante d'aglycones flavoniques $0.49 \pm 0.02 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS, celle-ci ne varie pas de manière significative chez les feuilles âgées (17 j) atteignant une valeur de $0.43 \pm 0.12 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS, puis nous notons une réduction de 60% chez les feuilles les plus âgées (24 j) soit $0.27 \pm 0.04 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS avec une différence hautement significative au seuil de 1% pour ce dernier (Fig.27). Chez les plantes témoins, la quantité d'aglycones flavoniques diminue avec le vieillissement.

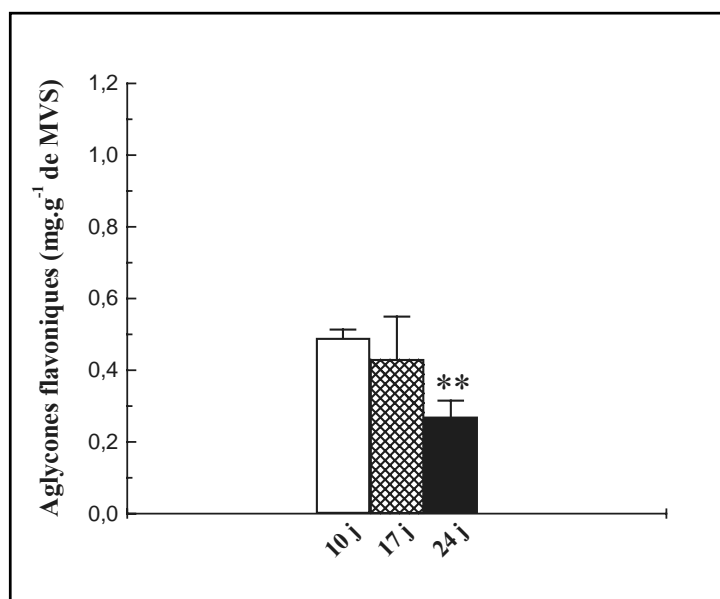


Figure 27. Evolution de la teneur en aglycones flavoniques dans les feuilles durant la croissance des plantules soja (chaque valeur est la moyenne de trois manipulations différentes, ****P < 0.01** représente le niveau de significativité entre les témoins aux différents stades de développement).

L'ensemble des résultats de la figure 28 met en évidence les faits suivants chez les plantules soumises à l'obscurité :

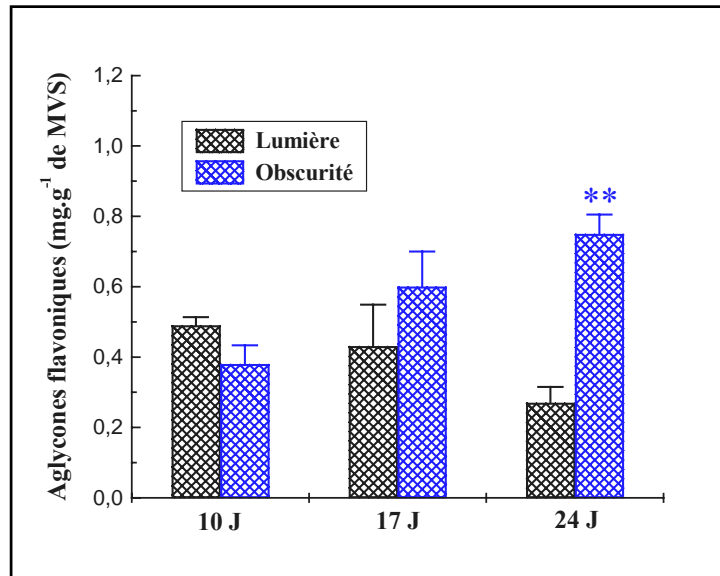


Figure 28. Evolution de la teneur en aglycones flavoniques dans les feuilles durant la croissance des plantules de soja témoins et mises à l'obscurité (chaque valeur est la Moyenne de trois manipulations différentes, ****P < 0.01** représente le niveau de significativité entre les témoins et les traités).

Le taux d'aglycones flavoniques évolue de manière différente à la lumière et à l'obscurité. En effet nous notons une teneur de $0.38 \pm 0.05 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS, $0.60 \pm 0.1 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS et de $0.75 \pm 0.05 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS respectivement pour les feuilles des plantules étiolées âgées de 10, 17 et 24 jours. La différence est hautement significative au stade 24 jours où nous enregistrons une augmentation de 64% comparativement au témoin.

4.3.2.2.2 - Effet du norflurazon sur la teneur en aglycones flavoniques des feuilles des plantules de soja.

Sous l'effet de la dose 10^{-4}M du norflurazon, nous remarquons une légère diminution de la teneur en aglycones flavoniques, en fonction du stade du développement. En effet, elle atteint des valeurs de $0.65 \pm 0.05 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS, $0.51 \pm 0.04 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS et de $0.44 \pm 0.04 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS et cela respectivement selon l'âge de la feuille (Fig.29).

La teneur en aglycones flavoniques augmente de 27% chez les feuilles jeunes des plantules de soja traitées au norflurazon par rapport aux témoins, avec une différence hautement significative ($P < 0.01$), puis elle est presque égale à celle des témoins au deuxième stade (17 j), et enfin cette teneur augmente de manière hautement significative par rapport au témoin au seuil de 1%, soit une augmentation de 39%.

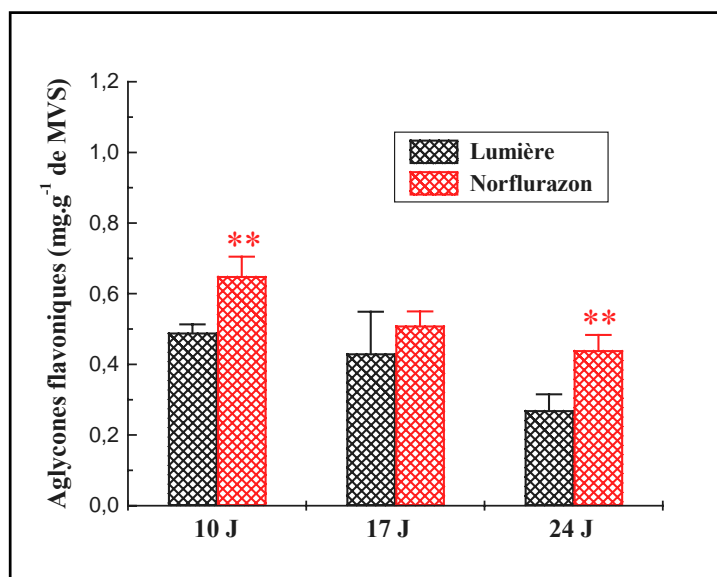


Figure 29. Evolution de la teneur en aglycones flavoniques dans les feuilles durant la croissance des plantules de soja témoins et traitées au Norflurazon (chaque valeur est la moyenne de trois manipulations différentes, ** $P < 0.01$ représente le niveau de significativité entre les témoins et les traités).

4.3.2.2.3 – Discussion.

Au cours du développement des plantules à l'obscurité, une accumulation des aglycones flavoniques est de plus en plus intense avec le vieillissement des feuilles, ceci s'explique par le fait que la phase de développement foliaire caractérise donc une étape d'anabolisme flavonique pour les feuilles étiolées (Fig.30).

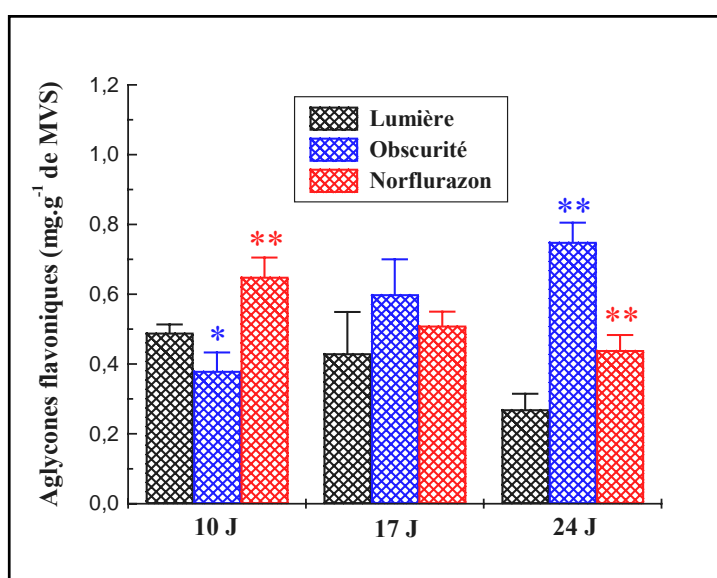


Figure 30. Effet de l'obscurité et du norflurazon sur la teneur en aglycones flavoniques des feuilles des plantules de soja (chaque valeur est la moyenne de trois manipulations différentes, ** $P < 0.01$ et * $P < 0.05$ représente le niveau de significativité entre les témoins et les traités).

Les feuilles de plantules jeunes de soja témoins et traitées au norflurazon semblent privilégier la voie de synthèse des aglycones flavoniques, par contre chez les feuilles de plantules âgées, on note une diminution de ces derniers. L'accumulation flavonique dans les jeunes feuilles de soja est la résultante d'une biosynthèse dominante pendant la période de croissance, cette accumulation peut-être expliquée par le rôle de ses derniers dans la protection contre les radiations UV (Cockell et Knowland, 1999 ; Forkman et heller, 1999 ; Tegelberg et Julkunen-Tiitto, 2001).

Le norflurazon favorise la synthèse des aglycones flavoniques chez les feuilles de plantules jeunes de soja. Par ailleurs l'obscurité favorise la synthèse des aglycones flavoniques plutôt chez les feuilles des plantules plus âgées.

4.3.2.3 - Les acides phénols.

Nous avons suivi l'évolution de la quantité d'acides phénols durant les trois stades de développement des feuilles des plantules de soja.

4.3.2.3.1 - Effet de l'obscurité sur la teneur en acides phénols des feuilles des plantules de soja.

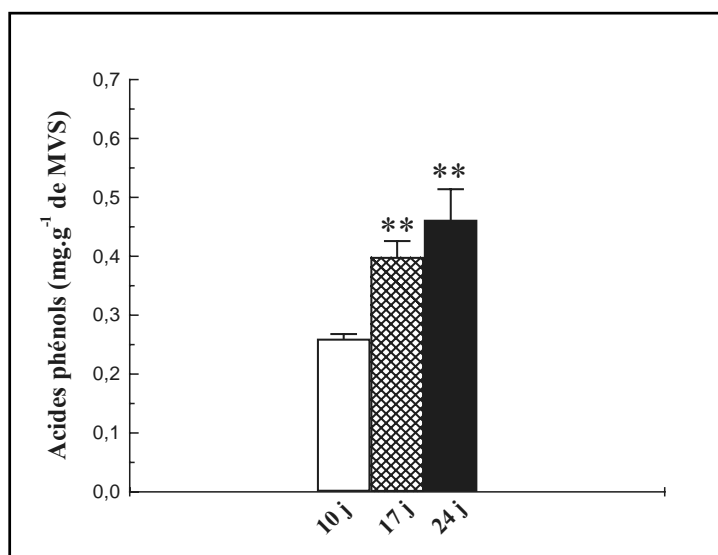


Figure 31. Evolution de la teneur en acides phénols durant la croissance des feuilles de plantules de soja témoins (chaque valeur est la moyenne de trois manipulations différentes, ****P < 0.01** représente le niveau de significativité entre les témoins aux différents stades de développement).

Nous remarquons que la teneur en acides phénols augmente en fonction de l'âge de la feuille des plantules témoins. Elle est de $0.260 \pm 0.008 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS chez les feuilles jeunes, et de $0.39 \pm 0.02 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS chez les feuilles moyennement âgées, par la suite, elle augmente pour atteindre $0.46 \pm 0.05 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS chez les feuilles les plus âgées. Ainsi les différences entre les feuilles âgées de 17 j et de 24 j n'ont pas été significatives, alors qu'ils le sont avec les feuilles âgées de 10 j au seuil de 1% (Fig.31).

La teneur en acides phénols chez les plantules mises à l'obscurité est très faible par rapport aux témoins quelque soit le stade de développement (Fig.32).

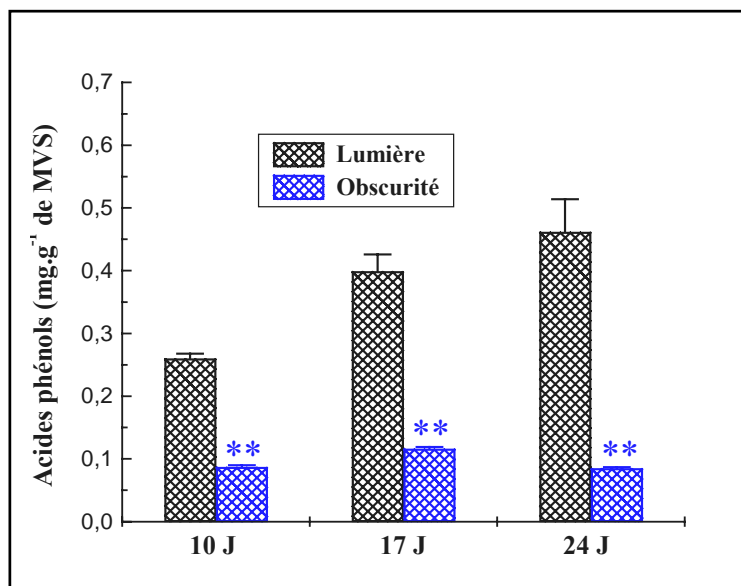


Figure 32. Evolution de la teneur en acides phénols dans les feuilles durant la croissance des plantules de soja témoins et mises à l'obscurité (chaque valeur est la moyenne de trois manipulations différentes, ****P < 0.01** représente le niveau de significativité entre les témoins et les traités).

Comparativement aux plantules témoins, le taux d'acides phénols chez les plantules mises à l'obscurité est très faible, il est de $0.087 \pm 0.003 \text{ mg.g}^{-1}$, $0.116 \pm 0.003 \text{ mg.g}^{-1}$ et de $0.085 \pm 0.002 \text{ mg.g}^{-1}$ respectivement pour les feuilles des plantules de 10, 17 et 24 j. Les différences entre les témoins et les stressées sont hautement significatives au seuil de 1% durant les trois stades de développement.

La forte réduction de la teneur en acides phénols par rapport au témoin est de 63%, 71% et 82% respectivement pour les plantules de 10, 17 et 24 j.

4.3.2.3.2 - Effet du norflurazon sur la teneur en acides phénols des feuilles de plantules de soja.

Chez les plantules traitées aux norflurazon, la teneur en acides phénols des feuilles des plantules jeunes est de $0.070 \pm 0.002 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS ; cette teneur reste presque égale pour le stade de 17 j ($0.072 \pm 0.004 \text{ mg.g}^{-1}$) ensuite elle diminue chez les feuilles de plantules de 24 j pour atteindre $0.065 \pm 0.003 \text{ mg.g}^{-1}$ (Fig.33).

Le norflurazon réduit la teneur en acides phénols, les réductions enregistrées selon le stade de développement sont respectivement de 75%, 80% et de 84% pour les stades 10 j, 17 j et 24 j.

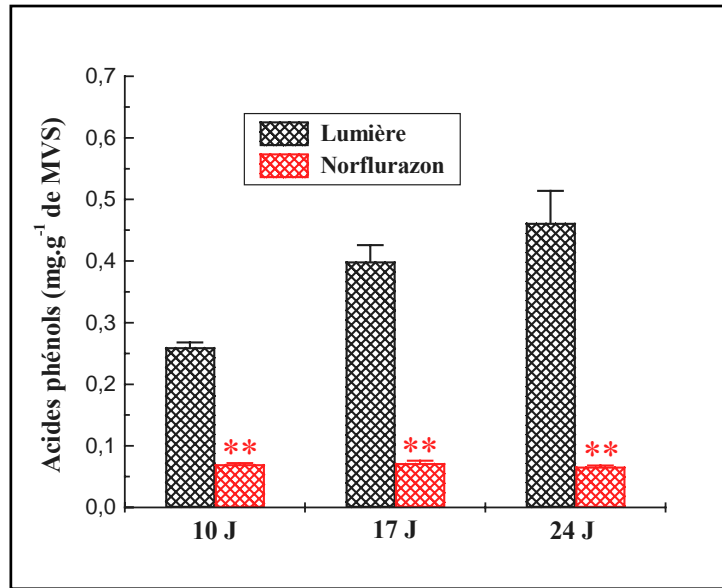


Figure 33. Evolution de la teneur en acides phénols dans les feuilles durant la croissance des plantules de soja témoins et traitées au norflurazon (chaque valeur est la moyenne de trois manipulations différentes, ** $P < 0.01$ représente le niveau de significativité entre les témoins et les traités).

4.3.2.3.3 – Discussion.

L'analyse de la teneur en acides phénols chez les plantules témoins révèle une augmentation de cette dernière en fonction des stades de développement.

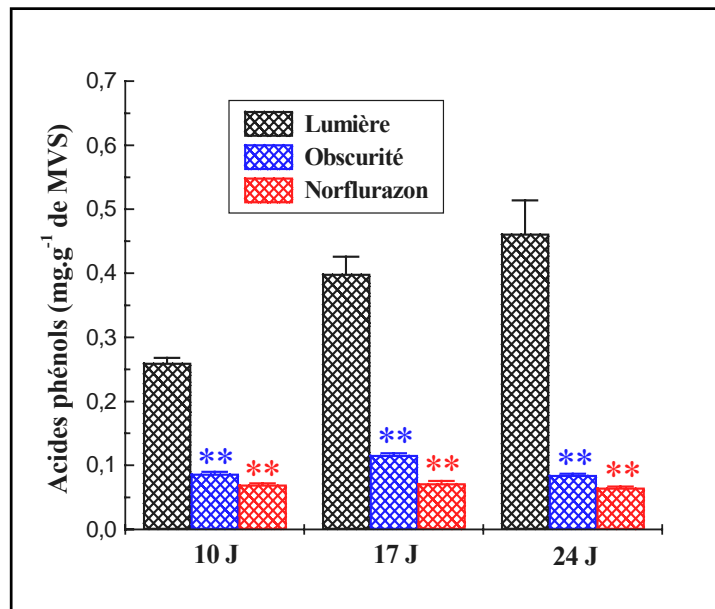


Figure 34. Effet de l'obscurité et du norflurazon sur la teneur en acides phénols des feuilles des plantules de soja (chaque valeur est la moyenne de trois manipulations différentes, ** $P < 0.01$ représente le niveau de significativité entre les témoins et les traités).

Ces résultats sont en accord avec ceux des travaux faits par Kolb et *al.*, (2001) sur des feuilles de raisin, qui montre une augmentation des acides hydroxycinnamiques plus particulièrement l'acide cafeique et l'acide coumarique sous trois conditions d'exposition (lumière visible, lumière visible + UV-A et lumière visible + UV-A + UV-B).

La lumière visible augmente la quantité des phénols totaux, en conclusion la lumière visible puissante déclenche spécifiquement la synthèse des acides hydroxycinnamiques (Mirecki et Teramura, 1984).

Compte tenu de nos résultats, nous constatons que la forte réduction de la teneur en acides phénols chez les plantules de soja traitées au norflurazon agissent de la même manière que celles mises à l'obscurité, avec des différences non significatives entre les deux traitements au seuil de 5%.

Discussion & Conclusion

générales

Discussion générale

Lors de la première partie de notre travail nous avons montré que les plantules privées de lumière présentent des chloroses dues à la disparition des chlorophylles, un allongement spectaculaire des entre-nœuds dû à une élongation excessive des cellules. La rhizogénèse est réduite, la croissance des plantes s'arrête dès que ses réserves sont épuisées, la plante dépérit, c'est le phénomène d'étiollement (Heller, 1982).

Le norflurazon, herbicide appartenant à la famille des pyridazinones, appliqué à de fortes concentrations (10^{-4}M et 10^{-3}M), réduit la quantité des pigments photosynthétiques par inhibition du développement des chloroplastes et blocage de la synthèse des caroténoïdes (Ben-Aziz et Koren, 1974) due à l'inhibition de la phytoène désaturase, enzyme clé de la biosynthèse des caroténoïdes principale cible du norflurazon (Wilkinson, 1989 ; Scalla, 1991). Parmi les effets causés par le norflurazon, chloroses et bleaching sont dues à l'absence de protection des chlorophylles contre l'oxygène actif par les caroténoïdes. Par ailleurs, le norflurazon provoque d'autres effets tel que l'inhibition de la réaction de Hill (Moreland et Hill, 1962 ; St John et Hilton, 1976) et la modification du métabolisme lipidique (Hilton et *al.*, 1971 ; Abrous et *al.*, 1998).

L'effet des deux stress sur la croissance en longueur des plantules de soja est différent. Les plantules qui se sont développées à l'obscurité présentent une croissance en longueur plus importante, cette croissance en longueur est réalisée au dépend de la croissance en épaisseur, dans ce cas on pourrait supposer que l'efficacité des hormones de croissance tel que l'AIA (acide indoylacétique) ou GA (l'acide gibbérilique) dans la stimulation de l'élongation cellulaire est renforcée à l'obscurité, mais l'explication est insuffisante car à l'obscurité toutes les synthèses, y compris celles des facteurs de croissance sont perturbées (Heller, 1982). Aussi, les mécanismes accumulateurs et transformateurs d'énergie (photosynthèse et respiration) sont perturbés ce qui a pour conséquence l'absence de l'énergie nécessaire à la synthèse des différents composants de la matière vivante et donc de la paroi, ainsi, la fragilité de la plante est aussi due à une paroi très fine (Tissut et Severin, 1984).

Dans le cas des plantules traitées au norflurazon la réduction de la croissance est due probablement à une baisse d'accumulation du carbone due à une réduction de la capacité photosynthétique, et donc la diminution de la biomasse des feuilles. Par conséquent, l'abaissement du pool de carbone aurait pour conséquence une inhibition de la synthèse des protéines. Par ailleurs, la croissance des plantules peut-être aussi affectée par la modification du métabolisme durant le traitement des plantules de soja par le norflurazon due à l'orientation du pool de carbone vers la voie des phénylpropanoïdes plutôt que vers celles des métabolites primaires (sucres, protéines,...etc) (Laakso et *al.*, 2000).

Nos différents résultats montrent aussi, que la régulation de la synthèse des composés phénoliques est fonction du stade physiologique des plantes, et de la répartition des carbohydrates entre le métabolisme primaire et secondaire (Matsuki, 1996).

Il est intéressant de noter que la diminution de la quantité d'aglycones flavoniques est parallèle à l'augmentation des anthocyanes en fonction de l'âge des plantules témoins.

La quantité des acides phénols augmente aussi avec l'âge des plantules, cela signifie que plus les plantules sont âgées plus l'accumulation des anthocyanes et des acides phénols est intense (Fig.35). Nous pouvons souligner qu'indépendamment de tout stress, il existe également une régulation liée au stade de développement des feuilles permettant de favoriser soit la biosynthèse des aglycones flavoniques ou celle des anthocyanes.

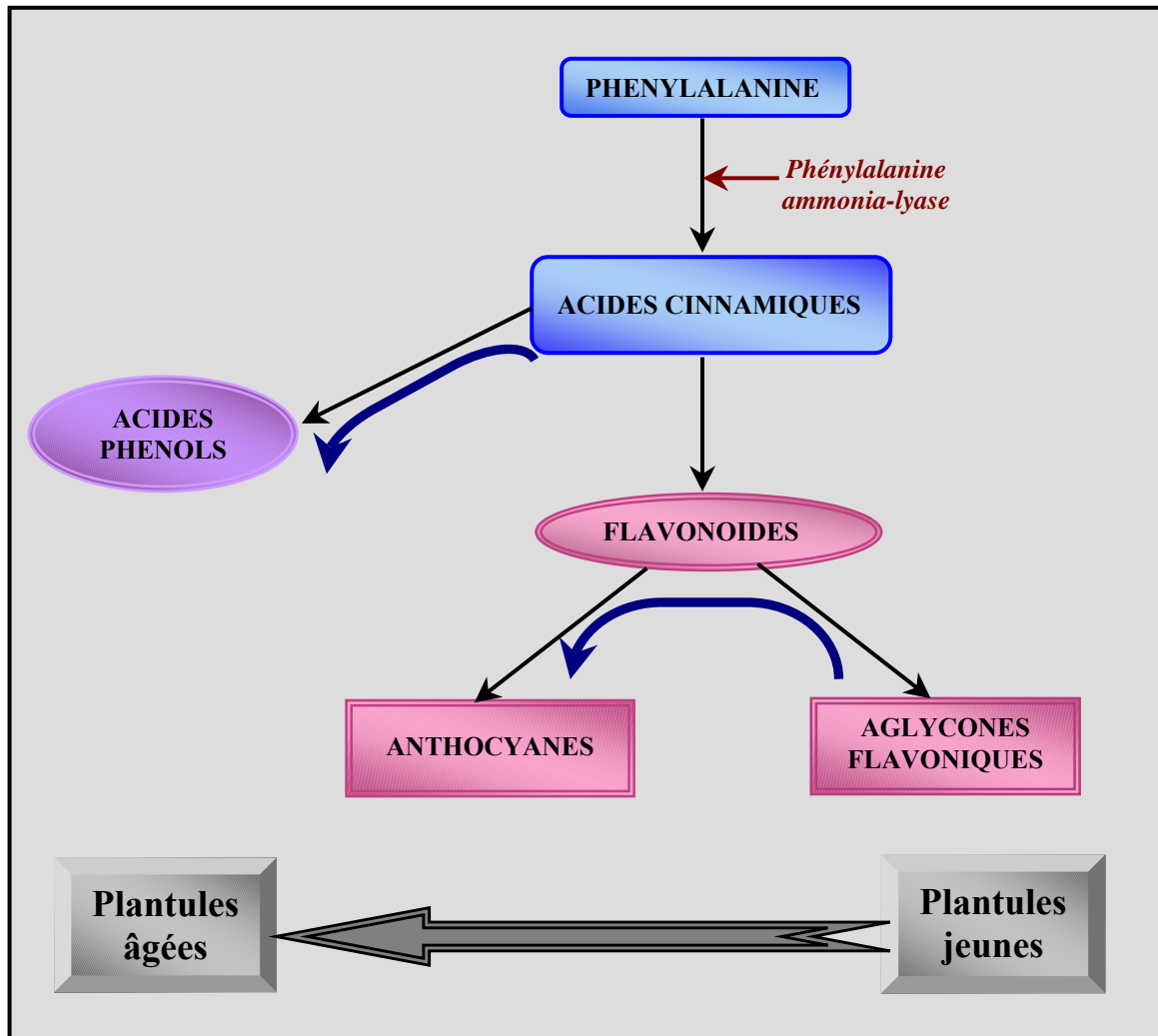


Figure 35. Schéma représentant les différentes substances phénoliques synthétisées en fonction des stades de développements chez les témoins.

En effet, la concentration des composés phénoliques chez les espèces végétales varie entre les types de plantes, les organes, les tissus et les stades de développement, et aussi par l'action des facteurs environnementaux (Bohm, 1987 ; Waterman et Mole, 1989 ; Dixon et Paiva, 1995).

Le passage du métabolisme primaire au métabolisme secondaire se fait grâce à la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), qui est considérée comme étant l'enzyme clé de la synthèse des composés phénoliques. En présence de la lumière, l'activité de la PAL des plantules de soja est activée, alors qu'elle diminue à l'obscurité.

Les plantules privées de lumière présentent une diminution importante de la quantité d'acides phénols, alors que celle des flavonoïdes est peu affectée. La PAL existe sous forme de plusieurs isoenzymes chacune d'entre elles est responsable d'un pool d'acides cinnamiques particulier. En revanche, l'obscurité inhiberait la PAL en provoquant une réduction du pool d'acides cinnamiques qui entraînerait une diminution des acides phénols. Par ailleurs, l'obscurité serait sans influence sur la PAL, responsable du pool d'acides cinnamiques qui interviennent dans la synthèse des flavonoïdes.

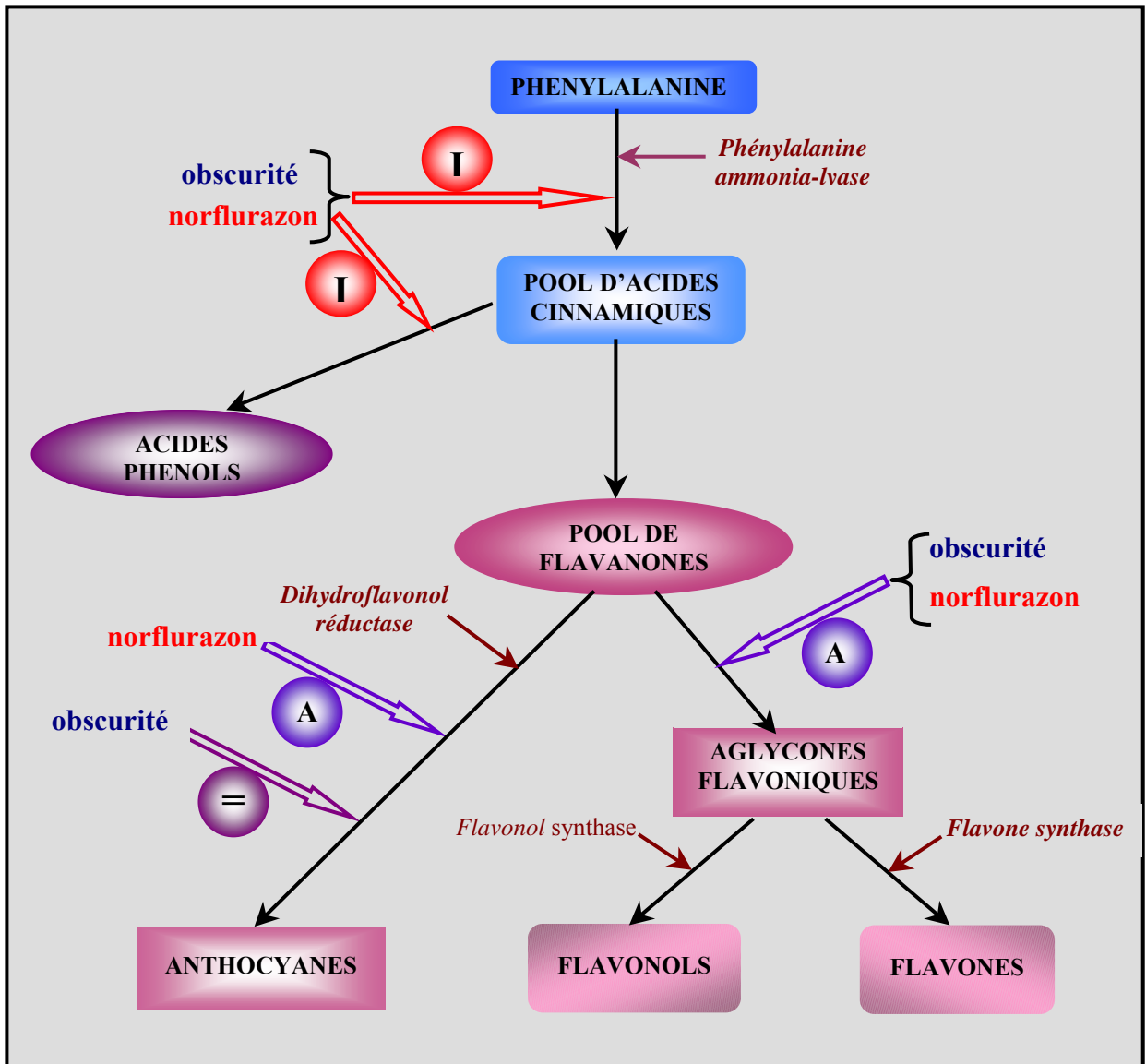


Figure 36. Schéma représentant l'effet du norflurazon et de l'obscurité sur le métabolisme phénolique (A : accumulation, I : inhibition et = : aucun effet).

Nos résultats montrent que l'obscurité n'altère pas la synthèse des anthocyanes des plantules de soja, car leur quantité évolue comme celles des plantules mises à la lumière, mais elle stimule celle des aglycones flavoniques, le taux de ces derniers augmente avec la croissance des plantules et atteint son maximum chez les plantules

sénescentes, cela est probablement dû à la stimulation des enzymes responsables de la synthèse des aglycones flavoniques.

En utilisant le norflurazon, l'activité de la PAL diminue avec l'intensité du traitement, cette baisse a pour conséquence la diminution de la quantité des acides phénols.

Les plantules de soja stressées au norflurazon stimulent la synthèse des anthocyanes dès leurs jeune âge jusqu'à l'âge adulte, alors que la quantité d'aglycones flavoniques augmente légèrement par rapport au témoin et diminue en fonction de l'âge de la plante.

L'obscurité et le norflurazon provoquent une diminution de l'activité de la PAL chez les feuilles de soja, la compréhension de la régulation de cette enzyme est compliquée davantage parce que l'enzyme peut être présente sous différentes formes et dans différents emplacement subcellulaires (Nishizawa *et al.*, 1979).

Nos résultats ont montré après application des deux stress séparément sur les plantules de soja une diminution importante de la quantité des acides phénols, alors que celle des flavonoïdes est peu affectée. Cette variation de la quantité de ces composés serait due à leur compétition pour le même substrat, nous pouvons penser à une sous régulation par la présence de plusieurs isoenzymes, qui oriente le taux de cinnamate vers la voie de la biosynthèse des flavonoïdes (Tegelberg et Julkunen-Tiitto, 2001). Par conséquent les deux stress inhibent la biosynthèse des acides hydroxycinnamiques.

Dans notre matériel, le pool d'acides cinnamiques est plutôt orienté vers la voie de la synthèse des flavonoïdes que celle des acides phénoliques, par l'activation de l'enzyme clé de la synthèse des flavonoïdes la chalcone synthase (CHS). Selon le type de stress, nous constatons une synthèse différente des flavonoïdes, ainsi l'absence de lumière provoque une accumulation des flavonols et des flavones, qui est peut-être due à une stimulation de la flavonol synthase (FLS) ou la flavone synthase (FS), l'application du norflurazon stimule plutôt la synthèse des anthocyanes probablement par l'activation de la dihydroflavonol réductase (DFR).

Conclusions

Les résultats obtenus au cours de cette étude nous permettent d'aboutir aux conclusions suivantes :

Du point de vue morphologique, l'obscurité accélère la croissance en longueur des plantules de soja au dépend de la croissance en épaisseur, les feuilles sont réduites et présentent des nécroses. Le phénomène d'étiollement a pour conséquence la diminution de la quantité des pigments chlorophylliens.

L'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), enzyme clé du métabolisme des substances phénoliques diminue sous l'effet de l'obscurité. Cette diminution de l'activité de l'enzyme réduit le pool des acides cinnamiques. Ce peu d'acides cinnamiques n'est pas orienté vers la synthèse des acides phénols, d'où la forte diminution de leur teneur.

L'absence de la lumière n'a aucun effet sur la teneur en anthocyanes, cette dernière reste parfaitement stable. Chez les plantules de soja témoins et stressées à l'obscurité, les anthocyanes occupent la majeure partie des flavonoïdes, la différence entre les deux catégories flavoniques (anthocyanes et aglycones flavoniques) est considérable. Cependant chez les plantules témoins l'augmentation des anthocyanes est parallèle à la diminution des aglycones flavoniques en fonction du stade de développement. Cette quantité d'anthocyanes augmente avec l'âge de la plante, ce qui signifie que les plantes sénescents accumulent plus d'anthocyanes.

L'obscurité augmente la quantité d'aglycones flavoniques chez les feuilles des plantules de soja en fonction du stade de développement et elle est stimulée surtout chez les feuilles sénescents, cela est probablement due à la stimulation de la flavonol synthase, enzyme responsable de la synthèse des flavonols.

Le norflurazon à une forte concentration (10^{-4} M) ralentit la croissance des plantules et provoque une accélération de la sénescence, et les feuilles et les tiges apparaissent de type albinos. Ces modifications morphologiques sont le résultat de multiples modifications des mécanismes physiologiques telle que l'inhibition de la biosynthèse des pigments chlorophylliens. Ainsi, la dose du norflurazon 10^{-4} M provoque une disparition quasi-totale des chlorophylles *a* et *b* qui est un phénomène secondaire dû à l'inhibition des caroténoïdes, par blocage du fonctionnement de la phytoène désaturase, enzyme clé de la biosynthèse des caroténoïdes. L'absence des caroténoïdes entraîne une photodestruction des chlorophylles.

Le norflurazon diminue l'activité de la PAL, qui se traduit par la diminution des acides phénols, stimule la synthèse des anthocyanes durant les trois stades de développement. Cependant la quantité d'aglycones flavoniques diminue en fonction de stade de développement des plantules de soja.

Il existe plusieurs isoenzymes localisées dans différents compartiments de la cellule.

- ☞ Il serait intéressant d'étudier l'activité des différentes PAL à la lumière et à l'obscurité par séparation des compartiments cellulaires.

Pour mieux comprendre la régulation du métabolisme des flavonoïdes, il serait intéressant de compléter ce travail par :

- ☞ Une étude de la régulation par la lumière de l'activité de la chalcone synthétase, la première enzyme responsable de la biosynthèse des flavonoïdes.
- ☞ Une étude de la régulation de la biosynthèse des flavonoïdes en déterminant le taux de transcrits des deux enzymes par des techniques de biologie moléculaire.

Références

bibliographiques

6 - Références bibliographiques

1. **Abrous O., Kesri-Benhassaine G., Trémolières A. et Mazliak P.,** 1998. Effect of norflurazon on lipid metabolism in soya seedlings. *Phytochemistry*, **29**, n° 4, pp 979 – 985.
2. **Ackashi T., Izumi K., Nagano E., Enmoto M., Mizuno K. et Shibaoka H.,** 1988. Effects of propyzamide on tobacco cell microtubules *in vivo* and *in vitro*. *Plant Cell Physiol.*, **29** : 1053 – 1062.
3. **Alibert G., Ranjeva R. et Boudet A.M.,** 1977. Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. *Physiol.Veg.*, **15** : 79 – 301.
4. **Amrhein N. et Zenk M.H.,** 1971. Untersuchungen zur rolle der phenylalanin ammonium-lyase (PAL) beider regulation der flavonoid synthese un buckweizen (*Fagopyrum esculentum Moench*). *Z. Pflanzenphysiol.*, **64** : 145 – 168. In NeuMann et al., 1991. L-phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase in seedling of *Oenothera* plasmotype dépendent regulation and tissue specific distribution.
5. **Bailey J.A. et Mansfield J.W.,** 1982. Phytoalexins. Eds John Wiley and Sons, New York.
6. **Balakumar T., Hani Babu Vincent V. et Paliwal K.,** 1993. On the interaction of UV-B radiations (280 – 315 nm) with water stress in crop plants. *Physiologia Plantarum*, **87** : 217 – 222.
7. **Bartels P.G. et Hyde A.,** 1970. Chloroplast development in 4-chloro5-(dimethylamino)-2-(α,α,α trifluoro-m-tolyl-3(2H))Pyridazinone, 1(SAN 6706) treated wheat seedlings. *Plant Physiol.*, **54** : 807 – 810.
8. **Bartels P.G. et Watson G.W.,** 1978. – Inhibition of carotenoids synthesis by fluridone and norflurazon. *Weed Sci.*, **26** : 198 – 203.
9. **Bartels P.G., Matsuda K., Siegel A. et Weier T.E.,** 1967. Chloroplastic ribosom formation inhibition by 3-amino-1-2-4- Triazol. *Plant Physiol.*, **41** : 736 – 741.
10. **Bath-Smith E.C.,** 1954. Leucoanthocyanidins formed from leucoanthocyanins in plant tissues. *Biochem. J.*, **58** : 122 – 125.
11. **Beggs C.J., Kuhn K., Böcker R. et Wellman E.,** 1987. Phytochrome-induced flavonoid biosynthesis in mustard (*Sinapis alba* L) cotyledons : Ezymic control and differential regulation of anthocyanin and quercetin formation. *Planta*, **172** : 121 – 126.

12. **Beggs C.L., Stoltzer-Jehle A. et Wellman E.**, 1985. Isoflavonoid formation as an indicator of UV stress in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves : The significance of photo-repair in assessing potential damage by increased solar UV-B radiation. *Plant Physiol.*, **79** : 630 – 634.
13. **Ben-Aziz A. et Koren E.**, 1974. Interference in carotenogenesis as a mechanism of action of the pyridazinone herbicide Sandoz 6706. *Plant Physiol.*, **54** : 916 – 920.
14. **Benveniste P., Boudet A.L., Douce R. et Joyard J.**, 2000. La dynamique du métabolisme. In *Le monde végétal : du génome à la plante entière*, Chap3., Douce R. ed., Tec et Doc, Londre-Paris-New york., pp 212.
15. **Bernards M.A. et Lewis N.G.**, 1992. Alkyl ferulates in wound healing potato tubers. *Phytochemistry*, **31** : 3409 – 3412.
16. **Bioley J.P. et Fiasson M.Jay.L.**, 1987. Mécanismes biochimiques du métabolisme secondaire dans la réaction des végétaux cultivés aux pathogènes fongiques et socio-economiques. Univer. Claud Bernard. Lyon., **1** : 7 – 18.
17. **Blount J.W., Dixon C.A. et Paiva N.L.**, 1992. Stress reponse in alfalfa (*Medicago sativa* L) XVI, Antifungal activity of medicarpin and its biosynthetic precursors implication for the genetic manipulation of stress metabolites. *Physiol Mol Plant Pathol.*, **41** : 333 – 349.
18. **Böddi B., Lindsten A et Sundqvist C.**, 1999. Chlorophylls in dark-grown epicotyls and stipula of pea. *J. Photochem. Photobiol. B : Biol* **48** : 11 – 16.
19. **Bohm B.A.**, 1987. Intraspecific flavonoid variation. *Bot. Rev.*, **53** : 197 – 279.
20. **Bongue-Bartelsman M. et Phillips D.A.**, 1995. Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiol. Biochem.*, **33** : 539 – 546.
21. **Bose S., Vijayan P., Santhanam R. et Kandasamy M.**, 1992. Inhibition of the action-induced reversibles changes in excitation energy distribution in thylakoids of BASF 13 – 338-grown plants. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1098** : 351 – 358.
22. **Boyeldieu J.**, 1991. Agriculture d'aujourd'hui produire des grains oleagineux et proteagineux, Science Technique Application
23. **Bradford M.**, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principale of protein – dye binding. *Anal. Biochem.*, **72** : 248 – 254.
24. **Bramley P.M.**, 1994. Carotenoid biosynthesis : Atraget site for bleaching herbicides. *Lipid biochemistry and pesticide action.*, **22** (2) : 525 –629.

25. **Brouillard R., Figueiredo P., Elhabiri M. et Dangles O.**, 1997. Molecular interactions of phenolic compounds in relation to the colour of fruits and vegetables. pp 30 - 49. In *Phytochemistry of fruit and vegetables*. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. Oxford, UK : Clarendon Press.
26. **Bruneton J.**, 1993. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Lavoisier, Tec. Doc (Ed.), Paris, pp 199 – 203.
27. **Burger J. et Edward G.E.**, 1996. Photosynthetic efficiency, and photodamage by UV and visible radiation, in red versus green leaf coleus varieties. *Plant Cell Physiology*, **37** : 395 – 399.
28. **Burns E.R., Buchanan G.A. et Garier M.C.**, 1971. Inhibition of carotenoid synthesis as mechanism of action of amitrol dichloramate and pyriclor. *Plant Physiol.*, **47** : 144 – 741.
29. **Camm E.L. et Towers G.H.N.**, 1973. Phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochem.*, **10** : 997 – 1005.
30. **Camm E.L., Mc Callum J., Leaf E. et Koupai-Abyazani M.R.**, 1993. Cold-induced purpling of *Pinus contorta* seedlings depends on previous day length treatment. *Plant Cell Environ.*, **16** : 761 – 764.
31. **Campbell M.M. et Sederoff R.R.**, 1996. Variation in lignin content and composition. *Plant Physiol.*, **110** : 3 – 13.
32. **Chaleff R.S. et Ray T.B.**, 1984. Herbicide-resistant mutants from tobacco cell cultures. *Science*, **223** : 1148 – 1151.
33. **Chalker-Scott L.**, 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology*, **70** : 1 – 9.
34. **Chamowitz D., Sandmann G. et Hirsch Berg J.**, 1993. Molecular and biochemical characterization of herbicide-resistant mutant of *cyanobacteria* reveal that phytoene desaturation is a rate-limiting step in carotenoid biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **268** : 17348 – 17353.
35. **Christie P.J., Alfenito M.R. et Walbot V.**, 1994. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways : Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*, **194** : 541 – 549.
36. **Cobbina J. et Miller M.M.**, 1987. Purpling in maize hybrids as influenced by temperature and soil phosphorus. *Agronomy Journal*, **79** : 576 – 582.
37. **Cockell C.S., Knowland J.**, 1999. Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol Rev Camb Phil Soc.*, **74** : 311 – 345.
38. **Cole D.J., Dodge A.D. et Careley J.C.**, 1980. Some biochemical effects of glyphosate on plant meristemes. *J. Exp. Bot.*, **31** : 1665.

39. **Czichi U. et Kindl H.**, 1975. Formation of P-comaric acid from L-phenylalanine by microsoma membrane fraction from potato evidence of membrane bound enzyme complex. *Planta*, pp 115 – 125.
40. **Davis A.O. et Harwood J.L.**, 1983. Effect of substutued pyridazinones on chloroplast structure and lipid metabolism in greening barley leaves. *J. Exp. Bot.*, **34** (146) : 1089 – 1100.
41. **Davis B.D.**, 1955. Advancs in enzymology., **16** : 247p.
42. **Deikman J. et Hammer P.E.**, 1995. Introduction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **108** : 45 – 57.
43. **Deyson G.**, 1982. Physiologie et biologie des plantes vasculaires : Nutrition et Métabolisme, Tome III., pp 212 – 223.
44. **Dixon R.A. et Paiva N.L.**, 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, **7** : 1085 – 1097.
45. **Dixon R.A., Harrison M.J., Paiva N.L.**, 1995. The isoflavonoid phytoalexin pathway : from enzymes to genes to transcription factors. *Plant Physiol.*, **93** : 385 – 392.
46. **Dixon R.A., Paiva N.L. et Bhattacharyya M.K.**, 1995. Enginneering disease resistance in olants : An overview. In *Molecular Methods in Plant Pathology*, R.P. Singh and U.S. Singh, eds (Boca Raton : CRC Press), PP 249 – 270.
47. **Dodge A.D.**, 1982. The role of light and oxygen in the action of photosynthetic inhibitor herbicides. In : « Biochemical responses induced by herbicides », Morland D.E., St John J.B. et Hess F.D.(eds), ACS. Sympos Series, American chemical society, Washigton., pp 57 – 77.
48. **Drumm-Herrel H. et Mohr H.**, 1985. Photosensitivity of seedlings differing in their potential to synthesize anthocyanin. *Physiologia Plantarum*, **64** : 60 – 66.
49. **Duke S.D., Vaughn K. et Duke S.H.**, 1982. Effect of norflurazon (San 9789) on light increased extractable nitrate reductase activity in soybean (*Glycine max L. Merr*). *Seedlings.Plant. Cell. Environ.*, **5** : 155 – 162.
50. **Duke S.O.**, 1985. Effects of herbicide on non photosynthetic biosynthesis processus. Vol.II. Herbicide physiology. CRC press. INC Bocaration, F.L., pp 92 – 106.
51. **Duke S.O.**, 1990. Overview of herbicide mecanisms of action. *Envirmental Health Perspectives*, **87** : 263 – 271.
52. **Duke S.O., Vaughn K.C. et Don Wauchope R.**, 1985. Effects of glyphosate on uptake, translocation, and intracellular localisation of metal cations in soybean (*Glycine max*) seedlings. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **24** : 384 – 394.

53. **Dunning C.A., Chalker-Scott L. Et Scott J.D.**, 1994. Exposure to UV-B radiation increased cold hardiness in rhododendron. *Physiologia Plantarum*, **92** : 516 – 520.
54. **Durchan M., Pakshina EV. et Lebedev N.N.**, 1992. Traces of chlorophyll *a* and the spectral forms of protochlorophyll(ide) *a* in etioled Cucumber cotyledons. *Photosynthetica*, **28** : 567 – 572.
55. **Durst F.**, 1974. Contribution à l'étude de la régulation de la phénylalanine ammonia-lyase dans les tissus de tubercule de Topinambour cultivés *in vitro*. Thèse de doctorat. Eta-Sci-Nat, Strasbourg.
56. **Dutt S.K., Bal A.R. et Bandyopadhyay A.K.**, 1991. Salinity induced chemical changes in *Casuarina equisetifolia* Forst. Egypt. *J. Soil Sci.*, **31** : 57 – 63.
57. **Edwards R. et Gatehouse J.A.**, 1999. Secondary metabolism. Chapitre 8. Crop Protection Group, Departement of Biological Sciences, University of Durham, UK., pp 193 – 218. In P.J Lea. et R.C Leegood. *Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd edition, Ed Wiley. England. pp 364.
58. **Engelsma G.**, 1974. On the mecanism of the changes in PAL activity induced by UV and blue light in gherkin hypocotyls. *Plant Physiol.*, **54** : 702 – 705.
59. **Forkman G. et Heller W.**, 1999. Biosynthesis of flavonoids. In D. Barton., K. Nakanishi, eds, *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol 1. Elsevier, Amsterdam, pp 713 – 748.
60. **Freyssinet T.G.**, 1990. Résistance aux herbicides et transfert de gènes. *Phytoma*, **415** : 9 – 13.
61. **Garcia-Arenal F., Fraile A. et Sagasta E.M.**, 1978. The multiple phytoalexin response of bean (*Phaseolus vulgaris*) to infection by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Plant. Path.*, **13** : 151 – 156.
62. **Gauvrit C. et Gaillardon P.**, 1986. Diquat aminotriazole 2,4-D et glyphosate, autre types d'herbicides systémiques. *Phytoma. Défense des cultures*, **388** : 7 – 8.
63. **Graham T.L.**, 1991. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissue and in seed and root exudates. *Plant Physio.*, **95** : 594 – 603.
64. **Graham T.L.**, 1995. Cellular biochemistry of phenylpropanoid responses of soybean to infection by *Phytophthora sojae*. In M. Daniel., R.P Purkayastha, eds, *Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action*. Marcel Dekker, New York, pp 85 – 116.
65. **Guinard J.L.**, 1996. Biochimie végétale. 1^{er} édition. Eds Masson, Paris, pp 255.
66. **Guinard J.L.**, 2000. Biochimie végétale. 2^{ème} édition. Eds Dunod, Paris, pp 274.
67. **Hahlbrock K. et Scheel.**, 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40** : 347 – 369.

68. **Hahlbrock K.**, 1981. Flavonoids. In *Biochemistry of Plants*, Vol 7, P.K. Stumpf and E.E. Conn, eds (New York : Academic Press), pp 425 – 456.
69. **Harborne J.**, 1988. *Introduction to ecological biochemistry*. 3rd ed. New York : Academic Press.
70. **Heller R., Esnault R. et Lauce C.**, 1995. *Physiologie végétale, développement*. Masson, Paris : pp 215.
71. **Hilton J.L., Scharen A.L., St John J.B., Morelaud D.E. et Norr L.M.**, 1969. Mode of action of pyridazinones herbicides. *Weed Sci.*, pp 17 – 541.
72. **Hilton J.L., St.John J.B., Christiansen M.N. et Norris K.H.**, 1971. Interaction of lipoidal materials and a pyridazinone inhibitor of chloroplast development. *Plant Physiol.*, **48** : 171 – 177.
73. **Hoagland R.F., Duke S.O. et Elmore C.D.**, 1979. Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds III. Phenylalanine ammonia-lyase activity, free amino acids, soluble protein and hydroxyphenolic compounds in axes of dark-grown soybeans. *Plant Physiol.*, **46** : 357 – 366.
74. **Hoch W.A., Zeldin E.L. et Mc Cown B.H.**, 2001. Physiological significance of anthocyanins during autumnal leaf senescence. *Tree Physiology*, **21** : 1 – 8.
75. **Hopkins W.G.**, 1999. *Introduction to plant physiology. Molecules and metabolism*. Second edition. Ed. WILEY, New York, 512 p.
76. **Index phytosanitaire** 1993. INPV. Alger.
77. **Jensen R.A.**, 1985. Shikimate/arogenate pathway : Link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. *Plant Physiol.*, **66** : 164 – 168.
78. **Jordan BR.**, 2002. Molecular responses of plant cells of UV-B stress. *Funct. Plant. Biol.*, **29** : 909 – 916.
79. **Joshi M.K., Mohanty P. et Bose S.**, 1994. Inhibition of state transition and light harvesting., complex II phosphorylation mediated changes in excitation energy distribution in the thylakoide of SAN 9785 treated plants. *Z. Naturforsch.*, **50C** : 77 -85.
80. **Kacperska A.**, 1993. Water potential alteration-A prerequisite or a triggering stimulus for the development of freezing tolerance in over wintering herbaceous plants? in : **Li P.H**, Hardiness, CRC Press, Boca Raton., pp 73 - 91.
81. **Khan M.U., Lem N.W., Chandorkar K.R. et Williams J.P.**, 1979. Effect of substituted pyridazinones (SAN 6706, SAN 9774, SAN 9785) on glycerolipids and their associated fatty acids in the leaves of *Vicia faba* and *Hordium vulgare*. *Plant Physiol.*, **64** : 300 – 305.

82. **Khan S.U., Young J.G.**, 1977. The metabolism of aromatic compound in higher plant : purification and properties of phenylalanine desaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.*, **236** : 2692 – 2698.
83. **Khelifa N.**, 2002. Effets d'un herbicide : le sulfosulfuron sur la germination, le début de croissance et le métabolisme cellulaire des feuilles des plantules du soja (*Glycine max* L). tèse de Magister. FSB. USTHB. Alger., pp 76.
84. **Kolattukudy P.E. et Brown L.**, 1974. Inhibition of cuticular lipid biosynthesis in *Pisum sativum* by thiocarbamates. *Plant Physiol.*, **53** : 903 – 906.
85. **Kolb C.A., Käser M.A., Kopecky J., Zotz G., Riederer M. et Pfündel E.E.**, 2001. Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves. *Plant Physiol.*, Vol.27 ; pp 863 – 875.
86. **Koukol J. et Conn E.E.**, 1961. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J.Biol chem.*, **236** : 2692 – 2698.
87. **Krause G.H., Virgo A. et Winter K.**, 1995. High susceptibility to photoinhibition of young leaves of tropical forest trees. *Planta*, **197** : 583 – 591.
88. **Krol M., Gray G.R., Hurry N.M., Öquist G., Malek L. et Huner N.P.A.**, 1995. Low-temperature stress and photoperiod effect an increased tolerance to photoinhibition in *Pinus banksiana* seedlings. *Can. J. Bot.*, **73** : 1119 – 1127..
89. **Kummel H.W. et Grimme L.H.**, 1975. Inhibition carotenoids biosynthesis in green algae by SAN 6706, accumulation of phytoene and phytofluene in *Chlorella fusca*. *Z. Naturforsch.*, **30** : 333 – 336.
90. **Kunert K.J. et Böger P.**, 1979. Influenceof photobleaching herbicides on chlorophyll and carotenoids. *Z. Naturforsch.*, **30** : 333 – 336.
91. **Laakso K., Sullivan J.H. et Huttunen S.**, 2000. The effect of UV-B radiation on epidermal anatomy in loblolly pine (*Pinus teada* L.) and scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Cell and Environment*, **23** : 461 – 472.
92. **Lassouane N.**, 2000. Effet du norflurazon sur la morphologie, la teneur en pigments photosynthétiques et en protéines des plantules de soja (*Glycine max* L.) : étude comparative de deux types de traitements. Mémoire de DES, FSB (USTHB).
93. **Lea P. J. et Leegood R.C.**, 1999. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, Second edition. Ed Wiley. England, pp 364.
94. **Lebreton PH., Jay M., Voirin B. et Bouchez M.P.**, 1967. Analyse qualitative et quantitative des flavonoides. *Chim. Anal*, Vol.49., **7** : 375 – 383.
95. **Lehnen L.P. et Vaughn K.C.**, 1992. The herbicides sindone B disrupt spindle microtubule organizing centers. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **44** : 50 – 59.

96. **Leng P., Itamura H. et Yamamura H.**, 1993. Freezing tolerance of several *Diospyros* species and kaki cultivars as related to anthocyanin formation. *J. Jpn. Sco. Hort. Sci.*, **61** : 795 – 804.
97. **Li J., Ou-Lee T.M., Raba R., Amundson R.G. et Last R.L.**, 1993. Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell*, **5** : 171 – 179.
98. **Lichtenthaler H.K. et Keleudgen H.K.**, 1977. Effect of the herbicide SAN 6706 on biosynthesis of photosynthetic pigments and prenyl quinones in *Hordeum* seedling. *Z. Naturforsch.*, **32 C** : 236 – 240.
99. **Lichtenthaler H.K.**, 1987. Chlorophyll and caroténoid pigments of photosynthetic biomembranes : Methods in enzymology, **vol.148**.
100. **Lignowski E.M. et Scott E.G.**, 1992. Effect of trifluralin on mitoses. *Weed Sci.*, **20** : 267 – 270.
101. **Linden H., Sandmann G., Chamouitz D., Hirscheber G.J. et Böger P.**, 1990. Biochemical characterisation of synochoccus mutants selected against the bleaching herbicide norflurazon. *Pesticid. Biochem. Physiol.*, **36** : 46 – 51.
102. **Lindoo S.J. et Caldwell M.M.**, 1978. Ultraviolet-B radiation-induced inhibition of leaf expansion and promotion of anthocyanin production. *Plant Physiol.*, **61** : 278 – 282.
103. **Lois R.**, 1994. Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana* L. I. Mecanismos of UV-resistance in *Arabidopsis*. *Planta*, **194** : 498 – 509.
104. **Mannan R.M. et Bose S.**, 1985. BASF 13 – 338-induced changes, in the structure and functioning of the photosynthetic apparatus in wheat seedling. *Photochem. Photobiol.*, **41** : 63 – 72.
105. **Marschner H.**, 1991. Root-induced change in the avail ability of micronutrients in the rhizosphere. In *Plant Roots, the Hidden Half*, Y. Waisel, A. Eshel, et U. Kafkafi, eds (New York : Marcel Dekker, Inc.), pp. 503 – 528.
106. **Mastuki M.**, 1996. Regulation of plant phenolic synthesis : from biochemistry to ecology and evolution. *Aust. J. Bot.*, **44** : 613 – 634.
107. **Mazza C.A., Battista D., Zima A.M., Szwarcberg-Bracchitta M., Giordano C.V., Acevedo A., Scopel A.L. et Ballare C.L.**, 1999. The effect of solar ultraviolet-B radiation on the growth and yield of barley are accompanied by increased DNA damage and antioxidant responses. *Plant Cell and Environment*, **22** : 61 – 70.
108. **Mc Clure J.W.**, 1975. Physiology and function of flavonoids. In J.B Harborne., T.J Mbry., H Mabry, eds, the flavonoid. Academic Press, New York, pp 970 – 1055. In induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. Jill Deikman and Philip E., Hammer. *Plant Physiol.*, **108** : 47 – 57.

- 109. Mirecki R.M. et Teramura A.H.**, 1984. Effects of ultraviolet-B irradiance on soybean : V. The dependence of plant sensitivity on the photosynthetic photon flux density during and after leaf expansion. *Plant Physiol.*, **74** : 475 – 480.
- 110. Mo Y., Nagel C. et Taylor L.P.**, 1992. Biochemical Complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proc. Nati. Acad. Sci., USA*, **89** : 7213 – 7217.
- 111. Mol J., Jenkins G., Schäfer E. et Weiss D.**, 1996. Signal perception, transduction and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Critical Reviews in Plant Science*, **15** : 525 – 557.
- 112. Moreland D.E. et Hill K.L.**, 1962. Interference of herbicides with the Hill reaction of isolated chloroplasts *Weeds*, **10** : 229 – 236.
- 113. Mumford P.M.**, 1990. Dormancy break in seeds of *Impatiens grandulifera* Royale. *New Phytol.*, **115** : 171 – 175.
- 114. Nishizawa A.N., Wolosiuk R.A. et Buchanan B.B.**, 1979. Chloroplast phenylalanine ammonia-lyase from spinach leaves. Evidence for light-mediated regulation via the ferredoxin / thioredoxin system. *Planta*, **145** : 7 – 12.
- 115. Norman H.A. et St John J.B.**, 1987. Differential effects of substituted pyridazinone BASF 13-338, on pathway of monogalactosyl diacyl glycerol synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **85** : 684 – 688.
- 116. Nozolillo C., Isabelle P. et Das G.**, 1990. Seasonal changes in phenolics constituents of Jack pine seedlings (*Pinus banksiana*) in relation to the purpling phenomenon, *Canadian J of Botany*, **68** : 2010 – 2017.
- 117. Pueppke J.L.**, 1996. The genetics and biochemical basis for nodulation of legumes by Rhizobia. *Crit Rev Biotechnol.*, **16** : 1 – 51.
- 118. Rajasekharan R. et Sastry P.S.**, 1987. Effect of pyridazinone herbicides on lipid metabolism in Groundnut (*Arachis hypogea*) leaves. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **29** : 163 – 175.
- 119. Ray T.B.**, 1984. Site of action of chlorsulfuron. Inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plant Physiol.*, **75** : 827 – 831.
- 120. Rayan K.G., Swinny E.E., Winefield C. et Markham K.R.**, 2001. Flavonoid and UV photoprotection in *Arabidopsis* mutants. *Z naturforsch.*, **56C** : 745 – 754.
- 121. Reddy V.S., Gound K.V., Sharma R. et Reddy A.R.**, 1994. Ultraviolet-B-responsive anthocyanin production in a rice cultivar is associated with a specific phase of phenylalanine ammonia lyase biosynthesis. *Plant Physiol.*, **105** : 1059 – 1066.
- 122. Ribereau-Gayon.**, 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Dunod. Paris.

123. **Richter G.**, 1993. Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. Presses Polytechniques et Universitaire Romandes. pp .
124. **Ridley S.M.**, 1982. Carotenoids chemistry and herbicid action in : Carotenoids chemistry and biochemistry (Brittongand Goodwin T.W). Eds Pergamon press, Oxford., 353 – 362.
125. **Rivera-Vargas L.I., Cshmitthenner A.F. et Graham T.L.**, 1993. Soybean flavonoid effects on and metabolism by *Phytophthora sojae*. *Phytochemistry*, **32** : 851 – 857.
126. **Rosenthal G.A. et Berenbaum M.R.**, 1991. Herbivores : Their Ineractions With Secondary Metabolites. Vol.1. *The Chemical Participants*. 2rd ed. San Diego : Academic Press.
127. **Rösler J., Krefel F. et Sohmid I.**, 1997. Maize phenylalanine ammonia lyase activity. *Plant Physiol.*, **113** : 175 – 179.
128. **Saunders J.A. et McClure J.W.**, 1975. Phytochrome controlled phenylalanine ammonia-lyase in *Hordium vulgare* plastids. *Phytochemistry*, **14** : 1285 – 1289.
129. **Scalla R.**, 1991. Les herbicides : mode d'action et principes d'utilisation. Chap.IV. Mécanisme d'action phytotoxique des autres familles d'herbicides. INRA [Paris].
130. **Schoefs B., Hucek S. et Hušák M.**, 2000. Determination of the parameters of the unit cell consituting the prolamellar body. *Proceedings of the 12th European Congress on Electron Microscopy*. Sous press.
131. **Shaner D.L. et Reider M.L.**, 1986. Physiological responses of corn (*Zea mays*) to AC 234, 997 in combination with valine, leucine and isoleucine. *Pest. Biochem. Physiol.*, **25** : 248 – 257.
132. **Shichijo C., Hamada T., Hiraoka M., Johnson C.B. et Hashimoto T.**, 1993. Enhancement of red-induced anthocyanin synthesis in *sorghum* first internodes by moderate low temperature given in the pre-irradiation culture period. *Planta*, **191** : 238 – 245.
133. **St John J.B. et Hilton J.L.**, 1976. Structure versus activity of substituted pyridazinones as related to mecanism of action. *Weed Sci.*, **24** : 579 – 582.
134. **St John J.B.**, 1982. Effects of herbicides on the lipid composition of plant membrane, in Biochemical responses induced by herbicides, Moreland D.E., John H.B et Hess F.D. eds : Symposium series n°181. *American Chemical Society.*, Washington : 97 – 109.
135. **Stafford H.A.**, 1969. Changes in phenolic compounds and related enzymes in young plants of sorghum. *Phytochemistry*, **8** : 743 – 752.
136. **Stapleton A.E. et Walbot V.**, 1994. Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiology*, **105** : 881 – 889.

137. **Taiz L. et Zeiger E.**, 1998. Plant physiology. Second edition. Ed. SINAUER. Sunderland. 792 p.
138. **Takahashi A., Takeda K. et Ohnishi T.**, 1991. Light-induced anthocyanin reduces the extent of damage to DNA in UV-irradiated *Centaurea cyanus* cells in culture. *Plant Cell Physiology*, **32** : 541 – 547.
139. **Takeda J. et Abe S.**, 1992. Light-induced synthesis of anthocyanin in carrot cells in suspension. IV. The action spectrum. *Photochem. Photobiol.*, **56** : 69 – 74.
140. **Tegelberg R. et Julkunen-Tiitto R.**, 2001. Quantitative changes in secondary metabolites of dark-leaves willow (*Salix myrsinifolia*) exposed to enhanced ultraviolet-B radiation. *Physiologia Plantarum*, **133** : 541 – 547.
141. **Tignor M.E., Davies F.S., Sherman W.B. et Davis J.M.**, 1997. Rapid freezing acclimation of *Poncirus trifoliata* seedlings exposed to 10 degrees C and long days. *Hort Science*, **32** : 854 – 857.
142. **Tissut M. et Severin F.**, 1984. Plantes, herbicides et desherbage, Association de coordination agricole, Paris : 251.
143. **Vallee J.C., Paynot M., Martin C., Nansuyt G. et Prevost J.**, 1995. Action de molécules à propriétés normales sur l'activité phénylalanine ammonia lyase. *Phytochemistry*, **14** : 2147 – 2151.
144. **Van der Meer I.M., Stam M.E., Van Tunen A.J., Mol J.N.M. et Stuitje A.R.**, 1992. Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in *Petunia anthers* results in male sterility. *Plant Cell*, **4** : 253 – 262.
145. **Van rhijn R. et Vander leyden J.**, 1995. The rhizobium-plant symbiosis. *Microbial. Rev.*, **59** : 124 – 142.
146. **Vogt T., Polak P., Tariyn N. et Taylor L.P.**, 1994. Pollination or wound-induced kaempferol accumulation in petunia stigmas enhances seed production. *Plant Cell*, **6** : 11 – 13.
147. **Waterman P.G. et Mole S.**, 1989. Extrinsic factors influencing production of secondary metabolites in plants. In : Bernays E.A [ed] Insect-plant interaction., vol.1 CRC-press, Boca Raton, FL, pp 107 – 134.
148. **Wehetten R. et Sederoff R.**, 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, **7** : 1085 – 1097.
149. **WettsteinWestersheim W. et Minelli H.**, 1962. Breeding intersectional *Populus* hybrids. *Allg. Forstztg.*, **73** : 2.
150. **Wilkinson R.E.**, 1989. EPTC reversed carotenogenic inhibition by norflurazon. *Pesticid. Biochem. Physiol.*, **33** : 257 – 263.

151. Winkel-Shirley B., 2002. Biosynthesis of flavonoids and effect of stress. *Plant Physiol.*, **5** : 218 – 223.
152. Wojtaszek P., Stobiecki M. et Gulewicz K., 1993. Role of nitrogen and plant growth regulators in the exudation and accumulation of isoflavonoids by roots of intact white lupin (*Lupinus albus* L) plants. *J. Plant Physiol.*, **142** : 689 – 694.
153. Wong P.R., Zucker M. et Geasy L.L., 1975. Introduction of PAL in strawberry leaf disks. Action spectra and effects of wounding, sucrose and light. *Plant Physiol.*, **54** : 659 – 665.
154. Woodall G.S. et Stewart G.R., 1998. Do anthocyanins play a role in UV protection of the red juvenile leaves of syzygium ? *J. Exp. Bot.*, **49** : 1447 – 1450.
155. Zucker M., 1965. Introduction of phenylalanine desaminase by light and its relation to chlorogenic and synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiol.*, **40** : 779 – 784.

Liste des figures

Liste des figures

- Figure 1.** Structure de base des composés phénoliques.
- Figure 2.** Formule de base des phénylpropanoïdes (composés en C₆C₃).
- Figure 3.** Formule de base des acides phénols (composés en C₆C₁).
- Figure 4.** Squelette de base des flavonoïdes et des isoflavonoïdes.
- Figure 5.** Structure de base des anthocyanidines.
- Figure 6.** Structure de base des flavones et flavonols.
- Figure 7.** Les différentes voies de biosynthèse des composés phénoliques chez les plantes supérieures.
- Figure 8.** Formation de la phénylalanine par transamination de l'acide phénylpyruvique.
- Figure 9.** Formation de l'acide trans-cinnamique par désamination de la phénylalanine.
- Figure 10.** Schéma de biosynthèse des flavonoïdes chez les plantes.
- Figure 11.** Schéma illustrant la relation entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire.
- Figure 12.** Exemples de composés phénoliques synthétisés en cas de différents stress.
- Figure 13.** Structure des différents herbicides de la famille des pyridazinones.
- Figure 14.** Formule développée du norflurazon.
- Figure 15.** Courbe d'étalonnage de l'acide cinnamique.
- Figure 16.** Courbe d'étalonnage des protéines.
- Figure 17.** Courbe d'étalonnage des acides phénols.
- Figure 18.** Evolution de la teneur en chlorophylles *a* et *b* et en caroténoïdes des feuilles de plantules de soja âgées de 17 jours témoins et mises à l'obscurité.
- Figure 19.** Evolution de la teneur en chlorophylles *a* et *b* et en caroténoïdes des feuilles de plantules de soja témoins et traitées au norflurazon.
- Figure 20.** Effet de la lumière et du norflurazon sur la biosynthèse des pigments chlorophylliens.

- Figure 21.** Effet de l'obscurité sur l'activité de la PAL des feuilles de plantules de soja.
- Figure 22.** Effet du norflurazon sur l'activité de la PAL des feuilles de plantules de soja.
- Figure 23.** Evolution de la teneur en anthocyanes des feuilles de plantules de soja durant la croissance.
- Figure 24.** Evolution de la teneur en anthocyanes des feuilles de plantules de soja durant la croissance à la lumière et à l'obscurité.
- Figure 25.** Evolution de la teneur en anthocyanes durant la croissance des feuilles de plantules soja traitées au norflurazon.
- Figure 26.** Effet de la lumière, de l'obscurité et l'herbicide sur la teneur en anthocyanes des feuilles des plantules de soja.
- Figure 27.** Evolution de la teneur en aglycones flavoniques durant la croissance des feuilles de plantules soja.
- Figure 28.** Evolution de la teneur en aglycones flavoniques durant la croissance des feuilles de plantules de soja témoins et mises à l'obscurité.
- Figure 29.** Evolution de la teneur en aglycones flavoniques durant la croissance des feuilles de plantules de soja témoins et traitées au norflurazon.
- Figure 30.** Effet de la lumière, de l'obscurité et du norflurazon sur la teneur en aglycones flavoniques des feuille de plantules de soja.
- Figure 31.** Evolution de la teneur en acides phénols durant la croissance des feuilles de plantules de soja.
- Figure 32.** Evolution de la teneur en acides phénols durant la croissance des feuilles de plantules de soja témoins et mises à l'obscurité.
- Figure 33.** Evolution de la teneur en acides phénols durant la croissance des feuilles de plantules de soja témoins et traitées au norflurazon.
- Figure 34.** Effet de la lumière, de l'obscurité et du norflurazon sur la teneur en acides phénols des feuilles de plantules de soja.
- Figure 35.** Schéma représentant les différentes substances phénoliques synthétisées en fonction du stade de développement.
- Figure 36.** Schéma représentant l'effet du norflurazon et de l'obscurité sur le métabolisme phénolique.

Liste des tableaux

Tableau I. **Structure de certains phénylpropanoïdes.**

Tableau II. **Structure de certains acides phénols.**

Tableau III. Structure des anthocyanidines les plus répandus.

Tableau IV. Exemples des dérivés des pyridazinones et leur influence sur le métabolisme cellulaire..

Tableau V. Rapport chlorophylles *a/b* et chlorophylles (*a+b*)/caroténoïdes des premières feuilles trifoliées des plantules de soja témoins mises à l'obscurité et traitées au norflurazon.

Liste des photographies

Photo 1. Différents stades de développement du soja.

Photo 2. Détail de la fleur et du fruit du soja.

Photo 3. Plantules et feuilles de plantules de soja au stade première feuilles trifoliées.

Photo 4. Plantules et feuilles de soja durant trois stades de développement.

Photo 5. Effet de l'obscurité sur les plantules et feuilles de soja.

Photo 6. Effet du norflurazon (aux différentes concentrations) sur les plantules et les feuilles de soja.

Photo 7. Effet du norflurazon à la dose 10^{-4} M sur les plantules et feuilles de soja durant trois stades de développement.