

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de **Magister**
En : SCIENCES DE LA NATURE

Spécialité : Ecobiologie et Amélioration Végétale

Par M^{elle} **Hamida CHAHBOUB**

**Impact d'un herbicide « le norflurazon » sur la physiologie
des plantules de haricot *Phaseolus vulgaris L* et sur leur
environnement rhizosphérique**

Soutenu publiquement le 19 juillet 2008 devant le jury composé de :

F. RAHMANIA : Président / Maître de Conférence, USTHB
Y. KACI : Examineur / Maître de Conférence, USTHB
S. OUNANE: Examineur / Maître de Conférence, INA. EL HARRACH
O. ABROUS : Directeur de thèse / Maître de Conférence, USTHB

AVANT – PROPOS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de physiologie végétale de la FSB .USTHB, sous la direction de M^{me} O. Abrous.

J'adresse mes vifs remerciements à ma directrice de thèse pour le temps qu'elle a consacré pour moi, et qui m'a soutenu et suivi pas à pas du début jusqu'à la fin du travail. Je lui suis reconnaissante de m'avoir encadré avec autant de soin et d'avoir eu la patience de me former en tenant compte de mes capacités.

M^r Y. Kaci qui a contribué à la partie microbiologique, il a toujours été là pour m'encourager, ou plutôt devrais-je dire me « pousser » en avant avec une gentillesse inoubliable, et d'avoir accepté de juger ce travail malgré ses nombreuses occupations.

Je tiens à remercier M^{me} F. Rahmania qui me fait l'honneur de présider le jury.

Un grand merci à M^r S. Ounane de l'Institut National d'Agronomie qui a bien voulu examiner le travail.

J'adresse un remerciement particulier à Mr Djebbar et Mr Belkhalifa qui ont toujours répondu avec gentillesse et patience à mes questions, et pour leurs conseils précieux et disponibilité, il m'était toujours agréable de travailler avec vous au laboratoire.

Que tous les membres et collègues du laboratoire physiologie végétale trouvent ici l'expression de toute ma gratitude pour leur appui tout le long de ma thèse dans un cadre très aimable : M^{me} Belkebir, Abdelkrim , Aid, Zegaoui et Taibi.

Mes amies : Karima, Nedjma, Dinar, Lynda, Nassima , Hayet, Sihem, Imene, Faiza, Souhila , Fadila , Latifa.

Je remercie du fond du coeur mes amies, Malika, Salima, Souhila, Malika Dahmani. Avec elles j'ai partagé beaucoup de moments difficiles. Je leurs souhaite beaucoup de bonheur.

J'adresse mes sincères remerciements et toute ma reconnaissance à Nacer et Ghania pour leurs aides précieuses tout le long de ces quatre années d'étude.

A toute la promotion de la post graduation 2004, je leur souhaite beaucoup de réussite.

Mes remerciements s'adressent à tous ceux qui ont apporté leur concours à la réalisation de ce travail de loin ou de près.

Résumé

Le présent travail se veut une contribution à une meilleure compréhension des modes d'actions d'un bleaching herbicide: le norflurazon, appliqué à différentes doses sur les plantules de deux variétés de haricot, l'une importée (Coco de Prague) et l'autre locale (Terga) et sur leur environnement rhizosphérique.

L'impact du norflurazon a été évalué au niveau : morphologique (longueur de la partie aérienne, surface foliaire, masse sèche des racines et des parties aériennes), physiologique par le dosage des paramètres relatifs à la photosynthèse (pigments foliaires, sucres solubles et amidon) et aussi le degré de peroxydation des membranes cellulaires par le dosage des peroxydes d'acides gras et du malondialdéhyde.

L'impact du norflurazon a été également étudié au niveau rhizosphérique par le dénombrement des nodules, masse fraîche et sèche des nodules.

À la dose 1 μM , l'effet du norflurazon sur les plantules de haricot n'est pas très important. Aux doses 10 μM et particulièrement 100 μM (dose proche de celle appliquée au champ), le norflurazon affecte la morphologie des plantules (bleaching partiel et réduction des différents paramètres morphologiques mesurés) et leur physiologie en réduisant l'activité photosynthétique estimée par les teneurs en pigments foliaires, en sucres solubles et en amidon lesquelles diminuent fortement.

À l'échelle cellulaire, l'herbicide entraîne une augmentation des peroxydes d'acides gras et du malondialdéhyde, signe de détérioration des structures des membranes cellulaires et d'un état de stress oxydatif sévère.

En présence de norflurazon 10 μM et 100 μM , aucun nodule n'est observé sur les systèmes racinaires des plantules. Les résultats obtenus avec les essais en boîte de Petri ont montré que quelle que soit la dose herbicide utilisée, celui-ci a été biodégradé et utilisé comme source de carbone par les rhizobies. Il semble donc que le norflurazon, en empêchant le mécanisme de nodulation, n'agit pas sur les bactéries directement mais agit plutôt sur la reconnaissance ou le dialogue moléculaire entre les bactéries et la plante hôte.

Mots clés : *Phaseolus vulgaris*, norflurazon, stress oxydatif, rhizobium, nodulation.

Liste des abréviations

% : Pour cent

‰ : Pour mille

μl : microlitre

μg : microgramme

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

cm² : centimètre carré

h : heure

g : gramme

g/l : gramme par litre

g/m² : gramme par mètre carré

ml : millilitre

MVF : Matière Végétale Fraiche

MDA : Malondialdéhyde

nm : nanomètre

nmole : nanomole

NAD(P) : Nicotine Amide Adénine Dinucléotide Phosphate (forme oxydée)

NAD(P)H + H⁺ : Nicotine Amide Adénine Dinucléotide Phosphate (forme réduite)

rpm : rotation par minute

ROS : Reactive Oxygen Species

trs/mn : tour par minute

TBA : Thiobarbituric Acid

SOMMAIRE

Introduction	01
---------------------	-----------

Chapitre I : Revue bibliographique

I.1 . Le haricot

I.1.1 Généralités sur le haricot	03
I.1.2 Variétés principales de haricot	04
I.1.3 Composition biochimique de la graine de haricot	04

I.2 . La rhizosphère

I.2.1 Définition	05
I.2.2 La symbiose Rhizobium-légumineuse	06
I.2.3 Etablissement de la symbiose	07
I.2.4 Taxonomie moderne des bactéries nodulant les légumineuses	09

I.3. Les herbicides

I.3.1 Classification des herbicides

I.3.1.1 Classification en fonction de la composition chimique	10
I.3.1.2 Classification en fonction de leur mode d'action	11
I.3.1.3 Classification en fonction du mode de pénétration et de transport	13

I.3.2 Les pyridazinones

I.3.2.1 Modes d'action des pyridazinones	14
I.3.2.2 Le norflurazon	15

I.4. Devenir des pesticides dans le sol :

I.4.1 Comportement des herbicides dans le sol	16
I.4.2 Comportement du norflurazon dans le sol	17

I.5. La biodégradation des pesticides

I.6. Effet des herbicides sur la nodulation des légumineuses	20
---	-----------

I.7. Herbicides et stress oxydatif	22
I.7.1 Sites de formation des espèces actives d'oxygène	23
I.7.2 Toxicité des espèces actives d'oxygène.....	24

I.8. Systèmes antioxydants

I.8.1 Les antioxydants non enzymatiques	27
I.8.2 Les défenses antioxydantes enzymatiques.....	30

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.1 Matériel végétal	34
II.2 Herbicide utilisé	34
II.3 Substrat édaphique	35
II.4 Méthodes d'étude	
II.4.1 Analyse du sol	35
II.4.2 Mise en culture des graines de haricot	38
II.4.3 Etudes morphologiques et biométriques	39
II.4.4 Extraction et dosage des pigments foliaires.....	40
II.4.5 Extraction et dosage des sucres solubles et de l'amidon	40
II.4.6 Extraction et dosage des peroxydes d'acides gras.....	41
II.4.7 Dosage du malondialdéhyde.....	42
II.4.8 Etude de la nodulation des plantules de haricot	
II.4.8.1 Extraction des bactéries nodulantes	43
II.4.8.2 Isolement et purification des bactéries nodulantes.....	43
II.4.8.3 Effet du Norflurazon sur les bactéries nodulantes	44
II.4.8.4 Utilisation du norflurazon comme source de carbone	
et/oud'azote.....	45
II.4.8.5 Effet du norflurazon sur la nodulation en cultures axéniques....	45

Chapitre III : Résultats et Discussions

III.1. Croissance comparée des deux variétés de plantules de haricot	49
III.2. Effet du norflurazon sur la croissance des plantules de haricot	49
III.2.1 Effet du norflurazon sur la morphologie des plantules de haricot	49
III.2.2 Effet du norflurazon sur la cinétique de la croissance des plantules	
de haricot.....	50
III.2.3 Effet du norflurazon sur la surface foliaire des plantules de haricot	51
III.2.4 Effet du norflurazon sur la masse sèche de la partie aérienne	
des plantule haricot	52
III.2.5 Effet du norflurazon sur la croissance des racines des plantules	
de haricot	53
III.2.6 Effet du norflurazon sur la masse sèche des racines des plantules	
de haricot	55
III.2.7 Effet du norflurazon sur le rapport masse sèche des racines / masse sèche	

des parties aériennes des plantules de haricot	56
III.3. Effet du norflurazon sur le métabolisme des plantules de haricot.	
III.3.1 Effet du norflurazon sur la teneur en pigments photosynthétiques.....	58
III.3.2 Effet du norflurazon sur la teneur en sucres solubles.....	61
III.3.3 Effet du norflurazon sur la teneur en amidon	62
III.4. Dommages dus au stress oxydatif induit par le norflurazon :	
III.4.1 Effet du norflurazon sur la teneur en peroxydes d'acides gras des plantules de haricot.....	64
III.4.2 Effet du norflurazon sur la teneur en malondialdéhyde des plantules de haricot	65
III.5. Effet du norflurazon sur l'environnement rhizosphérique des plantules de haricot	
III.5.1 Effet sur la nodulation	67
III.5.2 Le nombre de nodules	67
III.5.3 La masse fraîche des nodules.....	67
III.5.4 La masse sèche des nodules	68
III.5.5 Mise en culture des souches bactériennes	69
III.5.6 Utilisation du norflurazon par les Rhizobia	69
III.5.7 Inoculation des plantules de haricot en cultures axéniques	70
Chapitre IV : Discussion générale	72
Conclusion et perspectives.....	77
Références bibliographiques.....	78

ANNEXES ET INDEX

Les herbicides ou produits phytosanitaires ou encore xénobiotiques sont des substances chimiques utilisées tant dans le domaine appliqué (l'agriculture moderne dépend de l'utilisation intensive des herbicides) que dans le domaine d'études fondamentales. En agriculture, ils sont employés pour lutter contre les adventices qualifiées de mauvaises herbes, en affectant une ou plusieurs de leurs fonctions vitales. Ces végétaux indésirables exercent une concurrence avec les plantes cultivées pour les éléments nutritifs, la lumière, l'espace etc.

L'application des herbicides sur le terrain vise à obtenir un « bon résultat », celui-ci se traduit par une bonne efficacité herbicide c'est-à-dire pour une culture donnée, par une destruction la plus complète des plantes indésirables, le plus rapidement possible et le plus durablement possible sans que la culture n'ait à souffrir.

A l'exception de quelques produits étroitement sélectifs, les herbicides sont rarement totalement inoffensifs pour les cultures. Leur utilisation n'est possible qu'en jouant sur les stades de développement des cultures, leur vigueur mais surtout les doses : le sous dosage risquant d'être inefficace pour la plante nuisible et le surdosage dangereux pour la culture.

Dans le domaine d'études fondamentales, les herbicides sont de plus en plus utilisés dans les laboratoires en vue d'un approfondissement de certains métabolismes cellulaires. L'étude des modes d'action des herbicides représente donc un domaine de recherche familier aux physiologistes.

.
Le norflurazon (4 chloro- 5 méthyl amino 2 α , α , α trifluoro méthyl phényl 3 (Dihydroxy pyridazinone) appelé aussi Sandoz est connu pour être un puissant inhibiteur de la phytoène désaturase (Sandmann et al., 1989), enzyme clef dans la biosynthèse des caroténoïdes permettant la désaturation du phytoène en phytofluène. C'est un herbicide systémique appliqué au niveau du sol qui agit au niveau des feuilles entraînant le blanchiment ou bleaching des plantules traitées.

Le "haricot commun", *Phaseolus vulgaris* L, est le légumineux le plus produit au monde, il représente une source protéique à haute valeur alimentaire. Comme toute légumineuse, le haricot contracte des relations symbiotiques avec les bactéries rhizosphériques du genre rhizobium.

Si les effets de nombreux herbicides sur le végétal sont bien connus il reste cependant que leurs conséquences sur les communautés microbiennes symbiotiques rhizosphériques et leurs relations avec les plantes hôtes demeurent fragmentaires ou très peu étudiées. Les herbicides peuvent influencer la nodulation et la fixation symbiotique de l'azote soit en affectant directement les rhizobia, soit en affectant la plante hôte ou encore en agissant sur les deux partenaires.

La présente étude avait pour objectif d'étudier les effets d'un herbicide le norflurazon appliqué à différentes concentrations sur la morphologie et la physiologie des plantules de deux variétés de haricot et sur les bactéries de la rhizosphère de ces plantules.

Nous avons d'abord étudié l'effet du norflurazon sur la morphologie et la croissance des plantules de haricot.

Nous avons ensuite étudié les effets du norflurazon au niveau métabolique en dosant les pigments foliaires, les teneurs en sucres solubles et en amidon de même que nous avons évalué les dommages causés par cet herbicide aux systèmes membranaires en dosant les peroxydes de lipides et le Malonylaldéhyde marqueurs du stress oxydatif.

Dans une dernière partie nous avons étudié l'impact du norflurazon sur les populations bactériennes rhizosphériques du genre rhizobium qui nodulent le haricot et sur le mécanisme de nodulation en estimant le nombre de nodules formés au niveau des racines des plantes ayant poussé sur sol et sur des plantes en culture axénique ; de même que nous avons étudié la biodégradation de cet herbicide par les bactéries nodulant le haricot.

Chapitre I

Revue

Bibliographique

I.1 Le haricot

II.1 Généralités sur le haricot

La culture du haricot est très répandue dans le monde en raison de la place qu'occupe cette plante dans l'alimentation humaine. Elle est originaire d'Amérique centrale (en particulier du Mexique) et du Pérou où la diversité variétale est la plus grande.

Le haricot a été introduit en Europe au XI^{ème} siècle. Actuellement, il est largement répandu dans les pays méditerranéens dont l'Algérie.

Le haricot *Phaseolus vulgaris* L. appartient à la classe des dicotylédones, sous-classe des dialypétales, ordre des fabales, famille des fabaceae (légumineuses), sous famille des faboïdeae (papilionacées) et au genre phaseolus.

Classification selon APG (2003) :

Règne :	Plantea
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Fabales
Famille:	Fabaceae
Sous famille :	Faboïdeae
Genre :	Phaseolus
Espèce :	vulgaris
Variété :	Terga et Coco de Prague

Le haricot est une plante annuelle, autogame au cycle de vie rapide qui dure de 70 à 140 jours selon les variétés. C'est une plante herbacée pouvant atteindre jusqu'à 80 cm de hauteur. La tige est mince, grimpante et volubile, elle est cylindrique et ramifiée, son enroulement se fait toujours dans le même sens, ses rameaux ont une croissance sympodiale.

Les deux premières feuilles sont simples et opposées, les feuilles suivantes sont alternées trifoliées portant à leurs bases deux stipules. Les fleurs sont disposées en grappes de couleur blanche ou violette. Les fruits sont des gousses allongées dont la couleur varie du vert au jaune, selon les cultivars ; les graines contenues dans les gousses de dimension, de forme et de coloration variable (Marcel *et al.*, 2002) sont généralement réniformes, les cotylédons sont gonflés, épais chargés de réserves.

Les fruits de la plupart des variétés peuvent être consommés frais, avant leur maturité, comme les haricots beurre, verts ou jaunes

En raison de sa qualité nutritionnelle, le haricot est par conséquent bien apprécié et recherché pendant toute l'année.

I.1.2 Variétés principales de haricot :

Le haricot blanc : en forme de rognon, assez gros et carré aux extrémités. La variété Terga locale fait partie de cette catégorie.

Le haricot canneberg : gros, rond, blanc crème, tacheté de rose ou de brun, très populaire en Europe, où on le nomme **haricot coco** (dont la variété coco de Prague).

Le haricot Great Northern : de dimension moyenne, moins réniforme que le haricot blanc.

Le haricot cannellini : légèrement réniforme et carré aux extrémités .

Le petit haricot blanc : de forme ovale.

Le haricot Pinto : de taille moyenne, plutôt plat et réniforme, de couleur beige tachetée de brun clair (le terme Pinto signifie « peint » en espagnol).

Le haricot romain : réniforme, de couleur brunâtre, plus ou moins mouchetée, et ressemble au haricot Pinto tout en étant souvent plus gros et plus foncé.

Le haricot rouge : est l'un des plus connus, rouge et réniforme.

Le haricot noir : légèrement réniforme, et complètement noir

I.1.3 Composition biochimique de la graine de haricot :

Le haricot commun dont la composition biochimique diffère d'une variété à une autre, contient : 60% de glucides ; 30% de protéines, 1% de lipides, 10% d'eau, 4% d'autres composants (fig. 1).

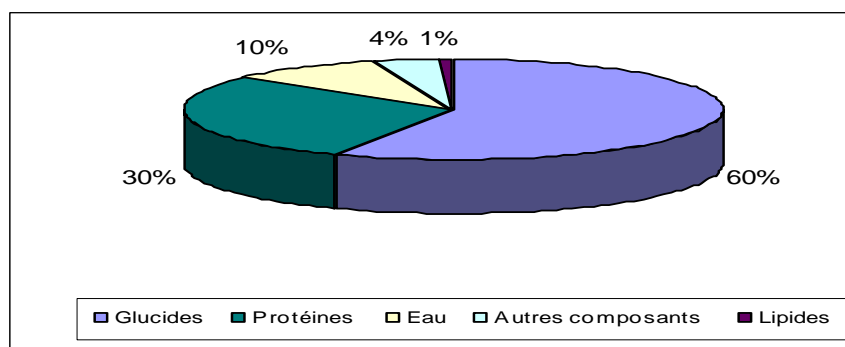


Figure 1 : Composition biochimique de la graine de haricot commun *Phaseolus vulgaris* (Da Silva Fialho *et al.*, 2006).

A l'instar des autres êtres vivants, les plantes vivent au contact de microorganismes, dont la majorité sont situés dans un système complexe, lieu d'échanges essentiels entre la plante et le sol : la rhizosphère.

I.2 La rhizosphère : une interface entre plantes et microorganismes du sol

I.2.1 Définition

Le terme rhizosphère a d'abord été défini par Hiltner, en 1904, pour décrire la stimulation de la biomasse microbienne dans la région du sol située à l'interface sol – racine (Hinsinger, 1998). Depuis, le terme **rhizosphère** a pris un sens plus général : elle est définie comme le volume de sol soumis à l'influence de l'activité racinaire (Darrah, 1993). Ce volume de sol varie avec la nature des plantes, en particulier l'extension du système racinaire, les éléments nutritifs et les propriétés physiques du sol (Nye, 1986; Alloway, 1995).

Les micro-organismes sont très abondants dans le sol et particulièrement actifs dans la rhizosphère en liaison avec l'exsudation de carbone organique par les racines. C'est précisément la stimulation de leur activité qui a fait émerger le concept de rhizosphère (Hiltner, 1904 cité dans Hinsinger, 1998). La rhizosphère est donc le lieu d'activités microbiologiques et biochimiques intenses

Le contact entre plantes et microorganismes est permanent, il s'établit dès la germination des graines dans le sol et se poursuit pendant les différentes phases de développement du végétal.

Les effets de ces microorganismes sur la croissance racinaire des plantes varient en fonction des espèces de plantes et des conditions environnementales.

Certains de ces microorganismes peuvent exercer un effet néfaste sur le végétal (organismes pathogènes), d'autres au contraire peuvent protéger et favoriser le développement du végétal, c'est le cas des organismes dits « promoteurs de croissance », ou encore des microorganismes symbiotiques fixateurs d'azote.

Il est admis que les plantes influencent physiquement et chimiquement leur milieu. Ainsi, la plante représente une source motrice du développement de la rhizosphère et de son maintien et ceci par le biais de son système racinaire. En effet différents éléments nutritifs comme les exsudats racinaires (acides aminés, sucres, acides organiques...) sont rendus disponibles à la microflore.

Les racines des plantes contribuent donc à enrichir le sol en matière organique. Celle-ci permet de structurer le sol et de maintenir une bonne cohésion de ses éléments constitutifs : stabilité structurale. L'amélioration de la stabilité des agrégats du sol dépend directement du matériel racinaire lui-même (rhizodéposition) et indirectement par l'intermédiaire de la stimulation des activités microbiennes de la rhizosphère en particulier les populations productrices d'exopolysaccharides (Kaci *et al.*, 2005).

L'une des répercussions positives de la structuration du sol consiste en l'amélioration des transferts d'eau et d'éléments minéraux vers la plante (Whipps et Lynch, 1986), ce qui permet d'augmenter de manière significative les rendements végétaux.

I.2.2 La symbiose Rhizobium-légumineuse :

La symbiose Rhizobium-légumineuse constitue une des principales interactions entre plantes et microorganismes du sol. En effet, si les Rhizobia sont beaucoup plus connus pour l'apport azoté qu'ils procurent à la plante hôte (People *et al.*, 1995), il n'en demeure pas moins qu'ils sont de grands producteurs d'exopolysaccharides (EPS), et qu'à ce titre ils peuvent jouer un rôle structurant, si les conditions de production sont réunies (Chenu *et al.* 2000).

L'azote représente l'un des éléments majeurs de la nutrition des végétaux. Bien que l'azote moléculaire (N₂) constitue environ 80% de l'atmosphère terrestre, il est cependant considéré comme facteur limitant la croissance. Ceci est dû au fait que la molécule d'azote est très stable et que les organismes supérieurs sont incapables de l'utiliser. Seules certaines bactéries et certaines algues (cyanophycées) sont capables de fixer l'azote moléculaire et de le réduire en ammoniac. Cette réduction nécessite beaucoup d'énergie, c'est pourquoi les systèmes fixateurs d'azote les plus efficaces sont des symbioses, associant des bactéries fixatrices à des organismes photosynthétiques, pourvoyeurs d'énergie.

Les Rhizobia utilisent des mécanismes génétiques et moléculaires similaires pour reconnaître et infecter les légumineuses hôtes : des gènes *Nod* sont impliqués dans un dialogue moléculaire entre les deux partenaires, la reconnaissance de signaux symbiotiques de la plante et des bactéries provoquant les réponses symbiotiques.

I.2.3 Etablissement de la symbiose : formation des nodosités ou nodules :

Dans l'interaction Rhizobium – légumineuse, on observe un haut niveau de spécificité hôte/rhizobium. D'une part, une espèce de légumineuses donnée ne permet la symbiose qu'avec un nombre limité d'espèces de Rhizobium. D'autre part, une espèce donnée de rhizobium infecte seulement un petit nombre d'espèces végétales (Kondorosi, 2002).

Les rhizobiums induisent sur les racines des légumineuses la formation de véritables organes « les nodosités » ou « nodules », à l'intérieur desquels est fixé l'azote atmosphérique par les bactéroïdes. La formation des nodules implique un certain nombre d'étapes :

- **La reconnaissance :** les premiers signaux (premier message aux bactéries) intervenant dans l'interaction symbiotique consistent en des composés sécrétés par les racines (exsudats racinaires) dans l'environnement rhizosphérique et appartenant à différents groupes de flavonoïdes (Bergum *et al.*, 2001) ; il est à noter que la spécificité des interactions plantes-rhizobium est en partie liée à la diversité des flavonoïdes. Les bactéries se multiplient activement en utilisant les substances contenues dans les exsudats racinaires et par chimiotactisme se déplacent vers le système racinaire de l'hôte.

- **L'attachement** des rhizobiums sur les racines fait intervenir une glycoprotéine ou lectine sur le poil absorbant et les EPS des rhizobiums. En même temps il y a induction de l'expression de toute une série de gènes de nodulation ou gènes *Nod* chez les rhizobiums compatibles. Ces gènes plasmidiques et/ou chromosomiques sont responsables de la synthèse de substances spécifiques appelées facteurs Nod de nature lipooligosaccharidique ou LCO (Fisher, 1994). Ceux ci sont libérés par les bactéries et vont agir sur la plante en provoquant la déformation des poils absorbants.

- Les rhizobiums se multiplient activement, se déposent en manchon autour des poils absorbants et pénètrent dans les cellules racinaires en formant une sorte de cordon infectieux.

- Les facteurs Nod induisent une dédifférenciation de quelques cellules corticales qui présentent des changements morphologiques et cytologiques : les cellules sont tétraploïdes, elles forment un massif de cellules ou primordium nodulaire (Geurts et Franssen, 1996), dans lequel les bactéries ayant augmenté de taille et prenant des formes

différentes deviennent des bactéroïdes. Ces derniers synthétisent alors la nitrogénase enzyme permettant la réduction de l'azote moléculaire en ammoniac (fig. 2).

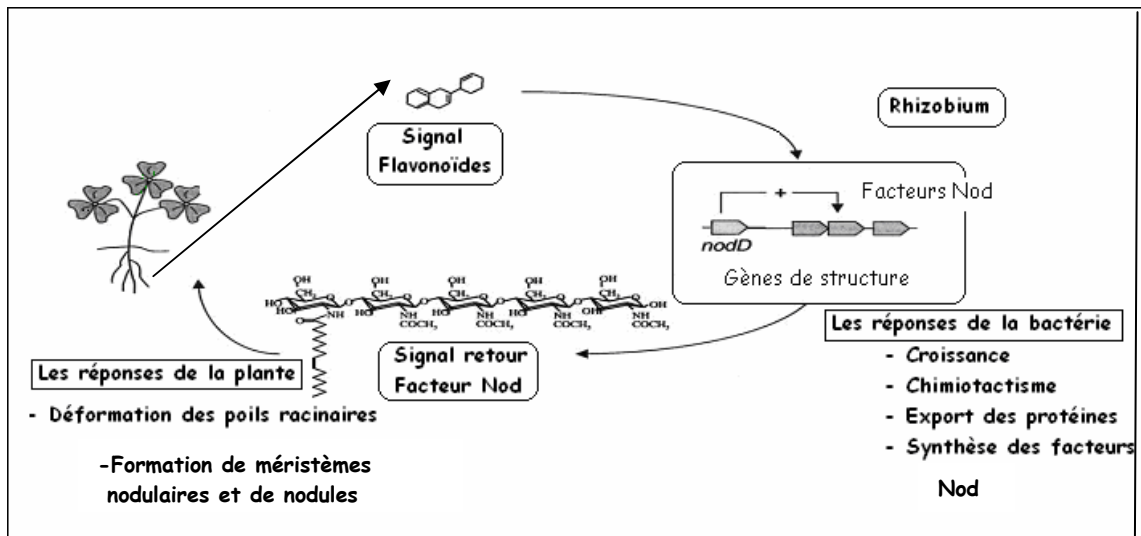


Figure 2 : Echanges de signaux entre les partenaires symbiotiques rhizobia et légumineuses au cours des premières étapes de la nodulation (Lindstrom *et al.* 2002).

Les bactéroïdes sont entourés d'une membrane pér bactéroïde d'origine végétale, formant le symbiosome unité fondamentale de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse (Elmerich, 1997). Cette compartimentation permet de créer un environnement adéquat au fonctionnement de la nitrogénase, notamment en protégeant l'enzyme contre les pressions partielles élevées en oxygène (Hacker *et al.* 2001).

Dans cette association, les deux symbiotes coopèrent pour synthétiser une hémoprotéine : la lég'hémoglobine, dont la fraction protéique est synthétisée par la plante hôte et l'hème-fer par les bactéroïdes (Appleby, 1984). Ce pigment régule la pression partielle en oxygène autour des symbiosomes ; il crée des conditions de microaérobiose, assurant ainsi la protection de la nitrogénase, tout en assurant la respiration des bactéroïdes (Gualtieri et Bisching, 2000).

L'infection dure huit à dix jours après la formation des racines. La forme externe, l'anatomie et l'histologie des nodules dépendent de l'espèce végétale. Le nombre et la position des nodules sur le système racinaire sont aussi régulés par la plante hôte (Van de Sande *et al.*, 2000).

I.2.4 Taxonomie moderne des bactéries nodulant les légumineuses :

La première classification des rhizobiums a été réalisée sur la base de la vitesse de croissance *in vitro* (Jordan, 1982). L'isolement de rhizobiums associés aux légumineuses non prises en compte auparavant, a souvent conduit au bouleversement de la taxonomie des *Rhizobiacées*. Ces modifications constantes de la taxonomie ont conduit à la recherche des critères à prendre en compte pour la description de nouveaux taxa. C'est ainsi qu'il a été proposé l'utilisation de la taxonomie polyphasique basée sur des techniques spécifiques (phylogénétiques, phénotypiques et génotypiques) (Graham et al., 1991 ; Vandamme et al., 1996) et moléculaires puisant l'information à des niveaux cellulaires différents (protéines, acides gras, ADN...) (Zakhia, et De Lajudie , 2006) pour définir les nouveaux groupes. La combinaison de ces techniques a révélé à la fois des diversités génétiques au sein de groupes bactériens qui avaient été considérés comme homogènes et des relations entre des groupes très éloignés.

L'arbre phylogénétique général de la famille des Rhizobiacées basé sur les séquences d'ADN_r 16 S est donné en annexe I.

De nombreux facteurs liés à l'environnement de la plante peuvent affecter le taux de nodulation et par voie de conséquence la fixation de l'azote : en effet le niveau d'azote fixé dépend non seulement de l'habilité de l'inoculant à fixer l'azote mais aussi de l'habilité de la plante à fournir et à pourvoir les Rhizobiums des nodules en énergie ; de ce fait, tout facteur pouvant influencer directement les rhizobia ou indirectement l'habilité de la plante à fournir l'énergie aux nodules va avoir un impact négatif sur la symbiose et donc sur la fixation de l'azote et à plus long terme sur la récolte.

Parmi les facteurs pouvant influencer la formation des nodules et donc la symbiose figurent les herbicides.

I.3 Les herbicides :

Les rendements élevés des cultures et la qualité de l'agriculture moderne sont largement obtenus par l'épandage d'herbicides.

Les herbicides ou produits phytosanitaires ou encore xénobiotiques sont employés pour lutter contre les adventices qualifiés de mauvaises herbes, en affectant une ou plusieurs

de leurs fonctions vitales. Ces végétaux indésirables exercent une concurrence avec les plantes cultivées pour les éléments nutritifs, la lumière, l'espace etc....

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

Un herbicide est efficace lorsqu'il détruit sélectivement les adventices sans affecter la plante cultivée.

La recherche de la sélectivité d'action des herbicides demeure une préoccupation des agronomes. Elle résulte d'une sensibilité différentielle à l'herbicide des plantes traitées et elle peut avoir diverses causes dont :

- la différence de pénétration de l'herbicide dans la plante
- la mobilité au sein du végétal
- la différence dans les doses conduisant à des réactions toxiques
- la moindre affinité de l'herbicide pour les molécules cibles
- la différence dans la capacité de telle ou telle espèce à métaboliser ou à détruire le produit absorbé.

I.3.1 Classification des herbicides :

Les herbicides peuvent être classés, selon leur composition chimique, leur mode d'action, ou encore selon leur mode de pénétration et de transport.

I.3.1.1 Classification en fonction de la composition chimique:

Les herbicides sont généralement classés en deux grandes classes:

- **Les herbicides minéraux :** Ce sont des herbicides qui ont été très utilisés au cours du 19^{ème} et début du 20^{ème} siècle tels que les sels d'ammonium, de cuivre, de l'acide sulfurique, des sulfates, des chlorates des thiocyanates, etc...
- **Les herbicides organiques :** ils ont supplanté les herbicides minéraux depuis la deuxième guerre mondiale ; ces herbicides forment un grand nombre de familles aux propriétés chimiques, physiques, et biologiques variées.

I.3.1.2 Classification en fonction de leur mode d'action :

La recherche et la compréhension du mode d'action des herbicides a constitué et constitue un outil dans la recherche du métabolisme cellulaire des plantes et a facilité leur application dans différentes pratiques agricoles.

L'action des herbicides au niveau cellulaire est complexe et variable ; parmi l'infinité des blocages potentiels que pourrait subir la machinerie cellulaire, seules certaines cibles apparaissent atteintes par les herbicides parce qu'elles sont accessibles, vulnérables et parce que leur perturbation a des conséquences graves et irréversibles.

A partir d'une action primaire souvent très précise, apparaissent des actions secondaires plus ou moins complexes. Cet enchevêtrement d'actions primaires et secondaires se produit souvent au niveau cellulaire d'abord puis au niveau de l'organisme, l'ensemble pouvant aboutir à la mort du végétal.

✓ Les inhibiteurs de la photosynthèse et de la respiration :

Les inhibiteurs de la photosynthèse sont très nombreux :

- Les bipyridiles, tels que le diquat et le paraquat interfèrent avec le transfert des électrons au niveau du PSI, ils se substituent à la ferrédoxine (Fd) (Dodge, 1982).
- Les dinitrophénols et nitriles agissent sur les membranes cellulaires qu'ils perméabilisent aux ions H⁺, Ce sont des découplants, bloquant la synthèse d'ATP), exemple : Dinitro-ortho-crésol (DNOC), et dinoterbe (Abrous, 1982 ; Tissut et Severin, 1984).
- Les triazines, les uraciles et les dérivés de l'urée tel que : la DCMU, se lient au site de fixation de la quinone B (Q_B) sur la protéine D₁, empêchant ainsi la réoxydation de la quinone A (Q_A). (Krieger-Liszkay et Rutherford, 1998).
- Les diphenyl-éthers (l'oxyfluorfen et l'aclofen) inhibent la protoporphyrine oxydase (Matringe et al., 1989) enzyme impliquée dans la synthèse des chlorophylles.

✓ Les inhibiteurs de la division cellulaire :

Les dinitroanilines (le nitraline et le butraline) (Lignowski et Scott, 1972 ; Duke, 1990), les carbamates (Rhobbe-Durant, 1990) et les propyzamides (Ackashi *et al.*, 1988) sont des inhibiteurs de l'assemblage des microtubules de la tubuline, protéine qui intervient

dans la division cellulaire ; ils interrompent la mitose au stade métaphase et agissent généralement au niveau racinaire.

✓ **Les inhibiteurs de la synthèse des lipides :**

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

Les cyclohexanediones tels que l'alloxydime et les arylophénoxypropionates tels la séthoxydime, le diclofop méthyl et analogues sont des graminicides bloquant la synthèse des acides gras par inhibition de l'acétyl CoA carboxylase (Gronwald, 1994 ; Belkebir *et al.*, 2006).

✓ **Les inhibiteurs de la synthèse des acides aminés :**

Le glyphosate bloque la biosynthèse des acides aminés aromatiques (phenyl alanine, tyrosine et tryptophane) en inhibant l'activité de l'enzyme 5 -enoyl-pyruvate shikimate synthétase (EPSP-S) (Freyssinet et Duke , 1990), ce qui provoque l'accumulation de l'acide shikimique entravant ainsi la biosynthèse des composés phénoliques.

Le glufosinate inhibe la glutamine synthétase (Duke, 1990), enzyme responsable de la formation de la glutamine à partir du glutamate.

Les imidazolinones tels l'imazamethabenz, les sulfonylurées (le chlorsulfuron et le sulfosulfuron) inhibent la biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée en bloquant l'activité de l'acéto-lactate synthétase (ALS), enzyme nécessaire à la formation de ces acides aminés (Shaner et Reider, 1986, Mourad et King, 1992 ; Khelifa, 2002).

✓ **Les inhibiteurs de la synthèse des pigments photosynthétiques :**

Les triazoles (Amitrole), les Isoxazolidinones (clomazone), et certains pyridazinones (le norflurazon) sont des inhibiteurs de la biosynthèse des caroténoïdes (Sandmann et Albrecht, 1990) ; ils bloquent certaines étapes de désaturation des caroténoïdes causant ainsi un blanchiment des plantules traitées. Ils sont également appelés herbicides décolorants.

✓ **Autres substances à fonction herbicide :**

Les phytohormones de synthèse induisent des troubles du développement ou de la croissance à partir d'une certaine concentration en devenant des substances herbicides (Tissut et Séverin, 1984), c'est le cas des acides phénoxy (exemple de l'acide 2,4 dichloro- phénoxyacétique ou 2,4 D), des acides benzoïques (exemple du dicamba) et des acides pyridiniques (exemple du piclorame) .

I.3.1.3 Classification en fonction du mode de pénétration et de transport:

- **Les herbicides de contact :** Ce sont des produits peu ou pas transportés à l'intérieur de la plante, ces substances pénètrent à l'intérieur de la plante mais sont pour l'essentiel immobilisés dans les premières couches cellulaires atteintes y provoquant des nécroses. Ils peuvent être toxiques par contact racinaire tels les thiocarbamates (Tissut et Severin, 1984) ou foliaire cas des composés phénoliques tels le dinoterbe (Belbachir *et al.*, 1982).
- **Les herbicides systémiques :** Ils sont appliqués soit au niveau du sol, soit sur les feuilles. Ils pénètrent dans la plante par voie racinaire ou par voie foliaire, et sont capables d'atteindre les sites cellulaires sensibles à distance par le biais des vaisseaux conducteurs. Certains herbicides tels les triazines, les urées et les pyridazinones sont véhiculés par les vaisseaux du bois des racines vers les feuilles ce sont des herbicides d'application racinaire à action foliaire; d'autres tels l'amtrole, les cyclohexanediones ou encore les phytohormones sont véhiculés par le liber vers diverses parties du végétal (Scalla, 1991).

I.3.2 Les pyridazinones :

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

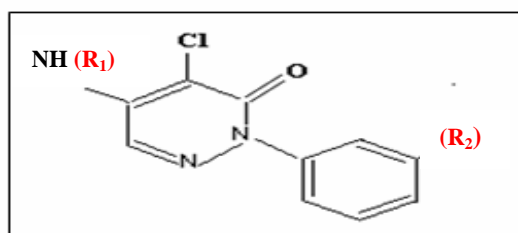


Figure 3: Formule générale des pyridazinones

Les mécanismes phytotoxiques des pyridazinones dépendent du degré de méthylation de la fonction amine (R1) et de l'absence ou de la présence d'un groupement trifluorométhyl (R2) sur leur cycle aromatique (fig.3), ainsi on distingue différents types de pyridazinones (tab.I)

Tableau I: Quelques dérivés de pyridazinones et leur influence sur le métabolisme cellulaire.

NOM	SAN	R ₁	R ₂	EFFETS	REFERENCES
PYRAZON ou chloridazon		NH ₂	H	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de la réaction de HILL. 	<ul style="list-style-type: none"> •Hilton et <i>al.</i>, 1969
BASF 13-338 Ou San 9785	SAN 9785	N(CH ₃) ₂	H	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de la réaction de HILL. •Modification du métabolisme lipidique (inhibition de la désaturation du C18:2 en C18:3). 	<ul style="list-style-type: none"> •St john, 1976 •Norman et <i>al.</i>,1987
NORFLURAZON Ou San 9789	SAN 9789	NHCH ₃	CF ₃	<ul style="list-style-type: none"> •Inhibition de la réaction de HILL. •Inhibition de la synthèse des caroténoïdes. •Perturbation du métabolisme lipidique. 	<ul style="list-style-type: none"> •Khan et <i>al.</i>, 1977 •Duke, 1990 •Scalla, 1991 •Abrous et <i>al.</i>.,1998.
METFLURAZON Ou San 6706	SAN 6706	N(CH ₃) ₂	CF ₃		
	SAN 133-410 H	NHCH ₃	H	<ul style="list-style-type: none"> •Perturbation du métabolisme lipidique. •Inhibition de la sn-glycérol 3 phosphate acyl transférase. 	<ul style="list-style-type: none"> •Rajasekharan et Sastry, 1987.
	SAN 9774	NH ₂	CF ₃		

I.3.2.1 Modes d'action des pyridazinones :

L'étude des propriétés phytotoxiques entreprise depuis longtemps sur une série de pyridazinones montre que ces molécules peuvent exercer des modes d'action divers :

- Une inhibition de la fixation du CO₂ sur le ribulose 1.5 biphosphate et une photodestruction des ribosomes chloroplastiques (Duke, 1985).
- Une inhibition du transfert des électrons au niveau du PSII de la chaîne photosynthétique, effet analogue à celui de la DCMU, ou un blocage de la réaction de Hill sur les chloroplastes isolés, les structures les plus actives étant le pyrazon et le metflurazon (Duke,1985).
- Une inhibition de la synthèse des caroténoïdes (Sandman et Boger, 1989) et une altération de la structure et du fonctionnement du chloroplaste (Davies et Harwood, 1983) entraînant le blanchiment des feuilles ou « photobleaching ».
- Une perturbation de la structure des lipides polaires des chloroplastes se manifestant au niveau de l'insaturation des acides gras liés aux galactolipides (Norman et St John, 1987 ; Abrous *et al.*, 1998 , Di Baccio *et al.*, 2002).

I.3.2.2 Le norflurazon :

Le norflurazon a pour cible principale la phytoène désaturase (Bramley, 1994) protéine de l'enveloppe du chloroplaste (Joyard *et al.*, 1991), codée par le noyau . Le norflurazon étant une molécule lipophile, il agirait avec un domaine hydrophobique de cette enzyme (Chamovitz *et al.*, 1991).

Des études *in vitro* utilisant des membranes photosynthétiques de cyanobactéries *Synechococcus PCC 7942* ont montré que le norflurazon se lie à la phytoène désaturase de façon non covalente et inhibe son activité catalytique de manière non compétitive avec le phytoène substrat de l'enzyme (Sandmann *et al.* , 1989 ; Böger et Sandmann ,1998).

Le norflurazon peut exercer deux types d'action possibles sur la phytoène désaturase :

- L'herbicide peut mimer l'une des molécules venant après le phytoène dans la voie de biosynthèse et agir en tant que régulateur allostérique (Clarke *et al.* , 1982).

- La seconde possibilité est que l'herbicide se lie avec le ou les sites actifs de la

phytoène désaturase. Des études récentes (Breitenback *et al.*, 2001) ont montré que le norflurazon agit en se liant au site de fixation des cofacteurs (NADP⁺, ou plastoquinone) de la phytoène désaturase.

Des études *in vitro* de résistance de la phytoène désaturase à de nombreux herbicides et le séquençage des gènes de la phytoène désaturase (Martinez et Vioque, 1992) ont révélé que cette résistance se manifeste par des modifications du ou des sites d'accrochage de l'herbicide sur la phytoène désaturase.

L'action inhibitrice du norflurazon sur la biosynthèse des caroténoïdes peut être partiellement réversée par le S éthyl dipropylthiocarbamate ou EPTC (Wilkinson, 1989) ou par l'anhydride naphthalique qui agirait en tant qu'antidote de nombreux herbicides en induisant une augmentation de cytochrome P 450 monooxygénase intervenant dans la dégradation des herbicides (Wilkinson, 1993).

I.4 Devenir des pesticides dans le sol :

La durée de vie dans le sol des composées xénobiotiques appelée encore persistance ou rémanence est extrêmement variable. Certains produits organiques de synthèse peuvent être très rapidement minéralisés et recyclés. Cette minéralisation est à la fois physico chimique (texture du sol, pH, température...) et biologique (due aux microorganismes)

I.4.1 Comportement des herbicides dans le sol :

Une fois pulvérisé sur le sol, l'herbicide va être soumis à toute une série de phénomènes physicochimiques qui détermineront son efficacité et son devenir.

- **Solubilisation**

L'herbicide ne peut être absorbé par la plante qu'en solution aqueuse. Cette solubilisation varie selon la dose de l'herbicide, la capacité de fixation de l'herbicide sur les colloïdes du sol et aussi le pH de l'eau de la solution du sol.

- **Adsorption et désorption sur le complexe argilo-humique (Calvet, 1977) :**

L'adsorption correspond à une fixation superficielle sur les colloïdes du sol (argiles essentiellement les montmorillonites, matière organique, et plus généralement le complexe argilo- humique), qui établit une très forte liaison avec les molécules chargées positivement (cations) à tel point que la désorption est dans certains cas pratiquement impossible. Le paraquat et le diquat (cations) sont dans ce cas de figure, ils subissent une inactivité totale, dès qu'ils sont au contact d'un sol pourvu en argiles et en matière

organique. L'adsorption des herbicides par les argiles est temporaire, et selon l'équilibre ionique du milieu, les substances repassent en solution : c'est la **désorption**.

- **La combinaison matière organique-molécule herbicide :**

Cette fixation pourrait se traduire dans certains cas, par une inactivation définitive de l'herbicide, il semblerait que les matières organiques acides désactivent la matière active, alors que les matières organiques calcaires restituent l'herbicide à la manière du complexe argilo-humique (fig. 4).

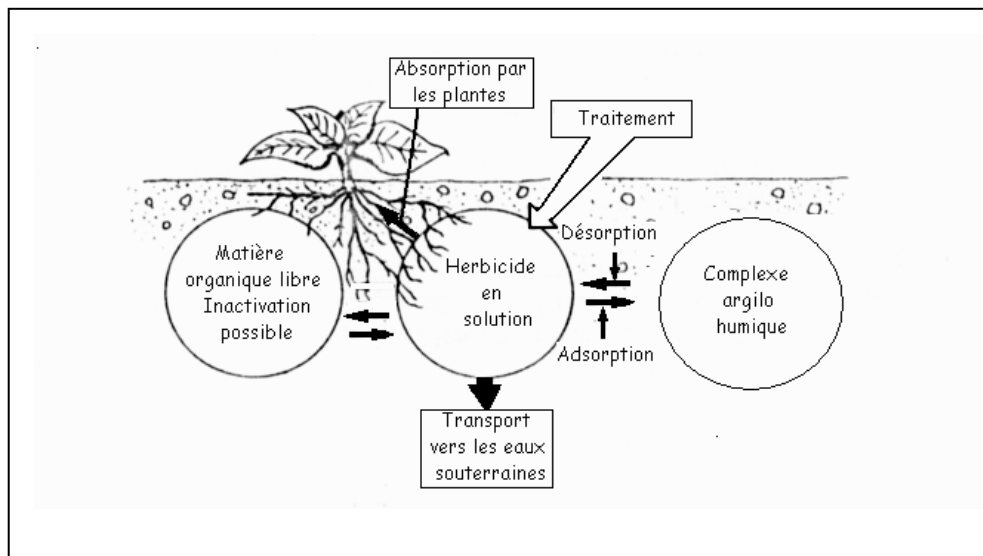


Figure 4 : Devenir d'un herbicide dans le sol (Scalla, 1991)

Ces phénomènes de fixation des herbicides sont extrêmement complexes, encore mal connus. Ils varient avec les produits mis en œuvre et les types de sol impliqués, mais ils sont fondamentaux car ils conditionnent la bonne utilisation des herbicides.

I.4.2 Comportement du norflurazon dans le sol :

Le norflurazon s'adsorbe beaucoup dans les couches supérieures du sol à K_{oc} élevé (organic carbon coefficient) où la matière organique est le facteur prépondérant de l'adsorption; cependant pour des sols pauvres en matière organique, ce sont les argiles qui interviennent et le coefficient K_D (Coefficient de partage sol/eau) permet alors une estimation plus juste de l'adsorption (Hubbs et Lavy, 1990). Les capacités d'adsorption du norflurazon s'atténuent pour s'annuler avec la profondeur du sol.

De nombreuses études portant sur le comportement du norflurazon dans le sol (adsorption, mobilité, photolyse, dissipation et volatilisation) montrent de fortes activités de volatilisation et de photodégradation (Tomlin, 1997). Le norflurazon est doté d'une grande rémanence, ce qui lui confère une bonne persistance dans le sol.

I.5 La biodégradation des pesticides :

- Dans le sol

La majorité des pesticides agricoles actuellement utilisés sont susceptibles d'être biodégradés à court ou à moyen terme. Les agents responsables de la biodégradation se recrutent parmi les bactéries et les champignons, beaucoup plus rarement les algues.

Un nombre considérable de souches bactériennes ou fongiques appartenant à de nombreuses espèces différentes ont été décrites.

Ces deux catégories de microorganismes (bactéries et champignons) du sol semblent jouer le rôle essentiel de la dégradation de ces xénobiotiques, cependant ils ont des comportements différents vis-à-vis des molécules étrangères parvenant au sol : il semblerait que les bactéries symbiotiques de la rhizosphère, lorsqu'elles interviennent dans la dégradation d'un pesticide, soient souvent capables d'aller jusqu'à la minéralisation complète du produit réduisant sa phytotoxicité à un niveau inférieur (Lelie *et al.* 2003).

Les raisons biologiques qui font qu'un microorganisme s'avère capable de dégrader un produit organique de synthèse que ni lui ni ses « ancêtres » n'ont probablement jamais connu sont encore obscures.

Il s'agit de transformations très certainement réalisées dans le sol vis-à-vis des substrats naturels de structures a priori très voisines du composé introduit. Ce que l'on sait cependant, c'est que pour parvenir à cette dégradation, un microorganisme dispose de 2 possibilités :

Le produit dégradé constitue une source nutritive pour une ou quelques souches de microorganismes. En d'autres termes, il peut assurer la croissance des microorganismes qui le décomposent : on dit qu'il y a dégradation par **métabolisme** (Yves, 2001).

Pendant longtemps seule cette possibilité a été envisagée, dans la mesure où l'on pensait que du fait de leur nombre et de leur diversité physiologique les microorganismes

étaient capables de dégrader n'importe quel substrat, comme source de carbone et d'énergie.

Il est apparu récemment (Middeldorp *et al.*, 1999) que certains produits, sans être capables d'assurer la croissance des microorganismes, pouvaient cependant être dégradés par **co-métabolisme**. Il s'agit d'une autre voie de dégradation qui nécessite cependant la présence d'une source de carbone et d'énergie accessoire, pouvant provenir de plusieurs substrats appelés : **co-substrats**.

Ce co-substrat peut être sans rapport de structure avec l'herbicide, ainsi, l'addition de matières organiques diverses (milieux de culture pour microorganismes, glucose ou autre sucre ou engrais vert) peut augmenter la vitesse de décomposition de certains pesticides.

Le co-substrat peut au contraire avoir une structure moléculaire voisine de celle de l'herbicide.

Très souvent, la dégradation d'un herbicide par co-métabolisme est un phénomène lent et ne se traduit que par quelques transformations ponctuelles, qui se manifestent généralement par une perte d'activité de la molécule de départ. Dans les zones très arides, les herbicides doivent être utilisés avec beaucoup de précautions, car ils peuvent en effet persister à des doses phytotoxiques pendant longtemps. Cela peut s'expliquer par la structure sableuse du sol saharien qui favorise un drainage très fort des herbicides qui seront accumulés au niveau des nappes phréatiques.

Cette aptitude des microorganismes à métaboliser les composés les plus divers est de plus en plus systématiquement mise à profit pour la réhabilitation des sols contaminés par des produits xénobiotiques ou simplement pour la destruction des composés toxiques.

- Dans le végétal

Les plantes, disposant d'un équipement enzymatique délimité et défini par les besoins de leur biochimie propre, font face aux défis des herbicides ; on parle de métabolisation, synonyme de détoxification.

La phytotransformation :

Dans les plantes, les herbicides sont soumis à des réactions de métabolisation variées, parmi lesquelles quatre grands groupes dominant nettement : **oxydations**, **hydrolyses**, **conjugaisons** et **réductions**. D'autres réactions : déalkylations, déshydratations, isomérisations jouent quantitativement un rôle mineur.

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

- Phase I

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

- Phase II

Elle est représentée par des réactions de conjugaisons dans lesquelles les produits de la phase I ou bien les produits d'origine sont détoxifiés par conjugaison avec un métabolite endogène (glucose, malonate, glutathion, sulfate etc.).

Ces conjugués sont plus solubles dans l'eau que le produit parental et sont transportés dans la vacuole par des transporteurs (fig. 5).

Des recherches récentes montrent que des transporteurs spécifiques appartenant à la superfamille des ATP binding Cassette (ABC) interviennent dans ce transport (Davies et Coleman, 2000).

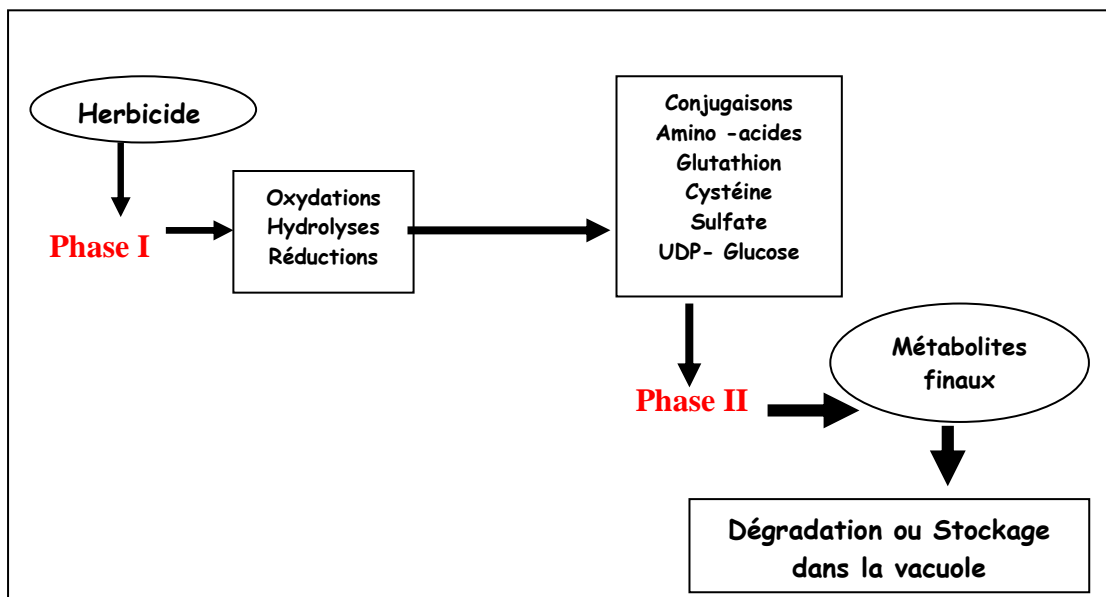


Figure 5 : Schéma de métabolisation d'un herbicide (Scalla, 1991)

I.6 Effet des herbicides sur la nodulation des légumineuses :

Si les effets de la température, la lumière, l'eau, le pH du sol et la nutrition sur les rhizobia sont bien étudiés (Gibson et Jordan 1983), il n'en est pas de même de l'effet des herbicides sur la croissance des rhizobia et de l'établissement de la symbiose. La littérature rend compte de résultats controversés concernant leur effet sur la croissance des rhizobia. C'est ainsi que certains auteurs rapportent des effets négatifs sur la croissance des rhizobia (Clarck et Mahanty 1991 ; Matensson 1992), alors que d'autres études montrent qu'il n'y a aucun effet néfaste sur ces populations bactériennes symbiotiques (Martensson et Nilsson 1989. Sprout *et al.*, 1992 ; Gonzales *et al.*, 1996).

Les herbicides peuvent influencer la nodulation et la fixation symbiotique de l'azote soit en affectant directement les rhizobia, soit en affectant la plante hôte ou encore en agissant sur les deux partenaires symbiotiques.

Singh et Wright (1999) ont montré que les herbicides de préémergence (terbutryne, simazine) réduisent la nodulation, l'activité de la nitrogénase et la croissance des plantules (réduction significative de la photosynthèse et des poids secs des racines et tiges).

D'autre part, l'application des herbicides foliaires de post émergence : le bentazone et le MCPA (4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid) aux plantules de trèfle *Trifolium pratense* aux doses recommandées au champ, affecte la taille des racines, réduit le nombre de nodules et inhibe l'activité de la nitrogénase (Ljunggren *et al.*, 1980).

De même, le Dinoseb (2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol), appliqué en champ sur une culture de trèfle, réduit l'activité de la nitrogénase des plantes (Lindstrom *et al.*, 1985). Il a été suggéré que cet herbicide (Dinoseb) n'affecte pas directement les nodules, mais plutôt le processus de la fixation de l'azote par la destruction des feuilles (siège de la photosynthèse) ce qui a pour conséquence la réduction de la nodulation et de la fixation symbiotique de l'azote chez le haricot (Schnelle, 1990).

Dans la majorité des études publiées, l'effet des herbicides sur la nodulation est variable, il dépend à la fois du type d'herbicide, de sa dose, de l'espèce de rhizobium et de la souche rhizobienne utilisée (Aamil, 2002).

Cependant, la croissance des rhizobia, même si elle est déterminante, ne constitue qu'un aspect de la symbiose. Cette dernière dépend aussi de la formation des nodules, qui met à contribution le végétal lui-même avec tout son aspect physiologique. C'est donc l'ensemble de ces processus qui peut être affecté par l'application des herbicides (Khan *et al.*, 2004 ; Gonzalez *et al.*, 1999).

La phase infective de la symbiose débute juste avant le contact entre le poil absorbant et la bactérie (Fisher et Long, 1992) et durant cette période, l'association est hautement sensible aux conditions environnementales du sol (Keyser *et al.*, 1993) ; par la suite toute la cascade d'événements impliqués dans la nodulation seront affectés par le changement de l'environnement du sol.

Les herbicides appliqués au niveau du sol, particulièrement ceux de préémergence dont fait partie le norflurazon, influencent l'association symbiotique plante-bactérie et aussi les propriétés du sol (Dunigan *et al.*, 1972) ; (Bollich *et al.*, 1985). Cette influence semble étroitement liée aux teneurs en argiles et en matières organiques du sol. (Bollich *et al.*, 1985) ainsi que (Moraes *et al.*, 1989) ont démontré qu'il n'y a pas d'effets d'herbicides observés sur des sols sableux avec une teneur en matière organique inférieure à 2% . Cette absence d'effet serait liée à un fort lessivage des herbicides.

L'application des herbicides affecte la photosynthèse des plantes hôtes, ceci entraîne une réduction des photoassimilats, notamment les sucres et les acides aminés, mais aussi par voie de conséquence l'exsudation racinaire pendant la phase de nodulation (Khan *et al.*, 2004).

Suite à cette modification (quantitative et/ou qualitative) des exsudats racinaires, il en résulte alors une diminution de la taille et du nombre de nodules formés sur les racines, et par conséquent une réduction voire une inhibition de la capacité de fixation de l'azote atmosphérique (Edwards, 1975)

L'effet des herbicides sur la nodulation peut donc résulter d'un effet direct sur les bactéries nodulantes ou d'un effet indirect via leur effet sur les plantes (exsudats racinaires) ou encore d'un effet synergique sur les deux partenaires.

I.7 Herbicides et stress oxydatif :

De nombreux herbicides engendrent la production de molécules réactives d'oxygène, c'est le cas du paraquat ou méthyl viologène (Salin, 1987) des diphényléther (Matringe *et al.*, 1988) et du norflurazon (Jung, 2000).

Le norflurazon en inhibant la biosynthèse des caroténoïdes engendre en effet la formation des molécules réactives d'oxygène (principalement l'oxygène singulet) car l'excès d'énergie ne peut pas être évacué par manque de caroténoïdes. Il s'ensuit alors une photooxydation des chlorophylles (Jung, 2000), une dégradation des protéines, l'altération de l'ADN et la peroxydation des lipides (Ribera, 1990).

La découverte d'espèces réactives d'oxygène présentes normalement dans l'organisme (végétal ou animal) a bouleversé la compréhension des mécanismes biologiques. Chez les végétaux, les phénomènes de la photosynthèse et de la respiration conduisent inévitablement à la formation de ces espèces actives d'oxygène :

I.7.1 Sites de formation des espèces actives d'oxygène :

L'oxygène moléculaire ou O₂ est une molécule indispensable à la vie des organismes aérobies car elle joue un rôle fondamental dans la respiration cellulaire et dans leur métabolisme énergétique.

L'oxygène moléculaire possède deux électrons non appariés situés sur des orbitales distinctes de spin parallèle (champ magnétique induit par la rotation d'un électron sur lui-même) lui conférant une stabilité relativement grande. Cette molécule d'oxygène peut être activée ce qui la rend dangereuse pour les systèmes biologiques.

L'activation correspond à une altération de la structure électronique de la molécule d'O₂ par une suite de réactions d'oxydo- réductions qui conduisent successivement à la formation de diverses molécules appelées espèces réactives d'oxygène.

Les radicaux libres peuvent dériver aussi du nitrogène (azote) tels le monoxyde d'azote (NO[•]) et le peroxinitrite (ONOO⁻) formés au cours de quelques réactions du métabolisme cellulaire (Yoshikawa *et al.*, 2000).

Les espèces réactives d'oxygène sont formées au cours du fonctionnement normal de la cellule végétale au niveau du chloroplaste (chaîne photosynthétique des électrons), de la mitochondrie (chaîne respiratoire) et des péroxysomes (lors de l'oxydation des lipides ou encore de la photorespiration (Mittler, 2002, del Rio *et al.*, 2002).

De nouvelles sources d'espèces actives d'oxygène ont été identifiées chez les plantes telles les NADPH oxydases au niveau de la membrane plasmique générant des ions superoxyde, des amine oxydases au niveau de l'apoplasme entraînant la formation du peroxyde d'hydrogène ou encore des peroxydases liées à la paroi cellulaire générant du peroxyde d'hydrogène et des ions superoxydes. Ces voies participent à la production des ROS pendant les processus tels la mort cellulaire programmée ou la défense face aux pathogènes (Mittler, 2002).

Les espèces réactives d'oxygène peuvent être formées à partir de l'O₂ suivant deux mécanismes différents:

- L'absorption d'énergie conduit à la production de l'ion singulet ou ¹O₂ qui comporte deux électrons non appariés et de spins opposés; il se forme essentiellement au niveau du PSII dans le chloroplaste.
- Des réductions monovalentes successives à partir de l'oxygène moléculaire conduisent par ordre de réactions à la formation de l'ion superoxyde O₂⁻, du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et du radical hydroxyl OH[°].

Il est à noter que la première étape de cette suite de réductions requiert une certaine quantité d'énergie, apportée par les systèmes biologiques à NADP (H).

L'ion superoxyde et le radical hydroxyl sont deux molécules très réactives: du fait de leur demi vie inférieure à une seconde, elle réagissent avec les composants cellulaires sur le site même de leur formation.

Le peroxyde d'hydrogène est plus stable, de ce fait, la molécule a la capacité de diffuser à travers les membranes et d'aller réagir à une certaine distance de son lieu de production.

1.7.2 Toxicité des espèces actives d'oxygène :

Les ROS sont capables d'endommager les composants majeurs de la cellule à savoir les acides nucléiques, les protéines et les lipides.

- Lésions des acides nucléiques :

Les lésions des acides nucléiques par les ROS peuvent provenir d'une cassure sur un ou sur les deux brins; celle-ci résulte principalement de l'attaque par les radicaux hydroxyls sur la liaison sucre-phosphate (réaction d'arrachement d'un atome d'hydrogène au niveau du sucre) ou d'une attaque par le radical hydroxyl qui se fixe sur les doubles liaisons des bases pyrimidiques ou puriques (Cadet *et al.*, 1999).

- Lésions des protéines :

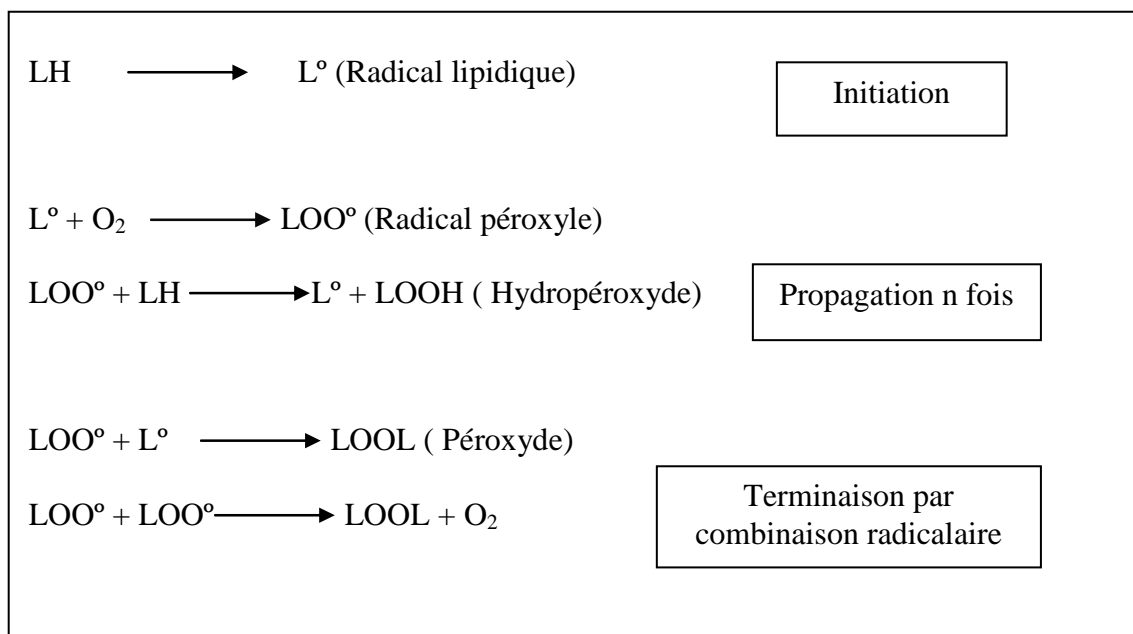
Les ROS peuvent entraîner des réactions d'oxydation des protéines. Tous les acides aminés sont susceptibles d'être oxydés par les ROS. Les dommages oxydatifs des acides aminés mènent à la dénaturation, à la fragmentation des protéines et à la formation d'agrégats protéiques (Sandmann, 1990).

Lésions des hydrates de carbone :

Les radicaux hydroxyls (HO•) peuvent réagir avec les hydrates de carbone tels que les sucres et les polyols (Smirnoff et Cumbes, 1989). L'oxydation des sucres engendre la formation de l'acide formique comme produit majoritaire, ce dernier représente la forme finale de l'oxydation des sucres (Isbell *et al.*, 1973).

Lésions des lipides :

La peroxydation des lipides est une réaction en chaîne comportant une phase d'initiation, une phase de propagation et une phase de terminaison. Elle est initiée par l'attaque d'un radical hydroxyl sur un acide gras insaturé (LH) entraînant l'abstraction d'un atome d'hydrogène et la formation d'un radical lipidique (L°). Dans un environnement aérobique, l'oxygène s'additionne sur le radical lipidique (L°) pour donner un radical peroxyde (LOO°) (fig.6). Une fois initié, le radical peroxyde peut propager la réaction en chaîne de peroxydation par abstraction d'un atome d'hydrogène d'un autre acide gras insaturé.



L'hydroperoxyde formé (LOOH) peut être décomposé en d'autres espèces réactives telles le radical alkoxy (LO^\bullet), les aldéhydes (malondialdéhyde), les acides et les alcanes (éthane, éthylène, pentane).

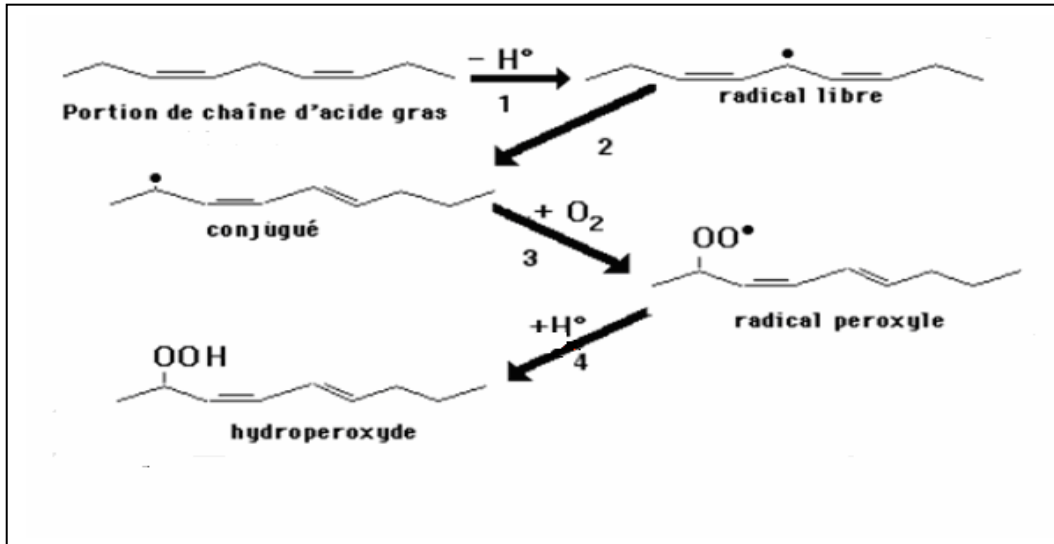


Figure 6 : Peroxydation d'une portion de chaîne d'acide gras polyinsaturé (Minotti .et Aust, 1992)

Le Malondialdéhyde : Un biomarqueur du stress oxydatif chez les végétaux (Ryu, 2006)

Le malondialdéhyde de formule chimique développée $C_3O_2H_4$ (fig.7) correspond à une expression de cette peroxydation lipidique (Pompella *et al.* 1987).

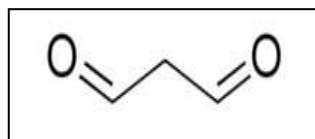


Figure 7: Structure biochimique du malondialdéhyde

Les produits de la peroxydation (particulièrement les aldéhydes) peuvent diffuser à travers les membranes et atteindre d'autres compartiments cellulaires. Ces aldéhydes peuvent agir comme agent de pontage et peuvent inhiber les fonctions enzymatiques ou jouer un rôle dans l'agrégation des protéines. De telles modifications peuvent entraîner des perturbations fonctionnelles des cellules pouvant aboutir à la mort

cellulaire.

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

I.8 Systèmes antioxydants :

En raison des dommages potentiels que peuvent engendrer les ROS sur les différentes biomolécules (acides nucléiques, protéines hydrates de carbone et lipides), plusieurs systèmes de défense cellulaire antioxydants sont présents dans les cellules.

I.8.1 les antioxydants non enzymatiques

1. Les caroténoïdes:

Ce sont des composants essentiels des membranes des thylakoides impliqués non seulement dans la collecte de l'énergie lumineuse au niveau des antennes collectrices d'énergie, mais ils sont également photoprotecteurs car ils peuvent éliminer l'excès d'énergie "quenching" des chlorophylles; ils agissent aussi en tant que scavengers des molécules actives d'oxygène (Young, 1991).

Les propriétés stabilisatrices et photoprotectrices des xanthophylles présentes dans les membranes des chloroplastes ont été étudiées en se basant sur des mutants d'*Arabidopsis thaliana* affectés à différents niveaux de leur biosynthèse des caroténoïdes (Havaux *et al.*, 2005). Ces mutants sont albinos en conditions normales d'éclairement (photobleaching).

Le cycle des xanthophylles c'est à dire la déépoxydation de la violaxanthine en zéaxanthine (fig 8), constitue un système photoprotecteur non seulement au niveau des photosystèmes mais également au niveau de la matrice lipidique des membranes plastidiales (limitation de la peroxydation des lipides).

Ce cycle permet la dissipation de l'excès d'énergie empêchant ainsi la formation de l'oxygène singulet (O_2^1).

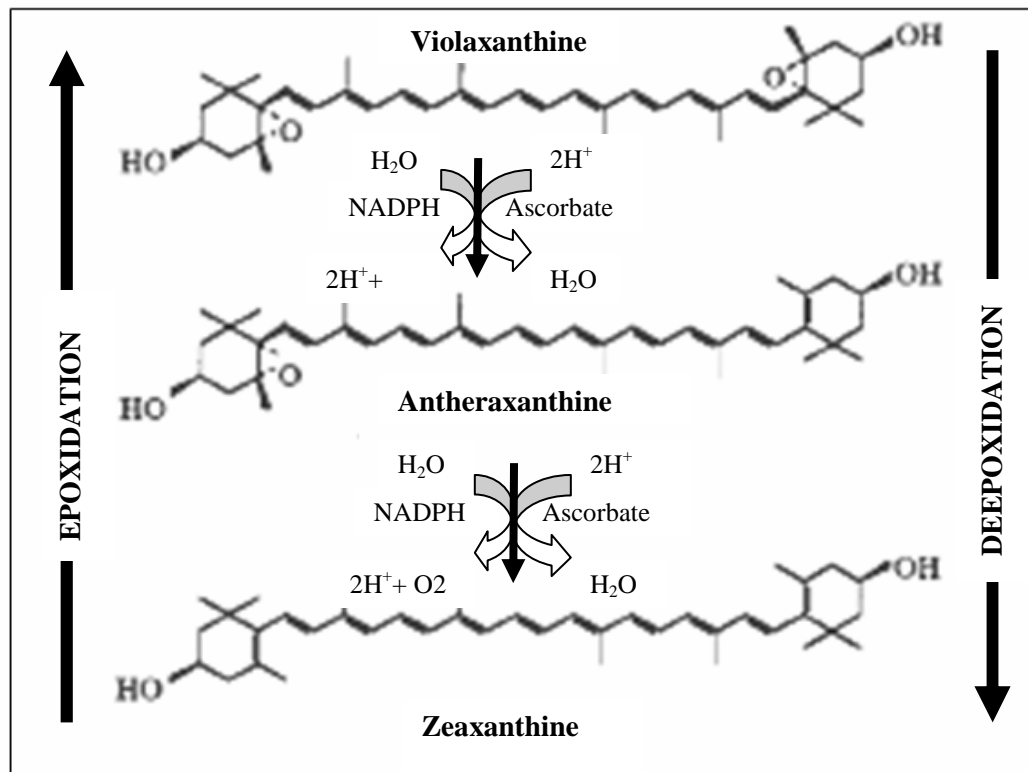


Figure 8 : Cycle des xanthophylles (Young *et al.*, 1998)

2. Les tocophérols :

En particulier l'alpha tocophérol ou Vitamine E qui sont des produits liposolubles protègent les membranes et surtout celles des chloroplastes, des mitochondries et des peroxyosomes. Ils interrompent la propagation de la chaîne de réactions radicalaires en piégeant les radicaux alkoxy et peroxy (Havaux *et al.*, 2005).

La vitamine E piégeuse va devenir un radical, moins réactif que le radical lipidique peroxy (LOO^\bullet), qui sera soit détruite, soit régénérée par un autre système antioxydant : l'ascorbate ou vitamine C qui est elle même régénérée par des enzymes, telles les ascorbates réductases (Packer, 1991) (fig. 9)

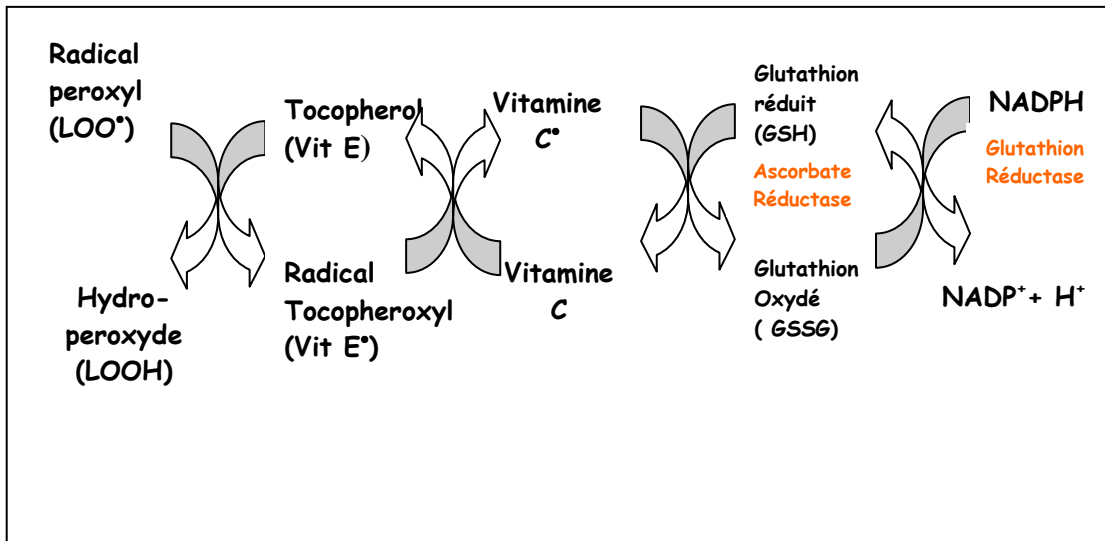


Figure 9: Exemple de réaction antioxydante en chaîne mettant en jeu les vitamines E et C.

3. L'acide ascorbique ou Vitamine C

C'est un composé hydrosoluble impliqué dans les réactions de défense. C'est l'antioxydant prédominant du point de vue quantitatif des cellules végétales en particulier dans les tissus verts (Noctor et Foyer, 1998). Elle intervient dans le cycle ascorbate glutathion mais aussi dans le cycle des xanthophylles. Elle permet la régénération de la Vitamine E (Fryer, 1992).

4. Le glutathion

Le glutathion (L- γ -glutamyl-L-cystéinyl-glycine) est un composant vital de la protection antioxydante cellulaire. C'est un tripeptide ubiquitaire retrouvé chez les mammifères, la plupart des plantes et les microorganismes. Dans les conditions physiologiques, le glutathion réduit (GSH), résistant à l'oxydation spontanée, est maintenu en équilibre dans le cytosol avec sa forme oxydée disulfure (GSSG). Sa concentration cytosolique, de l'ordre du millimolaire, en fait le thiol non-protéique prédominant. La forme biologiquement active du glutathion est sa forme réduite qui contient le résidu cystéine porteur d'un thiol hautement réactif et résistant à l'oxydation spontanée. Le GSH réduit exerce de nombreuses fonctions protectrices vitales, notamment dans la défense

antioxydante. De façon générale, le GSH maintient l'équilibre redox intracellulaire et les antioxydants non-enzymatiques (thiols et vitamines) sous leur forme biologiquement active réduite, régule l'expression et/ou l'activation de facteurs de transcription sensibles à l'oxydation et nécessaires au fonctionnement de la réponse antioxydante, exerce un effet cytoprotecteur en neutralisant les métabolites du stress oxydant à l'aide de ses propriétés réductrices et en servant de co-enzyme aux GST et GPX.

Chez les plantes, par exemple, dans de nombreux cas l'exposition à un herbicide augmente la production du glutathion et l'activité de la glutathion transférase. Cet enzyme fixe une grande quantité d'herbicides sur le glutathion. Le xénobionte modifié n'est ainsi généralement plus toxique

5. Les composés phénoliques :

Ce sont des produits du métabolisme secondaire produits par les végétaux et ayant des propriétés antioxydantes du fait qu'ils ont la capacité de piéger les radicaux libres.

La capacité antioxydante des composés phénoliques peut se manifester de différentes façons : dans les systèmes oxydatifs utilisant les métaux tels le cuivre ou le fer, ils peuvent chélater les ions métalliques les empêchant ainsi d'intervenir dans les réactions de Fenton pouvant générer de fortes concentrations de radicaux hydroxyls (Halliwell et Gutterige, 1990 ; Halliwell et al., 1995). Cependant le plus important rôle des composés phénoliques est lié à leur habilité de scavengers des radicaux libres en cassant la chaîne de réactions engendrée par les radicaux libres.

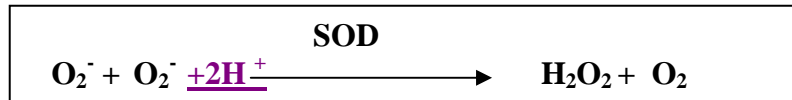
Les propriétés antioxydantes des composés phénoliques sont associées avec leur aptitude à former des liaisons hydrogène intramoléculaires entre les groupes hydroxyl et les radicaux phénoliques (Visioli et Galli, 1998_b). Le degré d'activité antioxydante des composés phénoliques est corrélée avec le nombre de groupes hydroxyls et leur position sur le cycle, la situation ortho diphenolique leur conférant une forte activité antioxydante (Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Cao *et al.*, 1997 ; Tripoli *et al.*, 2005).

I.8.2 Les défenses antioxydantes enzymatiques:

Ces systèmes comprennent les superoxydes dismutases (SOD), les catalases, le cycle ascorbate/glutathion et les glutathion peroxydases.

1 . Les superoxydes dismutases :

Les SOD (SOD, EC 1.15.1.1) sont des métalloprotéines capables d'éliminer l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, formant avec deux ions superoxydes une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Elles existent sous plusieurs isoformes dont la structure d'ensemble est très bien conservée lors de l'évolution. Elles présentent un puit hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse l'anion superoxyde (Zelko, 2002)

Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer les SOD à manganèse (Mn SOD) dans la mitochondrie, des SOD à cuivre – zinc dans le cytosol et les chloroplastes (Cu – Zn SOD) , et des SOD à Fer dans les chloroplastes (Fe /SOD). Chez le pois, une isoforme Cu/Zn-SOD a été identifiée dans les péroxysomes (del Rio *et al.*, 1992). L'apoplasme pourrait également contenir une isoforme Cu/Zn-SOD (Karpinska *et al.*, 2001) (fig. 10).

L'H₂O₂ est à son tour réduit en eau par une séquence de réductions impliquant le cycle ascorbate/glutathion et le NADH. Cette réduction est nécessaire pour prévenir la réaction avec l'ion supéroxyde et la formation de radicaux hydroxyl.

2. Les catalases (CAT, EC 1.11.1.6)

Réduisent deux molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire comme le montre la réaction suivante :



Différentes isoformes de CAT ont été détectées dans les péroxysomes et glyoxysomes (Scandalios, 1987; Ni et Trelease, 1991); l'isoforme CAT1 présente majoritairement dans le mésophylle foliaire conduit à la détoxification du H₂O₂ formé au cours de la photorespiration (Willekens *et al.*, 1994) comme le montre la réaction suivante :

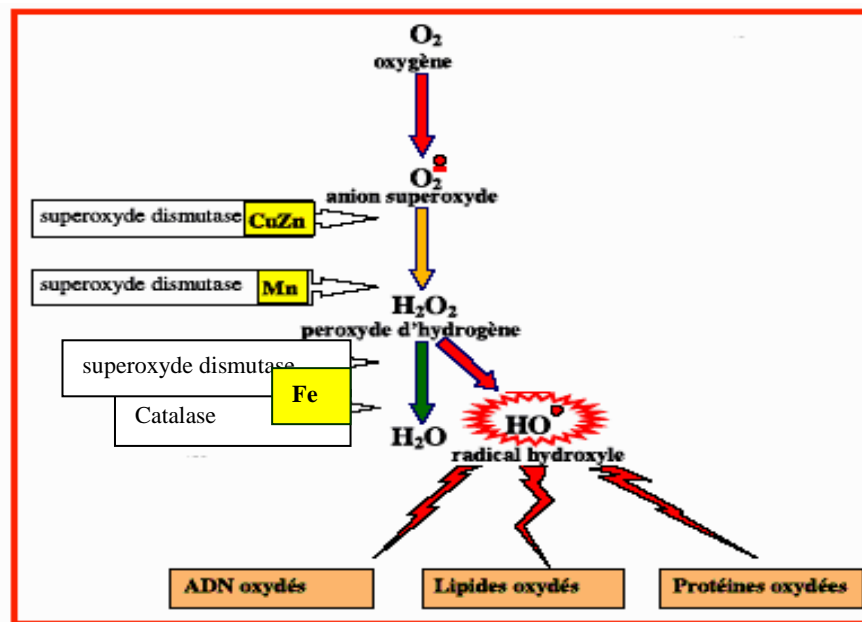


Figure 10 - Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques. (Favier, 2003).

3. Le cycle ascorbate/glutathion (cycle de Halliwell-Asada, 1989)

C'est le système antioxydant majeur du chloroplaste (Foyer et al., 1994). L'ascorbate peroxydase utilise deux molécules d'ascorbate (AA) pour réduire le H_2O_2 en eau. Des isoformes de l'AsPOD ont été détectées dans les chloroplastes (une forme soluble et une forme liée aux thylakoïdes), dans le cytosol, dans les mitochondries, les péroxysomes et l'apoplasme. La réaction catalysée par l'AsPOD aboutit à la formation de deux molécules de monodéhydroascorbate (MDHA). Celui-ci peut se transformer en déhydroascorbate et en ascorbate.

Au niveau du plasmalemme ou de la membrane des thylakoïdes, le MDHA peut être réduit directement en ascorbate, de manière non enzymatique en présence de cytochrome ou de ferrédoxine réduite) ou de manière enzymatique par l'action d'une MDHA réductase en présence de NADPH.

Le DHA est réduit en ascorbate par l'action d'une DHA réductase qui utilise le glutathion comme réducteur. Le glutathion oxydé est à son tour réduit en glutathion réduit par une glutathion réductase (GR) qui utilise le NADPH (Noctor et Foyer, 1998). L'activité glutathion réductase a été détectée dans les chloroplastes et dans le cytosol (fig. 11).

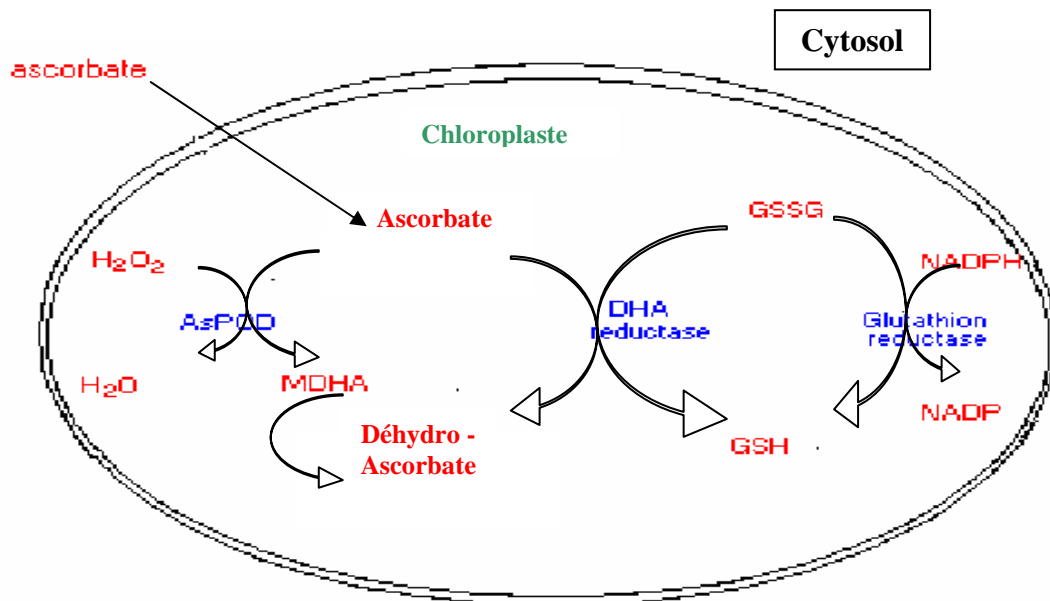


Figure 11 : Le cycle ascorbate- glutathion adapté par Foyer, Lelandais et Kunert (1994).

4. Les glutathion peroxydases

Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène en eau en présence du glutathion. Elles sont impliquées dans la réduction des hydroperoxydes dont ceux de lipides (Eshdat *et al.*, 1997). Une famille de glutathion peroxydase, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase s'attaque directement aux hydroperoxydes de lipides issus de l'oxydation des lipides membranaires réduisant ainsi les hydroperoxydes de lipides.

Tous ces systèmes de défense fonctionnent dans la cellule, mais si la pression exercée sur eux par les conditions extérieures devient trop forte, ils sont dépassés et ne peuvent plus assurer la détoxification de l'organisme végétal.

Actuellement, les chercheurs s'intéressent à la possibilité d'améliorer la résistance des plantes aux dommages causés par les formes toxiques de l'oxygène en essayant de forcer les plantes à produire des quantités d'enzymes antioxydantes supérieures à la normale et de façon constante (Foyer, 1993).

Chapitre II

Matériel

et

Méthodes

II.1 Matériel végétal :

La présente étude a été menée sur deux variétés d'une plante dicotylédone : le haricot « *Phaseolus vulgaris* » : une qui est locale appelée Terga (originaire de Ain Témouchent), et l'autre est importée, elle est dite Coco de Prague (Originaire de Prague)

Les deux variétés ont été fournies par l'ITGC (Institut Technique des Grandes Cultures) de la station d'Oued Smar.

Ces deux variétés présentent un aspect réniforme mais sont de couleur différente, la variété Terga est blanche avec un poids moyen de 0,3g , par contre la variété Coco de Prague est de couleur marron clair moucheté de rouge et de poids moyen de 0,5 g (fig. 12)



Figure 12 : Graines de la variété Coco de Prague et graines de la variété Terga

II.2 Herbicide utilisé :

Le norflurazon (San 9789) de nom commercial « zorial » est d'origine suisse Sandoz (Novartis Agro). Il appartient à la famille des pyridazinones.

Sa formule chimique est : 4-Chloro-5- méthyl- amino 2 α , α , α , trifluoro-méthyl phényl 3 (2H) pyridazinone (fig 13) et sa masse molaire est de 303,7 .

Il se présente sous forme d'une poudre cristalline, solide, de couleur marron, soluble dans l'eau à une concentration de 28 mg/ l et à une température de 23°C.

Il est aussi soluble dans l'éthanol à 14,2 g/ml ainsi que dans l'acétone (Richard, 2004).

Sa formule développée est représentée comme suit :

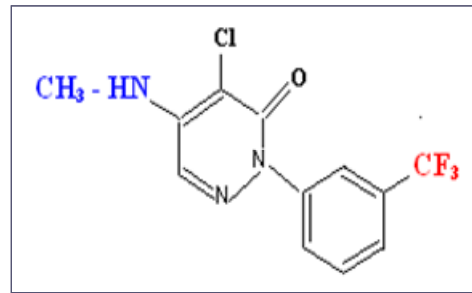


Figure 13 : Formule chimique du norflurazon 4-Chloro-5- méthyl- amino 2 α, α, α , trifluoro-méthyl phényl 3 (2H) pyridazinone.

Il est efficace sur les graminées et un certain nombre de dicotylédones annuelles et bisannuelles ; il est utilisé dans le désherbage de la vigne, du cotonnier, du soja, de l'arachide, des céréales et d'un certain nombre d'arbres fruitiers (abricotier, pêcher, poirier, pommier et prunier (Beste et Humberg, 1989). La dose préconisée au champ est de 2000g/ha.

II.3 Le substrat édaphique :

Le sol utilisé provient du champ de la station expérimentale de l'ITGC Oued Smar, qui a été longtemps utilisé pour des cultures de légumineuses. L'échantillon a été séché à l'air libre au laboratoire, puis tamisé à 2 mm mailles carrées.

II.4 Méthodes d'étude

II.4.1 Analyse du sol

Dans le cadre de cette étude, nous avons déterminé trois paramètres: la matière organique du sol, sa texture ainsi que son pH.

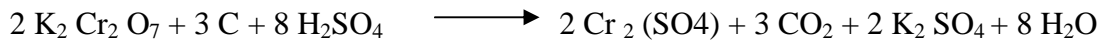
- **Détermination de la teneur en matière organique du sol :**

Nous avons utilisé la méthode de ANNE, qui consiste à déterminer la teneur en carbone, constituant majeur de la MO.

- **Combustion :**

0,25 g de terre sont finement broyés, puis placés dans un ballon à col rodé muni d'un réfrigérant ascendant.

10 ml de bichromate de potassium à 8% ($K_2Cr_2O_7$) et 15 ml d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) sont ajoutés. Le mélange est porté à ébullition jusqu'à condensation de la première goutte ; l'attaque acide se fait selon la réaction suivante :



Après refroidissement, le surnageant est transvasé dans une fiole jaugée de 200 ml. Le ballon est rincé plusieurs fois et les eaux de lavage sont récupérées à chaque fois.

20 ml de cette solution sont prélevés auxquels sont ajoutés : 180 ml d'eau distillée, 1 g de Fluor de Sodium (NaF) et 3 gouttes de Diphénylamine. Ces deux composés sont rajoutés pour avoir un changement de couleur plus visible au cours du titrage

- **Titration :**

Le titrage du bichromate en excès se fait à l'aide d'une solution réductrice de sel de Mohr (sulfate de fer ferreux et d'ammonium), selon la réaction suivante :



- **Détermination de la texture du sol (analyse granulométrique)**

Les agrégats qui constituent la structure du sol sont d'abord détruits puis dispersés.

- **Destruction de la matière organique (MO)**

20 g de terre fine séchée à l'air sont placés dans un bêcher de 500 ml, puis 50 ml d'eau oxygénée (H_2O_2) sont rajoutés et le bêcher est porté à ébullition. La présence de la matière organique est matérialisée par un développement d'une mousse à la surface de la suspension de sol. L'oxydation totale de la matière organique se traduit par une absence de mousse, indiquant ainsi la fin de cette première étape.

- **Dispersion des particules du sol**

Le contenu du bêcher est ensuite transvasé dans un flacon de 1l, contenant 500 ml d'eau distillée et 25ml de pyrophosphate de sodium (à 40 g/l) le tout est agité par retournement pendant 2 h.

La suspension de sol est ensuite ajustée à 11 avec de l'eau distillée, dans une allonge à sédimentation, qui sera agitée par retournement en s'assurant que tout le dépôt accumulé au fond du tube est entièrement remis en suspension.

Cette allonge est maintenue stable loin de toute source de chaleur pendant le temps qui correspond aux prélèvements des particules (argiles, limons, sables).

- **Détermination de la fraction « argiles + limons »**

La température de l'eau dans l'allonge est mesurée, et le temps de sédimentation de chaque type de particule est déterminé à partir de tables de calculs (annexe II).

Les prélèvements sont effectués grâce à une pipette de Robinson.

- **Détermination de la fraction « argiles »**

Après 6h de sédimentation, le prélèvement est réalisé à l'aide d'une pipette de Robinson et le mode opératoire est le même que celui utilisé pour la fraction « argiles + limon ».

- **Détermination de la fraction « sables »**

(Les sables sont ensuite récupérés dans une grande capsule (préalablement tarée) et placés à l'étuve à 90°C, pendant 24 h. Le poids sec des sables est alors déterminé.

Le type de sol est donné selon le triangle de texture de USDA (Annexe III).

Mesure du pH :

- **Détermination de l'acidité actuelle pH_{eau}**

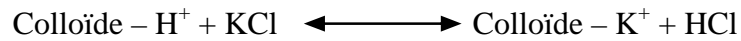
Cette acidité actuelle représente l'image de la quantité d'ions H^+ présents dans la solution du sol. Elle s'exprime par le pH ou le titrage d'un extrait aqueux de sol (pH_{eau}).

Afin de déterminer cette acidité, nous avons placé 20 g de terre fine séchée dans un bêcher de 100 ml, auquel sont ajoutés 50 ml d'eau distillée préalablement bouillie et refroidie. La suspension est agitée énergiquement à l'aide d'un agitateur en verre pendant quelques minutes. Elle est ensuite maintenue au repos pendant 15 min, puis agitée de nouveau durant 1 min la lecture du pH se fait par conductimètre.

- **Détermination de l'acidité d'échange pH_{KCl}**

L'acidité d'échange est l'image de la somme des ions H^+ présents dans la solution et dans la phase échangeable du sol. Elle est exprimée par le pH ou le titrage d'une solution saline de sol. Cette expression paraît la plus intéressante, du point de vue écologique, car elle intéresse des échanges se passant dans les conditions naturelles du

sol. Ainsi, en présence d'une solution de chlorure de potassium (KCl), les colloïdes du sol libèrent une partie de leurs ions H^+ qui seront échangés avec le KCl, comme le montre la réaction suivante :



Dans ce cas, il y a abaissement du pH et de ce fait, le pH_{KCl} est toujours inférieur au pH_{eau} .

Pour cela, une quantité de 3,72 g de KCl pur est ajoutée à la suspension aqueuse précédente, le tout est agité pendant 1 minute pour dissoudre le sel puis le pH est de nouveau relevé.

II.4.2 Mise en culture des graines de haricot :

Les graines de haricot sont stérilisées à l'hypochlorite de sodium (12°) pendant 10 minutes, rincées plusieurs fois à l'eau courante, puis imbibées pendant 6 heures dans de l'eau distillé.

Ces graines sont mises à germer dans des boites de pétri, tapissées de papier filtre à raison de 25 graines par boite à l'obscurité, à température ambiante; elles sont arrosées à l'eau du robinet.

Dès la percée de la radicule, elles sont transférées dans des pots contenant 200 g de sol, à raison d'une plantule par pot. Les dispositifs expérimentaux ont été soumis à une randomisation totale (changement quotidien de position des pots), afin d'éviter des artefacts comme les effets de bordure qui peuvent influencer grandement sur l'éclaircissement, la température et l'humidité des pots.

Quatre lots sont ainsi constitués (Le nombre de répétitions par traitement est de 3).

Lot « T » : Les pots sont arrosés à l'aide de 46 ml d'eau de robinet.

Lot «1» : Les pots sont arrosés à l'aide de 46 ml de la solution de Norflurazon **1 μM**

Lot «2» : Les pots sont arrosés à l'aide de 46 ml de la solution de Norflurazon **10 μM** .

Lot «3» : Les pots sont arrosés à l'aide de 46 ml de la solution de Norflurazon **100 μM** .

- **Détermination de la capacité de rétention en eau du sol :**

Cette capacité correspond à la différence pondérale entre un échantillon de sol et le même échantillon saturé d'eau par capillarité, après un séjour de 24 heures de reessuyage (drainage).

L'opération effectuée en trois répétitions, a permis de déterminer que la capacité de rétention en eau du sol est de l'ordre de 23%. (23 ml pour 100 g de terre tamisée à 2 mm maille carré et séché à l'air libre).

II.4.3 Etudes morphologiques et biométriques :

- **La croissance linéaire :**

La longueur des plantules a été mesurée à l'aide d'un papier millimétré. Ces mesures ont été réalisées sur la partie aérienne des plantules âgées de 21 jours (stade correspondant aux deuxièmes feuilles bien développées).

Aux moyennes des mesures effectuées sur une trentaine d'individus (exprimés en centimètres). Les mesures de la surface foliaire ainsi que toutes les extractions et les analyses ont été effectués au stade deuxième feuille bien développées.

- **Mesure de la surface foliaire :**

La surface foliaire est calculée comme suit :

- 1 cm² d'un papier calque (80 g/m²) est pris, puis pesé à l'aide d'une balance de précision (0,1 mg).
- La forme de la feuille est dessinée sur le même type de papier, découpée puis pesée.
- La surface foliaire (X) est déduite par la formule suivante :

mf : masse du papier découpé.

mp : masse de 1 cm² du papier.

$$X = \frac{mf}{mp}$$

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

II.4.4 Extraction et dosage des pigments foliaires :

0.2 g de feuilles sont broyées à sec dans 10 ml d'acétone à 80 %, le broyat est centrifugé à 3000 tr/mn pendant 10 mn, le surnageant récupéré contient les pigments. Les teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes sont déterminées après lecture de la DO à 647,663 et 470 nm selon les équations de Lichtenthaler (1987).

$$\begin{aligned} \text{Chla} &= 12,25 \cdot \text{DO } 663 - 2,79 \cdot \text{DO } 647 && \mu\text{g/ml} \\ \text{Chlb} &= 21,5 \cdot \text{DO } 647 - 5,1 \cdot \text{DO } 663 && \mu\text{g/ml} \\ \text{Chla+b} &= 7,15 \cdot \text{DO } 663 + 18,71 \cdot \text{DO } 647 && \mu\text{g/ml} \\ \text{Caroténoïdes} &= \frac{1000 \text{ DO } 470 - 1,82 \cdot \text{Chla} - 85,02 \cdot \text{Chl b}}{198} && \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

198

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

II.4.5 Extraction et dosage des sucres solubles et de l'amidon :

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

• **Extraction des sucres solubles :**

1 g de matière végétale fraîche est broyé à sec puis dans 10 ml d'éthanol à 80 % bouillant, après agitation et centrifugation à 5000 trs/mn pendant 20 mn, le surnageant est récupéré, cette opération est répétée trois fois, en lavant le culot à chaque fois avec 10 ml d'éthanol à 80% bouillant, ainsi les trois surnageants sont mélangés et ajustés à 20 ml avec l'eau distillée. L'extraction de l'amidon se fait à partir du culot auquel sont rajoutés 5 ml d'eau distillé froide et 6,5 ml d'acide perchlorique à 65 % .

Après 24 heures d'incubation à l'obscurité et au froid, le mélange est centrifugé à 5000 trs/mn pendant 20 mn puis le surnageant est récupéré. L'opération est répétée encore une fois, mais cette fois ci l'incubation n'est que de 30 mn dans la glace et à l'obscurité, après centrifugation, les deux surnageants sont mélangés et ajustés à 50 ml avec de l'eau distillé.

Une gamme étalon a été préparée à partir d'une solution mère de glucose à 100 µg/ml, celle-ci servira à déterminer la quantité des sucres solubles qui est exprimée en mg de glucose par gramme de matière végétale fraîche (mg glucose/ g MVF).

La quantité d'amidon totale est obtenue en multipliant la quantité totale des sucres solubles, issue de l'hydrolyse, par un facteur de pondération qui est 0,9. (Facteur de Mc Ready).

II.4.7 Extraction et dosage des peroxydes d'acides gras :

Le dosage des peroxydes d'acides gras est effectué sur des extraits lipidiques de feuilles de plantules de haricot témoins et traitées par l'herbicide à différentes concentrations. (1 µM, 10 µM et 100 µM).

- **Extraction des lipides :**

L'extraction est réalisée selon la méthode de Bligh et Dyer (1959). 1 g de matière végétale fraîche est fixé dans 10 ml d'eau distillée bouillante pendant 3 mn ce qui permet de dénaturer les phospholipases. Après refroidissement, les tissus sont broyés dans 10 ml de méthanol (rupture des liaisons lipoprotéiques) puis dans 10 ml de chloroforme (solvant dans lequel sont solubilisés les lipides)

Après addition du reste d'eau ayant préalablement servi à la fixation, le mélange est soumis à une centrifugation pendant 15 mn à 3000 trs/mn. Deux phases distinctes sont obtenues : une phase supérieure contenant l'eau et le méthanol qui sera éliminée et une inférieure chloroformique qui renferme les lipides ; celle ci est récupérée à l'aide d'une pipette pasteur puis conservée au froid.

- **Dosage des peroxydes d'acides gras :**

Les méthodes colorimétriques sont basées sur le principe de l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} par les hydroperoxydes présents. La méthode au thiocyanate de fer (Chapman & Mackay, 1949 ; Kolthoff & Medalia, 1951 ; Shanta et coll., 1994) est basée sur l'oxydation des ions ferreux en ions ferriques en présence de peroxydes suivi d'une mesure spectrophotométrique du complexe formé entre les ions ferriques et le thiocyanate. A un volume d'extrait chloroformique, sont ajoutés 500 µl d'éthanol absolu, 20 µl d'HCl (1N) et 20 µl d'une solution d'ammonium ferreux à 1 %. Après quelques secondes, 100 µl de thiocyanate d'ammonium à 20 % sont ajoutés. La lecture des DO est faite après quelques minutes à 480 nm.

II.4.7 Dosage des dérivés TBARS ou Thiobarbituric Reactive Substances dont le malondialdéhyde :

Le dosage des TBARS reflète l'état de peroxydation lipidique, une des conséquences du stress oxydatif cellulaire.

La méthode la plus utilisée pour l'estimation in vitro de la peroxydation des lipides dans les systèmes biologiques est le dosage des substances réactives à l'acide thiobarbituriques dont le malondialdéhyde (MDA) par la réaction à l'acide thiobarbiturique (TBA).

Le principe repose sur la réaction du MDA avec deux molécules d'acide thiobarbiturique en milieu acide et à chaud. Ce qui permet la formation d'un chromophore MDA-TBA extrait par un solvant organique. La concentration en substances réactives au TBA (sr-TBA), exprimée en équivalent MDA, est évaluée par la lecture de l'absorbance au spectrophotomètre visible à 532 nm.

L'extraction a été effectuée à froid en broyant 100 mg de feuilles dans 300 µl du mélange (tampon, Triton et butylhydroxytoluène.), après homogénéisation, le broyat est centrifugé pendant 20 mn à 10 000 g et à 4°C.

Un volume du surnageant est repris dans 300 µl d'acide trichloroacétique (TCA) à 10 % additionné de 450 µl d'acide 2-thiobarbiturique (TBA) 0,67 % préparé dans du TCA 10% ; Les échantillons sont bouillis à 95°C pendant 15 mn puis refroidis 5 mn dans la glace. Après centrifugation pendant 10 mn à 10 000 g à 4°C, le surnageant est récupéré et dosé par spectrophotométrie à 532 nm.

Une gamme étalon a été réalisée en faisant réagir des quantités connues d'un précurseur du MDA, le 1, 1, 3, 3 tétraméthoxypropane (TMP) avec le TBA dans les conditions expérimentales sus décrites

II.4.8 Etude de la nodulation des plantules de haricot :

- **Dénombrement des nodules :**

Après six semaines de culture en sol, les plantules de haricot témoins et traitées sont déterrées, leurs systèmes racinaires sont rincés à l'eau du robinet et le nombre de nodules est déterminé.

- **Mesures pondérales :**

L'effet du norflurazon sur la nodulation a été également évalué sur la masse sèche des racines et des nodules. Pour cela les nodules sont séparés des racines ; ceux-ci sont pesés séparément puis mis à sécher dans une étuve pendant 48 h à 60°C.

- **Extraction, isolement et purification des souches bactériennes :**

Pour extraire, isoler et purifier les souches de Rhizobium, nous avons adopté les méthodes préconisées par le Programme Bio International (PBI) (Vincent, 1970).

II.4.8.1 Extraction des bactéries nodulantes les plantules de haricot:

L'extraction de la bactérie nodulante est réalisée dans des conditions d'asepsie et à partir des nodules des plantules de haricot.

Pour éviter d'éventuelles contaminations, la surface des nodules est stérilisée à l'hypochlorite de sodium (12°) pendant 3 mn, puis les traces de l'hypochlorite de sodium qui pourraient éventuellement compromettre la viabilité des bactéroïdes (forme sous laquelle se présentent les bactéries nodulantes dans le nodule) sont éliminées par rinçage des nodules dans 10 bains successifs d'eau distillée stérile.

Les nodules ainsi traités sont écrasés à l'aide d'une tige en verre dans 0,5 ml eau distillée stérile pour libérer les bactéroïdes.

II.4.8.2 Isolement et purification des bactéries nodulantes:

- Milieu de culture:

Pour l'isolement, la purification et la conservation des souches bactériennes nodulantes, nous avons utilisé le milieu YEMA de VINCENT (Yeast Extract Mannitol Agar) (Vincent, 1970) modifié, où le mannitol a été remplacé par le saccharose (YESA) Ce milieu de culture est très utilisé pour le dénombrement, l'isolement et la culture des bactéries appartenant au genre Rhizobium (tab II).

Tableau II. : Composition chimique du milieu de culture YEMA modifié (YESA)

Composant	Quantité utilisée
Phosphate dipotassique (K_2HPO_4)	0,5 g
Sulfate de Magnésium ($Mg SO_4$)	0,2 g
Chlorure de Sodium ($Na Cl$)	0,1 g
Extrait de levure	0,4 g
Saccharose	30 g
Agar-agar	15 g
Rouge Congo 0,2 %	9 ml
Eau distillée	1000 ml

Le milieu est ajusté à un pH 6,8 avec une solution basique (NaOH, 1N) ou acide (HCl, 1N) et stérilisé par autoclavage à 120°C, pendant 20 mn.

A partir du broyat obtenu, plusieurs boîtes de Petri contenant du milieu YESA sont préparées. Les broyats sont ensuiteensemencés sur gélose et après 3 à 5 jours d'incubation à 30°C les bactéries nodulantes sont repérées, isolées puis purifiées par repiquages successifs sur le même milieu de culture (YESA).

Une fois purifiées, les souches isolées sont conservées à 4°C en tubes à essai sur milieu YESA inclinés. Pour assurer une bonne viabilité des souches bactériennes nodulantes, celles-ci sont repiquées chaque mois.

II.4.8.3 Effet du Norflurazon sur les bactéries nodulantes :

Dans cette expérience nous avons voulu savoir si le norflurazon pouvait avoir une incidence sur la croissance des bactéries nodulant le haricot. Pour cela nous avons préparé des boîtes de Petri contenant le milieu YESA dans lesquelles nous avons creusé des puits d'un diamètre de 5 mm, remplis de norflurazon. Nous avons utilisé trois concentrations de norflurazon : 1 μM , 10 μM , 100 μM . Du fait de la thermosensibilité du norflurazon, nous avons filtré les solutions de norflurazon avec des membranes de 0,45 μm de diamètre de pore.

La bactérie nodulant le haricot estensemencée par stries concentrées autour de chacun des puits. Les boîtes de Petri sont enfin incubées à l'étuve à 30°C.

La lecture des boîtes de Petri est effectuée après 3, 5 et 7 jours d'incubation.

II.4.8.4 Utilisation du norflurazon comme source de carbone et/ou d'azote

Contrairement à l'expérience précédente et compte tenu de la composition du norflurazon (molécule organique contenant du carbone et de l'azote), nous avons testé la capacité des populations microbiennes rhizosphériques à dégrader le norflurazon et par conséquent à utiliser cette substance comme source de carbone et/ou d'azote. Pour cela, nous avons procédé de la même manière que précédemment en utilisant des boîtes de Petri contenant la gélose sans aucun élément nutritif. Un puits est creusé au centre de la gélose qui servira à recevoir 0.5 ml de la solution du norflurazon. Les concentrations de norflurazon testées sont : 1 μM , 10 μM , 100 μM et 1 mM. Nous avons ensuite ensemencé les bactéries par étalement dans chacune des boîtes de Petri. Celles-ci sont ensuite incubées à l'étuve à 30°C pendant 72 heures.

II.4.8.5 Effet du norflurazon sur la nodulation en cultures axéniques :

Cette expérience est nécessaire puisqu'elle constitue à la fois un test de confirmation de l'appartenance de la souche bactérienne au groupe de bactéries nodulantes (cas du témoin sans norflurazon), elle permet aussi d'analyser l'incidence du norflurazon sur le phénomène de nodulation.

Pour cela un certain nombre d'étapes sont nécessaires. Les unes sont relatives aux bactéries, les autres à la plante.

- **Préparation de l'inoculum**

- **Préculture.**

Les souches bactériennes purifiées sont mises en préculture, dans des tubes à essai contenant 7 ml du milieu YESB stérilisé (milieu de Vincent liquide) (tab II), et mises en agitation pendant 48 h à 30 °C.

- **Culture.**

Après 48 heures, le contenu des tubes est transvasé dans des Erlenmeyer stériles d'un volume de 500 ml, contenant 100 ml du milieu YESB stérile (tab III). Ces dispositifs sont ensuite portés à l'étuve à 30°C sous agitation (200 rpm) pour une durée de 48 h.

Tableau III : Composition chimique du milieu YESB (milieu de Vincent liquide)

Composant	Quantité utilisée
Phosphate dipotassique (K ₂ HPO ₄)	0,5 g
Sulfate de Magnésium (Mg SO ₄)	0,2g
Chlorure de Sodium (NaCl)	0,1g
Extrait de levure	0,4g
Saccharose	10g
Eau distillée	1000 ml

Le milieu est ajusté à un pH 6,8 avec une solution basique (NaOH, 1N) ou acide (HCl, 1N) et stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 120° C.

Les cultures sont ensuite centrifugées aseptiquement à 5000 trs/min pendant 20 mn. Le culot est récupéré puis lavé avec une solution de KCl 8,5 ‰. Cette opération est nécessaire afin d'éviter l'apport de nutriments dans l'inoculum.

Une deuxième centrifugation est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Le culot est enfin récupéré dans 10 ml de KCl 8,5 ‰ pour avoir une suspension dense en bactéries, condition nécessaire pour garantir une bonne nodulation.

- **Stérilisation superficielle des semences :**

Les graines de haricot utilisées sont stérilisées superficiellement par immersions successives dans les bains suivants :

- Ethanol à 95% durant 30 secondes.
- Solution de chlorure mercurique HgCl₂ (1 g/l) pendant 3 minutes.

Les semences ainsi traitées sont rincées 7 fois à l'eau distillée stérile. Elles sont ensuite mises à imbiber pendant 6 heures en conditions stériles dans des boîtes de Petri tapissées de papier absorbant stérile imbibé d'eau distillé stérile.

Les graines fortement turgescentes dont la radicule commence à poindre sont ensuite placées dans des dispositifs constitués de tubes (de 21 cm de long et 2 cm de diamètre) contenant un dispositif représenté par des billes en verre de différents diamètres (0,5 à 1 cm) sur une hauteur de 9 cm recouvert de 30 ml de milieu de KNOP stérile (fig 14) et (tab VI).

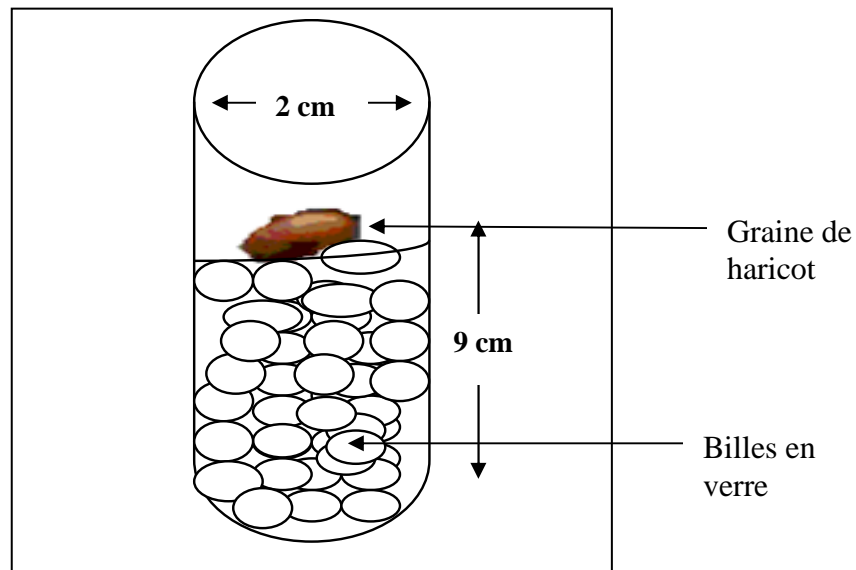


Figure 14 : Dispositif expérimental de la culture axénique

Ce dispositif est ainsi constitué pour maintenir la graine hors du milieu de KNOP, afin d'éviter un pourrissement. Les billes en verre servent aussi à améliorer la surface d'échange entre les racines de la plantule et le milieu environnant, permettant ainsi un meilleur développement racinaire et par conséquent un meilleur port pour la plantule.

Tableau IV : Composition chimique du milieu de KNOP

Composant		Quantité utilisée
Nitrates de Calcium	Ca (NO ₃) ₂ (4H ₂ O)	1 g
Nitrates de Potassium	KNO ₃	0,25 g
Phosphate Monopotassique	KPO ₄	0,25 g
Sulfate de Magnésium	Mg SO ₄	0,25 g
Sulfate ferrique	Fe SO ₄ (7H ₂ O)	0,001 g
Eau distillée		1000 ml

- **Mise en place de l'expérimentation :**

Etant thermosensible, la solution mère de norflurazon (1 mM) est filtrée à l'aide d'un Clinifilt CF 445 (de 0,45 µm de diamètre de pore) puis additionnée en conditions aseptiques, au milieu de culture KNOP préalablement stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 120°C. A partir de cette solution mère, trois dilutions sont préparées: 1 µM, 10 µM et 100 µM. Cinq lots sont ainsi constitués selon le tableau V.

Tableau V: Description des 5 lots de culture axénique (pour chacun des lots 7 répétitions ont été effectuées).

Lot	Milieu de culture KNOP stérile	Solution mère Norflurazon 1mM	Inoculum
T₁ (témoin non inoculé)	30 ml	0	0
T₂ (témoin inoculé)	30 ml	0	1 ml
1 µM	30 ml	30 µl	1 ml
10 µM	30 ml	300 µl	1 ml
100 µM	30 ml	3 ml	1 ml

Les dispositifs expérimentaux sont placés dans une chambre de culture (16 h jour /8 h nuit) à 28°C. Chaque jour, le volume de liquide de KNOP est ajusté aseptiquement sous la hotte.

Les observations quotidiennes ont porté sur la morphologie et la taille des racines et de la partie aérienne. A partir de la 3^{ème} semaine une attention particulière est accordée aux racines afin de relever un éventuel développement de nodosités.

Analyses statistiques :

Les résultats des différents essais ont été analysés statistiquement par le test de Student (test de comparaisons des moyennes)

Chapitre III

Résultats

et

Discussions

III.1 Croissance comparée des deux variétés de plantules de haricot :

Les mesures de quelques paramètres morphologiques à savoir : surface foliaire, longueur des parties aériennes, masse végétale sèche des racines, et des parties aériennes, rapport masse végétale sèche des racines / masse végétale sèche des parties aériennes et enfin le nombre de nodules pour les deux variétés de haricot montrent que chez la variété Coco de Prague ces paramètres sont légèrement plus élevées que ceux de la variété Terga (tab VI) ; cependant cette différence est non significative.

Tableau VI : Mesures de quelques paramètres de croissance chez les plantules de haricot : variétés Terga et Coco de Prague (plantules âgées de 21 jours). Chaque détermination est la moyenne de 3 mesures indépendantes.

Paramètre de croissance	Variété Terga	Variété Coco de Prague
Surface foliaire (cm ²)	53,33 ± 0,99	57,86 ± 0,80
Longueur des parties aériennes (cm)	20,87 ± 2,41	26,33 ± 4,04
Matière végétale sèche des racines (g)	0,13 ± 0,01	0,22 ± 0,02
Matière végétale sèche des parties aériennes (g)	0,5 ± 0,02	0,68 ± 0,03
Rapport matière végétale sèche des racines / matière végétale sèche des parties aériennes	0,26 ± 0,03	0,32 ± 0,05
Nombre de nodules	10,75 ± 2,63	16,33 ± 2,08

III.2 Effet du norflurazon sur la croissance des plantules de haricot :

III.2.1 Effet du norflurazon sur la morphologie des plantules de haricot :

Sous l'effet des doses 1µM et 10 µM, les plantules de haricot des deux variétés étudiées ne sont pas significativement différentes des plantules témoins du point de vue morphologique.

L'apport du norflurazon à la dose 100 µM affecte l'aspect morphologique des plantules qui sont beaucoup plus petites et qui présentent des feuilles partiellement dépigmentées (photobleaching partiel) (fig. 15).

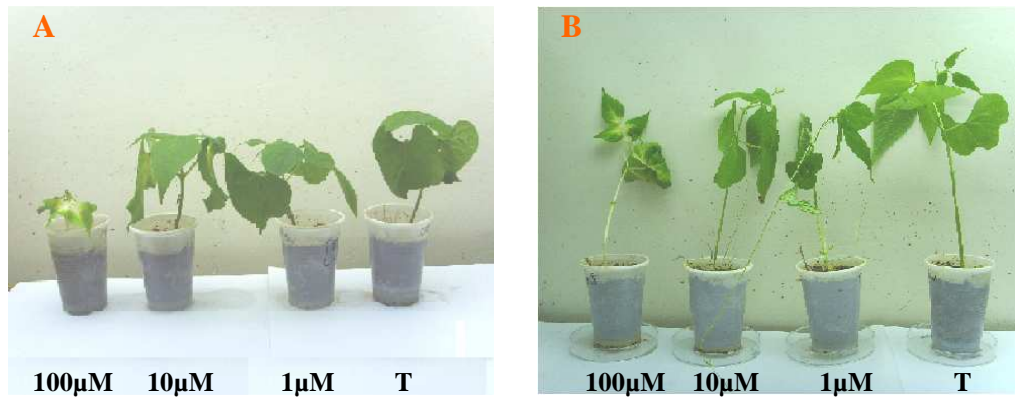


Figure 15 : Effet du norflurazon sur la morphologie des plantules de haricot âgées de 21 jours. **(A):** variété Terga, **(B) :** variété Coco de Prague.

III.2.2 Effet du norflurazon sur la cinétique de la croissance des plantules de haricot :

La croissance des plantules de haricot a été suivie par l'évolution de la longueur de la partie aérienne, elle a été effectuée sur une période de 21 jours stade correspondant au développement des deuxièmes feuilles.

Variété Terga :

En présence du norflurazon 1 μM , la croissance est lente pendant la première semaine, puis elle augmente légèrement tout en restant inférieure à celle des plantules témoins ; au bout de la troisième semaine (21 jours de croissance), la différence entre témoins et traitées est de 23,81 %. Sous l'effet de la dose 10 μM , l'écart de croissance entre témoins et traitées s'accroît à partir de la fin de la première semaine, la différence de croissance est de 57,14 % pendant toute la durée de croissance.

Sous l'effet de la forte dose 100 μM , il est noté un retard dans le démarrage de la croissance pendant la première semaine où la taille des plantules avoisine 0 cm puis celles-ci grandissent très lentement ne dépassant pas 6cm à la fin de la troisième semaine, soit une réduction de 74,3 % par rapport aux plantules témoins (fig. 16A)

Variété Coco de Prague :

La figure 16B montre que la croissance en longueur augmente progressivement en fonction du temps, elle passe de 12 ± 5 cm à la fin de la première semaine à $26,33 \pm 4,04$ cm à la fin de la troisième semaine.

Les plantules traitées au norflurazon à la dose 1 μM ne sont pas affectées dans leur croissance pendant la première semaine (les longueurs des parties aériennes des

plantules traitées à cette dose ne sont pas significativement différentes de celles des plantules témoins).

A partir de la deuxième semaine de croissance une légère réduction (16,6 %) est observée ; cette réduction atteint 27,2 % à la fin de la troisième semaine.

L'herbicide à des doses plus élevées 10 μM et 100 μM exerce un effet plus important sur la croissance, en effet, les courbes de croissance qui ont la même allure, présentent des chutes de croissance qui sont de l'ordre de 44 % et 63,33 % respectivement pour les doses 10 μM , 100 μM et ceci à la fin de la troisième semaine.

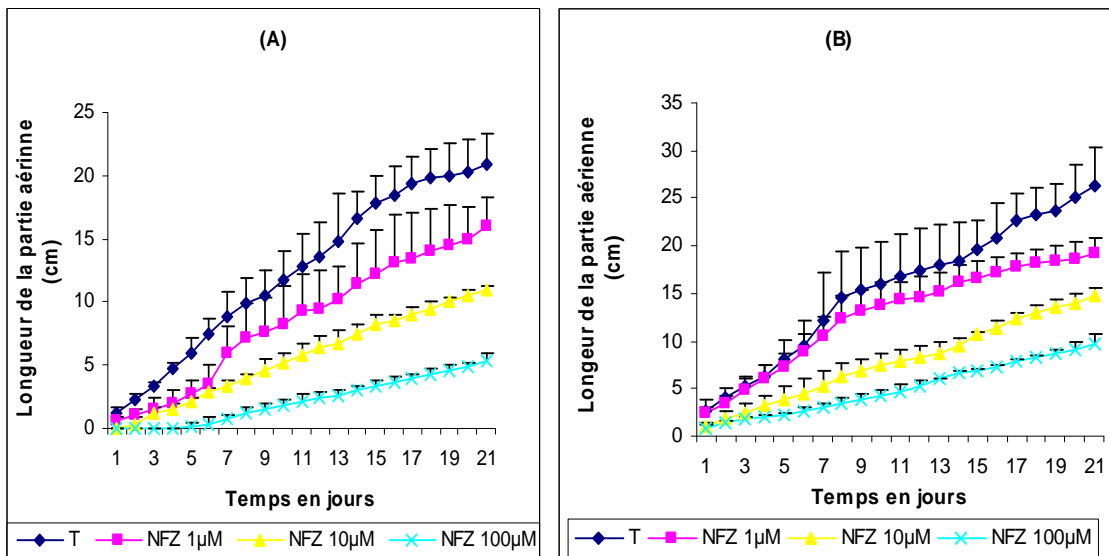


Figure 16 : Effet du norflurazon sur la cinétique de la croissance des plantules de haricot. (A): variété Terga, (B) : variété Coco de Prague.

III.2.3 Effet du norflurazon sur la surface foliaire des plantules de haricot :

Les surfaces foliaires des plantules traitées diminuent en fonction de la dose herbicide administrée, cette surface qui est de $53,33 \pm 0,99 \text{ cm}^2$ chez les plantules témoins de la variété Terga, diminue à $38,46 \pm 0,98 \text{ cm}^2$, $34,06 \pm 0,3 \text{ cm}^2$ et $11,86 \pm 0,9 \text{ cm}^2$ pour les doses respectives 1 μM , 10 μM et 100 μM de norflurazon ce qui correspond à 30 %, 36 % et 78 % de réduction (fig.17A).

Les plantules témoins de la variété Coco de Prague présentent une surface foliaire de $57,86 \pm 0,8 \text{ cm}^2$; sous l'effet des trois doses respectives 1 μM , 10 μM et 100 μM , les surfaces sont de $45,06 \pm 1,1 \text{ cm}^2$; $40,66 \pm 2,08 \text{ cm}^2$ et $15,2 \pm 1,31 \text{ cm}^2$ correspondant respectivement à 22 %, 29 % et 73 % de réduction (fig. 17B).

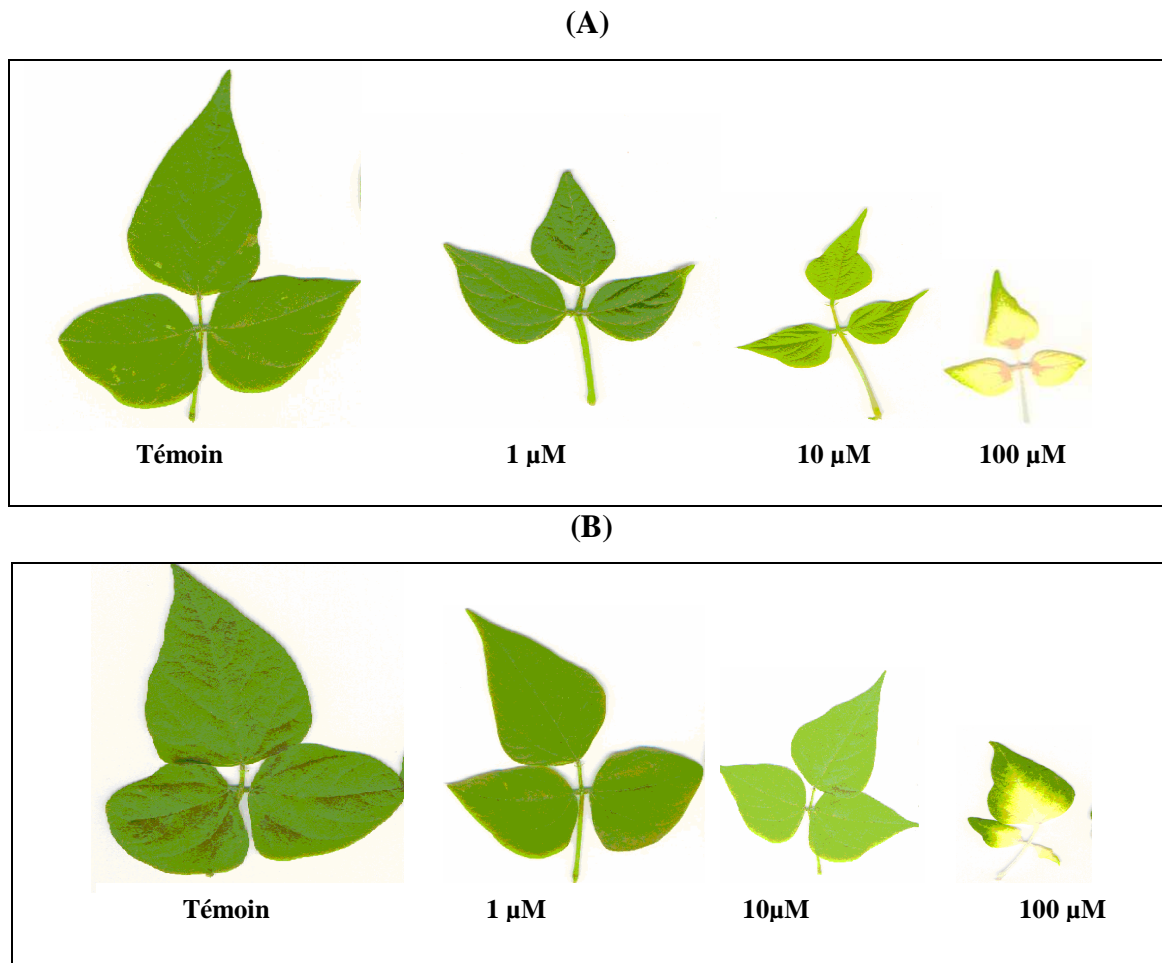


Figure 17 : Effet du norflurazon sur la surface foliaire des plantules de haricot âgées de 21 jours. (A): variété Terga, (B) : variété Coco de Prague.

III.2.4 Effet du norflurazon sur la masse sèche de la partie aérienne des plantules de haricot :

La masse sèche de la partie aérienne des plantules de la variété Terga est de $0,5 \pm 0,02$ g; celle-ci diminue suivant les doses respectives $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ et $100 \mu\text{M}$ pour atteindre $0,46 \pm 0,05$ g ; $0,31 \pm 0,03$ g et $0,15 \pm 0,02$ g soient des réductions de 8 %, 38 % et 70 % (fig. 18).

Les plantules témoins de la variété Coco de Prague présentent une masse sèche de la partie aérienne de $0,68 \pm 0,03$ g ; sous l'effet du norflurazon $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ et $100 \mu\text{M}$, cette masse sèche s'abaisse à $0,6 \pm 0,015$ g et $0,58 \pm 0,03$ g et $0,24 \pm 0,04$ g ce qui correspond aux réductions respectives de 11,76 %, 14,7 % et 64,7 % (tab VII).

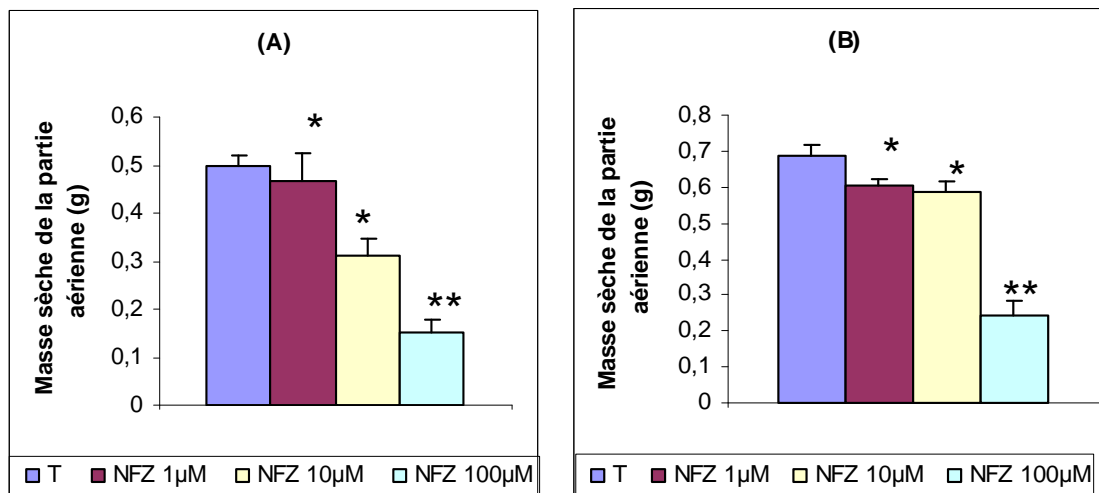


Figure 18 : Effet du norflurazon sur la masse sèche de la partie aérienne des plantules de haricot âgées de 21 jours. **(A)**: variété Terga, **(B)** : variété Coco de Prague. Les résultats sont analysés statistiquement par le test de student : A un taux de risque de 0,05 : (*) Peu significatif, (**) significatif.

Tableau VII : Pourcentages de réduction de la masse sèche de la partie aérienne des plantules de haricot traitées par les différentes concentrations de norflurazon. Chaque détermination est la moyenne de 3 mesures indépendantes.

Norflurazon	Pourcentage de réduction de masse sèche de la partie aérienne	
	Variété Terga	Variété Coco de Prague
1 μM	8 % *	11,76 % *
10 μM	38 % *	14,7 % *
100 μM	70 % **	64,7 % **

Nous constatons que pour la variété Terga les pourcentages de réduction de la masse sèche de la partie aérienne sont plus importants pour les doses 10 μM et 100 μM par rapport à ceux de la variété Coco de Prague.

III.2.5 Effet du norflurazon sur la croissance des racines des plantules de haricot :

La figure 19, montre la morphologie des racines des plantules de haricot témoins et celles des plantules traitées par les différentes concentrations de norflurazon.

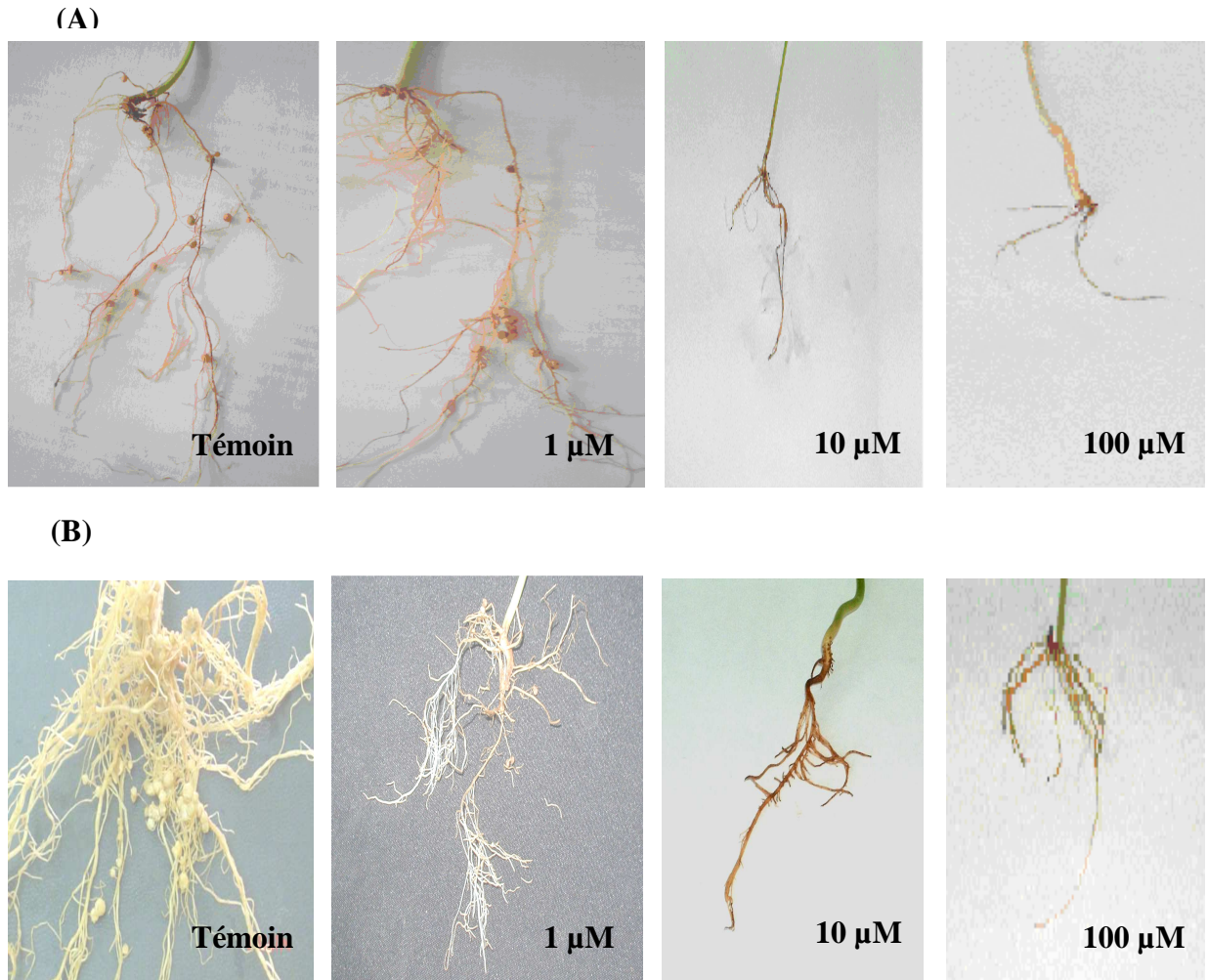


Figure 19 : Effet du norflurazon sur le système racinaire et la nodulation des plantules de haricot âgées de 21 jours. **(A)**: variété Terga, **(B)** : variété Coco de Prague

Pour les deux variétés étudiées, le norflurazon à la dose 1 μM n'affecte pas la ramification des racines : les plantules présentent un chevelu racinaire bien développé et bien ramifié. A cette faible dose 1 μM , des nombres moyens de nodules de $10 \pm 2,94$ et $11,66 \pm 1,52$ ont été relevés respectivement pour les variétés Terga et Coco de Prague (tab VIII). Ces nombres ne sont pas significativement différents par rapport à ceux des plantules témoins (test Student). Aux doses élevées de l'herbicide 10 μM et 100 μM , le système racinaire des plantules de haricot des deux variétés est plus affecté : la ramification est plus faible voire absente chez quelques plantules à ces deux concentrations d'herbicide, cette réduction de ramification des racines est accompagnée par une inhibition totale de la nodulation des plantules soumises à ces fortes doses du norflurazon vu qu'aucun nodule n'est observé. (fig. 19, Tab. VIII).

Tableau VIII : Effet du norflurazon sur la nodulation des plantules de haricot (estimée par le nombre moyen de nodules. Chaque détermination est la moyenne de 3 mesures indépendantes.

Variété	Dose du norflurazon	Nombre moyen de nodules/plantule
Terga	Témoin	10,75 ± 2,63
	1 µM	10 ± 2,94
	10/100 µM	0
Coco de Prague	Témoin	16,33 ± 2,08
	1 µM	11,66 ± 1,52
	10/100 µM	0

III.2.6 Effet du norflurazon sur la masse sèche des racines des plantules de haricot :

La masse sèche des racines de plantules témoins de la variété Terga est de $0,13 \pm 0,017$ g ; cette masse sèche s'abaisse graduellement pour atteindre $0,1 \pm 0,01$ g ; $0,02 \pm 0,002$ g et $0,013 \pm 0,005$ g pour les doses respectives 1 µM ,10 µM et 100 µM (fig. 20A) suivant des taux de réductions : 23 %, 84,61 %, 90 %.

Chez les plantules témoins de la variété Coco de Prague, une masse sèche racinaire de $0,22 \pm 0,02$ g a été enregistrée, puis celle-ci se réduit progressivement jusqu'à : $0,17 \pm 0,01$ g, $0,03 \pm 0,001$ g et $0,016 \pm 0,01$ g (fig. 20B), soient des réductions de 31 %, 86 % et 92 % respectivement pour les doses 1 µM ,10 µM et 100 µM (tab IX).

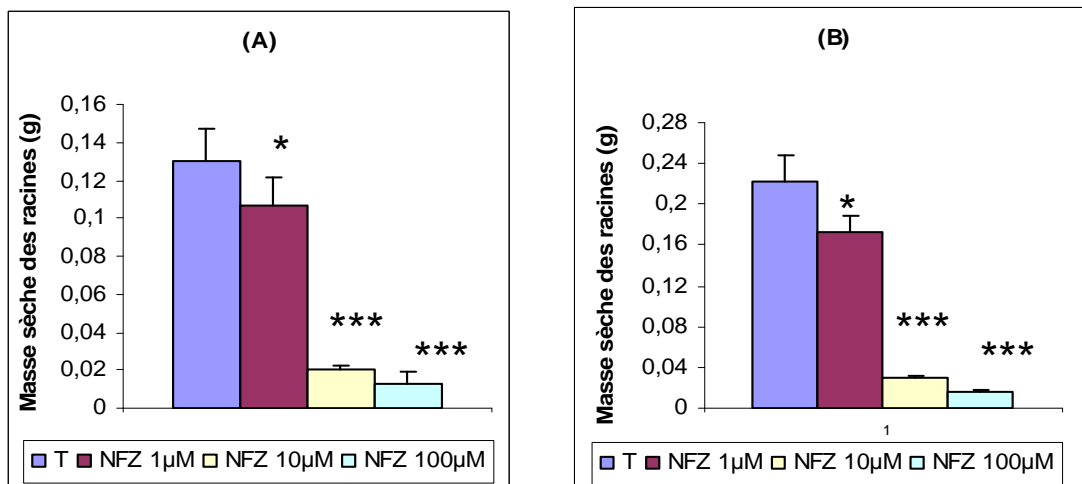


Figure 20 : Effet du norflurazon sur la masse sèche des racines des plantules de haricot âgées de 21 jours. (A): variété Terga, (B) : variété Coco de Prague. A un taux de risque de 0,05 : (*) peu significatif, (***) hautement significatif

Tableau IX: Pourcentages de réduction de la masse sèche des racines des plantules de haricot traitées par les différentes concentrations de norflurazon. Chaque détermination est la moyenne de 3 mesures indépendantes.

Norflurazon	Pourcentage de réduction de la masse sèche des racines	
	Variété Terga	Variété Coco de Prague
1 μ M	23 % *	31 % *
10 μ M	84,61 % ***	86 % ***
100 μ M	90 % ***	92 % ***

Cette diminution de la masse sèche des racines serait associée à une inhibition de la mise en place des nodules estimée par le nombre de ces organes. Ceci serait lié à une diminution des sites potentiels d'infection résultant probablement d'une inhibition de l'émergence et de l'élongation des poils absorbants et de la croissance du système racinaire en général.

III.2.7 Effet du norflurazon sur le rapport masse sèche des racines / masse sèche des parties aériennes des plantules de haricot :

La modification de la répartition de la masse sèche entre les parties racinaires et les parties aériennes induites par l'herbicide a été estimée par les variations du rapport de masse sèche des racines sur la masse sèche des parties aériennes.

Chez les plantules témoins de la variété Terga, le rapport masse sèche des racines/masse sèche des parties aériennes est de 0,26; ce rapport diminue légèrement à la dose 1 μ M, il est de 0,23 et il se réduit fortement pour atteindre 0,06 et 0,09 respectivement pour les doses 10 μ M et 100 μ M (fig. 21A); soient des réductions de 11,53 %, 76,92 % et 65,38 % pour les trois doses utilisées.

La même observation est faite pour la variété Coco de Prague, ce rapport varie très peu au niveau des plantules traitées à la dose 1 μ M, il passe de 0,32 chez les plantules témoins à 0,28 à cette dose d'herbicide. Pour les plantules soumises aux doses 10 μ M et 100 μ M, le rapport marque une forte chute atteignant des valeurs de 0,05 et 0,06 correspondant aux réductions de 12,5 %, 84,37 % et 81,25 % (fig. 21B)

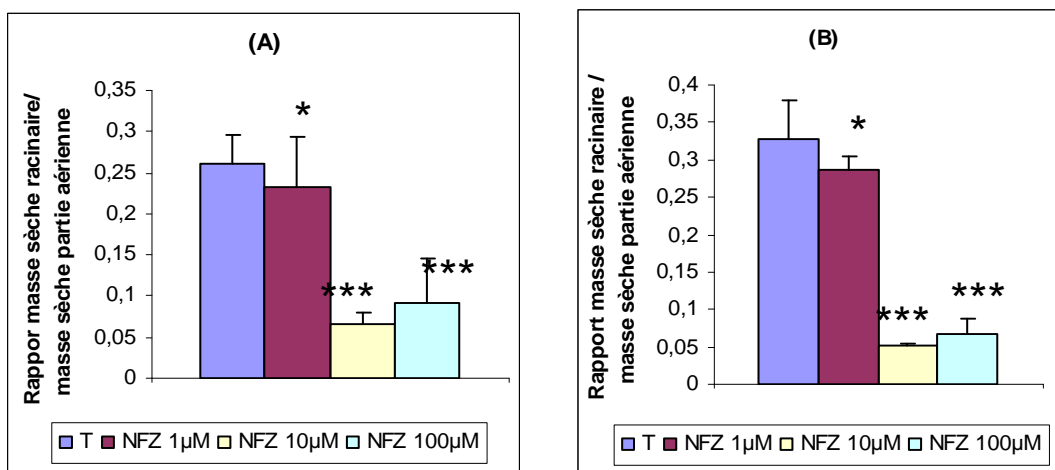


Figure 21 : Effet du norflurazon sur le rapport masse sèche racinaire /masse sèche des parties aériennes des plantules de haricot âgées de 21 jours. **(A):** variété Terga, **(B) :** variété Coco de Prague. A un taux de risque de 0,05 : (*) peu significatif, (**) significatif, (***) hautement significatif.

Les résultats obtenus ont montré que pour les deux variétés testées, ce rapport diminue fortement aux doses 10 μ M, 100 μ M en norflurazon.

Les taux de réduction sous l'effet de l'herbicide de la masse sèche racinaire sont plus importants que ceux de la masse sèche des parties aériennes (Tab. IX) ce qui est confirmé par la forte réduction du rapport masse sèche des racines / masse sèche des parties aériennes.

Ceci suggère une plus forte sensibilité des racines liée à une réduction par l'herbicide du transport des photoassimilats vers les racines.

III.3 Effet du norflurazon sur le métabolisme des plantules de haricot :

Les extractions et les dosages des différents paramètres ont été effectués au stade deuxième feuille (après 21 jours de mise en culture).

Certains paramètres métaboliques utilisés dans cette étude sont associés au mécanisme de la photosynthèse : les caroténoïdes, les chlorophylles totales, les sucres solubles et l'amidon (tab.X), d'autres sont le reflet des dommages causés par le norflurazon à savoir : les peroxydes de lipides et le malondialdéhyde .

Tableau X : Mesures de quelques paramètres métaboliques de la photosynthèse dans les feuilles des plantules de haricot (variétés Terga et Coco de Prague). Chaque détermination est la moyenne de 3 mesures indépendantes.

Paramètre métabolique	Variété Terga	Variété Coco de Prague
Caroténoïdes ($\mu\text{g/g}$ MVF)	$149,48 \pm 5,72$	$156,95 \pm 12,56$
Chlorophylles totales (a+b) (mg/g MVF)	$1,46 \pm 0,06$	$1,51 \pm 0,03$
Sucres solubles (mg/g MVF)	$1,26 \pm 0,1$	$1,45 \pm 0,07$
Amidon (mg/g MVF)	$1,13 \pm 0,09$	$1,29 \pm 0,06$

L'ensemble des mesures effectuées n'a révélé aucune différence significative entre les deux variétés en question.

III.3.1 Effet du norflurazon sur la teneur en pigments photosynthétiques :

Les teneurs en pigments photosynthétiques diminuent proportionnellement avec les doses herbicides appliquées.

Les caroténoïdes :

Comparée à celle des plantules témoins de la variété Terga, la teneur en caroténoïdes des plantules traitées diminue pour toutes les doses utilisées (fig. 22A), elle passe de $149,48 \pm 5,72 \mu\text{g/g}$ MVF chez les plantules témoins à $121,43 \pm 6,65 \mu\text{g/g}$ MVF ; $45,57 \pm 7,31 \mu\text{g/g}$ MVF et $8,15 \pm 0,71 \mu\text{g/g}$ MVF respectivement pour les doses $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ et $100 \mu\text{M}$, soient des réductions de 18,76 % ; 69,51 % ; 94,5 %.

Chez les plantules de la variété Coco de Prague, la teneur en caroténoïdes est de $156,95 \pm 12,56 \mu\text{g/g}$ au niveau des feuilles témoins, cette teneur diminue à $147,90 \pm 2,3 \mu\text{g/g}$ MVF ; $46,30 \pm 5,73 \mu\text{g/g}$ MVF et $11 \pm 1,87 \mu\text{g/g}$ pour les doses respectives $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ et $100 \mu\text{M}$ (fig. 22B), correspondant aux réductions de 5,7 % ; 70,5% ; 93 % (tab XI).

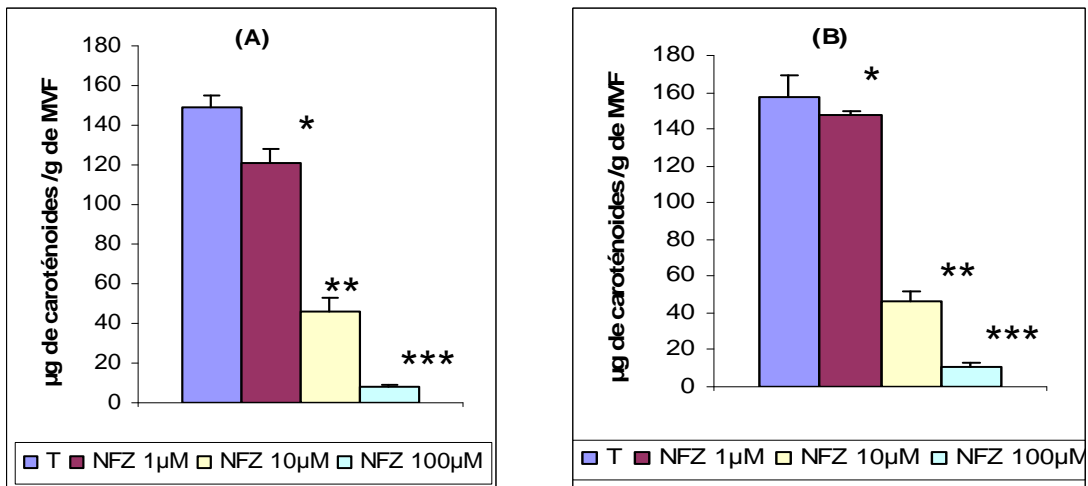


Figure 22 : Effet du norflurazon sur la teneur en caroténoïdes dans les feuilles de plantules de haricot âgées de 21 jours. **T** : Témoin ; **NFZ** : Norflurazon ; **(A)** : variété Terga ; **(B)** : variété Coco de Prague. A un taux de risque de 0,05 , (**) significatif, (***) hautement significatif. : (*) peu significatif.

Tableau XI : Pourcentages de réduction de la teneur en caroténoïdes dans les feuilles des plantules de haricot traitées par les différentes concentrations de norflurazon. Chaque détermination est la moyenne de 3 mesures indépendantes.

Norflurazon	Pourcentage de réduction de la teneur en caroténoïdes	
	Variété Terga	Variété Coco de Prague
1 µM	18,76 % *	5,7 % *
10 µM	69,51 % **	70,5 % **
100 µM	94,5 % ***	93 % ***

Les chlorophylles totales (a+b) :

Dans les feuilles des plantules témoins de la variété Terga, la quantité de chlorophylles totales est de $1,46 \pm 0,06$ mg/g MVF, sous l’effet du norflurazon 1 µM ,10 µM et 100 µM, celle-ci passe à $1,22 \pm 0,03$ mg/g MVF ; $0,91 \pm 0,03$ mg /g MVF et $0,39 \pm 0,03$ mg /g MVF (fig. 23A) soient les baisses respectives de 16,43 % ; 37,67 % et 73,97 %.

La teneur en chlorophylles totales dans les feuilles témoins de la variété Coco de Prague est de $1,51 \pm 0,03$ mg/g MV, celle des feuilles traitées aux doses respectives 1 µM, 10 µM et 100 µM est : $1,26 \pm 0,04$ mg/g MVF ; $0,93 \pm 0,01$ mg/g MVF ; $0,49 \pm 0,03$ mg/g MVF (fig. 23B) ce qui correspond aux réductions de 16,66 % ; 38,66 % ; 67 ,06 % (Tab XII).

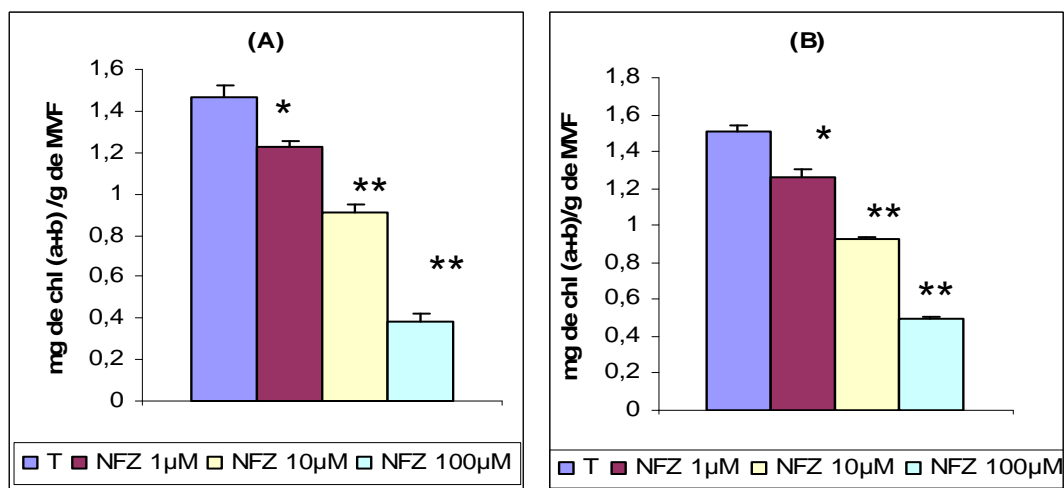


Figure 23 : Effet du norflurazon sur la teneur en chlorophylles totales dans les feuilles de plantules de haricot âgées de 21 jours. **T** : Témoin ; **NFZ** : Norflurazon ; **(A)** : variété Terga ; **(B)** : variété Coco de Prague. À un taux de risque de 0,05 : (*) peu significatif, (**) significatif.

Tableau XII : Pourcentages de réduction de la teneur en chlorophylles totales dans les feuilles des plantules de haricot traitées par les différentes concentrations de norflurazon. Chaque détermination est la moyenne de 3 mesures indépendantes.

Norflurazon	Pourcentage de réduction de la teneur en chlorophylles totales	
	Variété Terga	Variété Coco de Prague
1 μM	16,43 % *	16,66 % *
10 μM	37,67 % **	38,66 % **
100 μM	73,97 % **	67,06 % **

La diminution des caroténoïdes résulte de l'inhibition par le norflurazon de la phytoène désaturase. (Sandmann et Albrecht ,1990 ; Bramley , 1994).

La diminution de la teneur en chlorophylles est due non seulement à leur photooxydation par les molécules actives d'oxygène (ROS) engendrée par le manque de caroténoïdes (Jung et al. 2000) mais aussi à une déficience dans leur biosynthèse ; Olmuller et al. (1986) ont montré que la dernière étape de biosynthèse des chlorophylles n'a pas lieu suite à la destruction par le norflurazon des structures chloroplastiques.

III.3.2 Effet du norflurazon sur la teneur en sucres solubles des plantules de haricot

Nous avons évalué l'impact du norflurazon sur l'activité photosynthétique à travers le dosage des sucres solubles et de l'amidon.

Chez la variété Terga, la teneur en sucres solubles dans les feuilles des plantules témoins est de $1,26 \pm 0,1$ mg/g MVF, cette teneur diminue respectivement chez les plantules traitées par les doses $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ et $100 \mu\text{M}$ pour atteindre $1,13 \pm 0,06$ mg/g MVF ; $1,01 \pm 0,08$ mg/g MVF et $0,59 \pm 0,05$ mg/g MVF (fig. 24A) correspondant aux pourcentages de diminution : 10 % ; 19 % et 53 %.

La teneur en sucres solubles dans les feuilles des plantules témoins de la variété Coco de Prague est de $1,45 \pm 0,07$ mg/g MVF, celle-ci passe à $1,34 \pm 0,04$ mg/g MVF ; $1,04 \pm 0,1$ mg/g MVF et $0,6 \pm 0,05$ mg/g MVF (fig. 24B) correspondant à des taux de réductions de 7 %, 28 % et 58 % respectivement pour les doses $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ de norflurazon (tab XIII).

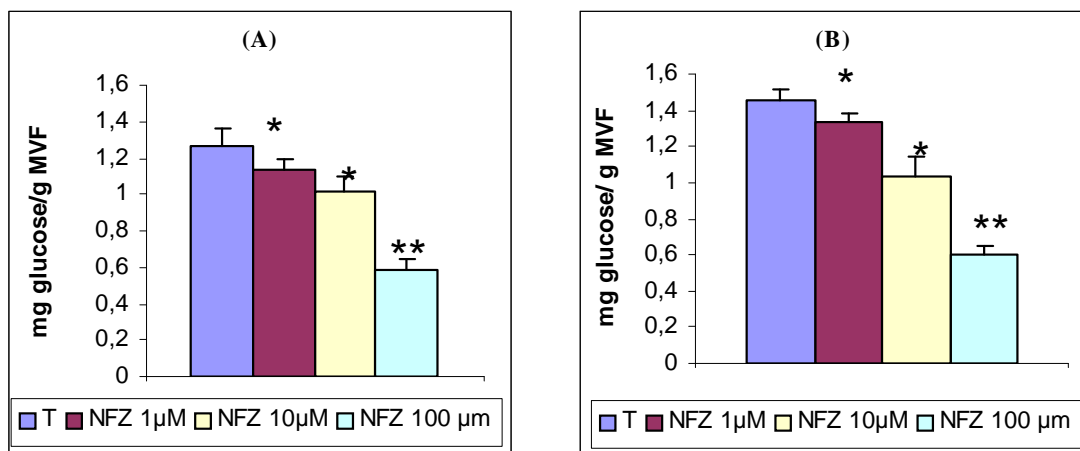


Figure 24: Effet du norflurazon sur la teneur en sucres solubles dans les feuilles de plantules de haricot âgées de 21 jours. **T** : Témoin ; **NFZ** : Norflurazon ; **(A)** : variété Terga ; **(B)** : variété Coco de Prague. A un taux de risque de 0,05 : (*) peu significatif, (**) significatif.

Tableau XIII : Pourcentages de réduction de la teneur en sucres solubles dans les feuilles des plantules de haricot traitées par les différentes concentrations de norflurazon. Chaque détermination est la moyenne de 3 mesures indépendantes.

Norflurazon	Pourcentage de réduction de la teneur en sucres solubles	
	Variété Terga	Variété Coco de Prague
1 μ M	10,31 % *	7,58% *
10 μ M	19,84 % *	28,27% *
100 μ M	53,17% **	58,62 % **

III.3.3 Effet du norflurazon sur la teneur en amidon des plantules de haricot :

Lorsque le transporteur des trioses phosphate/ phosphate situé sur la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste ne fonctionne pas suite à une réduction du métabolisme cellulaire, les trioses phosphates formés par le cycle de Calvin s'accumulent dans le stroma formant ainsi de l'amidon transitoire.

Les résultats du dosage de l'amidon ont révélé une teneur moyenne en amidon de $1,13 \pm 0,09$ mg/g MVF chez les plantules témoins de la variété Terga, cette teneur s'est abaissée à $1,02 \pm 0,05$ mg/g MVF; $0,9 \pm 0,08$ mg/g MVF et $0,52 \pm 0,04$ mg/g MVF aux doses respectives du norflurazon 1 μ M ,10 μ M et 100 μ M, soient les taux de réduction de : 9 % ; 20 % et 53 % (fig. 25A).

Chez les plantules témoins de la variété Coco de Prague, une teneur moyenne en amidon de $1,3 \pm 0,06$ mg/g MVF est enregistrée, cette quantité diminue progressivement pour atteindre: $1,2 \pm 0,03$ mg/g MVF ; $0,93 \pm 0,09$ mg/g MVF et $0,53 \pm 0,047$ mg /g MVF (fig. 25B) correspondant aux réductions de 7% ; 30% et 61% respectivement pour les trois doses 1 μ M ,10 μ M, 100 μ M (tab XIV).

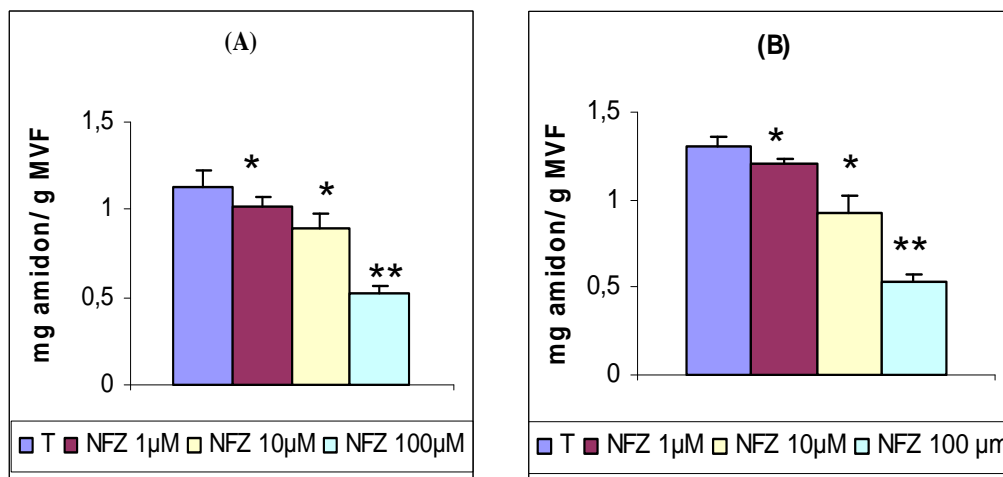


Figure 25 : Effet du norflurazon sur la teneur en amidon dans les feuilles des plantules de haricot âgées de 21 jours : Témoin ; **NFZ** : Norflurazon ; **(A)** : variété Terga ; **(B)** : variété Coco de Prague. A un taux de risque de 0,05 : (*) peu significatif, (**) significatif.

Tableau XIV: Pourcentages de réduction de la teneur en amidon dans les feuilles des plantules de haricot traitées par les différentes concentrations de norflurazon. Chaque détermination est la moyenne de 3 mesures indépendantes.

Norflurazon	Pourcentage de réduction de la teneur en amidon	
	Variété Terga	Variété Coco de Prague
1 μM	10,61% *	7% *
10 μM	17,69% *	27,9% *
100 μM	53,09% **	58,91% **

Pour les deux variétés testées, la dose 100 μM exerce un effet marqué sur les teneurs en glucides. La réduction des sucres solubles et d'amidon dans les feuilles traitées indique que le norflurazon affecte la photosynthèse des plantules de haricot, ce qui explique en partie la diminution de croissance des parties aériennes et racinaires (estimée par la masse sèche).

III.4 Dommages dus au stress oxydatif induit par le norflurazon :

Le norflurazon en réduisant la teneur en caroténoïdes engendre un stress oxydatif important (Jung et *al.*, 2000) pouvant endommager les composants cellulaires à savoir : lipides, protéines, acides nucléiques (Foyer, 1993) et glucides (Moeller et Jensen , 2007)

Il nous a paru intéressant de mesurer l'impact du stress oxydatif induit par l'herbicide sur l'un des composants organiques en l'occurrence les lipides, et ceci par des dosages de produits de peroxydation lipidique (peroxydes d'acides gras et malondialdéhyde).

III.4.1 Effet du norflurazon sur la teneur en peroxydes d'acides gras dans les feuilles des plantules de haricot :

Les acides gras polyinsaturés sont particulièrement sensibles aux peroxydations. Les doubles liaisons sont des points réactifs dans la chaîne moléculaire et constituent la cible privilégiée de l'attaque par les molécules actives d'oxygène. Les hydroperoxydes sont les premiers produits formés au cours des réactions d'oxydation des acides gras des lipides membranaires.

Les résultats du dosage de ces produits ont montré que l'apport des différentes doses de norflurazon augmente la formation des peroxydes d'acides gras, en effet les plantules témoins de la variété Terga présentent une teneur moyenne en peroxydes de 0,38 nmole/mg MVF, cette teneur s'élève progressivement avec les doses croissantes du norflurazon pour atteindre les teneurs de : 0,8 nmole/mg MVF ; 2,6 nmoles/mg MVF et 3,5 nmoles/mg MVF pour les doses respectives 1 μ M, 10 μ M et 100 μ M (fig. 26A) .

Chez les plantules témoins de la variété Coco de Prague, la teneur moyenne en peroxydes d'acides gras est de 0,34 nmole/mg MVF, cette teneur augmente à : 2,73 nmole/mg MVF ; 3,6 nmole/mgMVF et 4,35nmole/mgMVF aux mêmes doses respectives de norflurazon (fig. 26B).

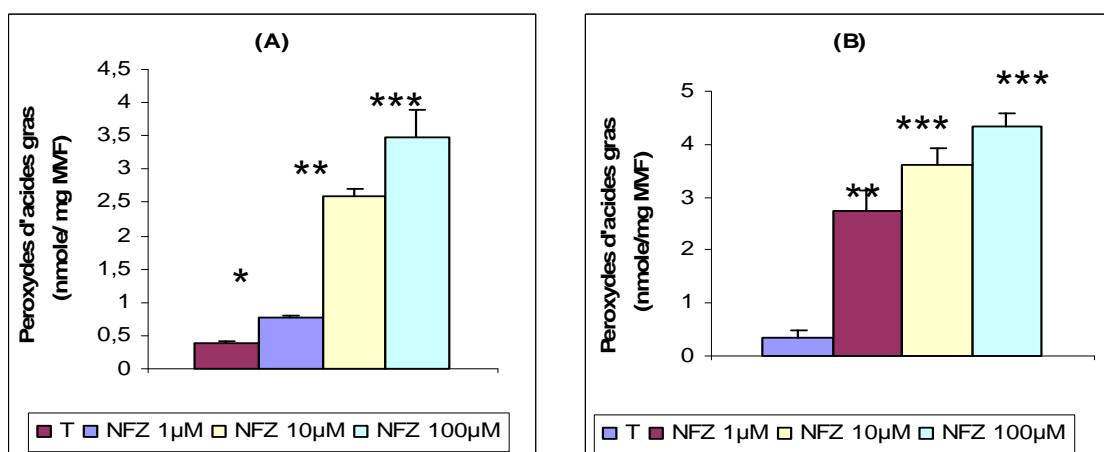


Figure 26 : Effet du norflurazon sur la teneur en peroxydes d'acides gras de plantules de haricot âgées de 21 jours. **T** : Témoin ; **NFZ** : Norflurazon ; **(A)** : variété Terga ; **(B)** : variété Coco de Prague. A un taux de risque de 0,05 : (*) peu significatif, (**) significatif, (***) hautement significatif.

Le tableau XV montre les pourcentages d'augmentation de la teneur en peroxydes d'acides gras chez les deux variétés de haricot sous l'effet des différentes concentrations de norflurazon. Nous constatons que ces pourcentages d'augmentation sont plus élevés pour la variété Coco de Prague.

Tableau XV: Pourcentages d'augmentation de la teneur en peroxydes d'acides gras dans les feuilles des plantules de haricot traitées par les différentes concentrations de norflurazon. Chaque détermination est la moyenne de 3 mesures indépendantes.

Norflurazon	Pourcentages d'augmentation de la teneur en peroxydes d'acides gras	
	Variété Terga	Variété Coco de Prague
1 μ M	50,6 % *	87,5 % **
10 μ M	85,38 % **	90% ***
100 μ M	89 % ***	92 % ***

III.4.2 Effet du norflurazon sur la teneur en substances réactives à l'acide thiobarbiturique dont le malondialdéhyde :

La quantification des produits primaires de l'oxydation des lipides consiste à mesurer leur concentration à un instant donné, de ce fait elle ne permet pas de déterminer exactement le niveau d'oxydation des lipides car ces produits intermédiaires sont rapidement décomposés en produits secondaires (Eymard et Genot, 2003).

Quantifier les produits secondaires de l'oxydation des lipides, composés plus stables : substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr- TBA) dont le malondialdéhyde, est donc nécessaire, pour une estimation plus fiable du degré de la peroxydation lipidique

Le dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr- TBA) dont le malondialdéhyde montre qu'au niveau des plantules témoins de la variété Terga la teneur moyenne en malondialdéhyde est de $15 \pm 2,16$ nmoles/mg MVF, cette teneur s'élève à $36,6 \pm 1,7$ nmoles/mg MVF, $47,4 \pm 4,35$ nmoles/mg MVF et $72,16 \pm 4,27$ nmoles/mg MVF (fig. 27 A), ce qui correspond à une élévation de 59 % et 68 % ; 79 % aux trois doses respectives du norflurazon 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M (tab. XVI).

Pour les plantules témoins de la variété Coco de Prague ; une teneur moyenne de $23,5 \pm 2,11$ nmoles/mg MVF en malondialdéhyde a été relevée, cette teneur s'accroît avec

l'augmentation des doses de l'herbicide atteignant $40 \pm 2,26$ nmole/mg MVF, $52 \pm 5,18$ nmole/mg MVF et $73 \pm 7,33$ nmole/mg MVF (fig. 27 B), soient les pourcentages d'augmentation de 42 %, 54%, 67% pour les trois doses respectives du norflurazon (tab XVI).

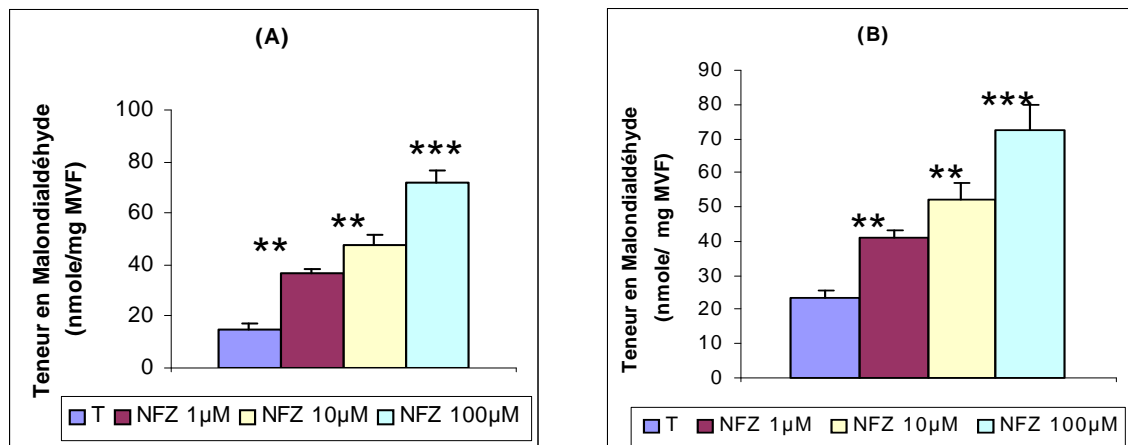


Figure 27: Effet du norflurazon sur la teneur en malondialdéhyde dans les feuilles des plantules de haricot âgées de 21 jours .T : Témoin ; NFZ : Norflurazon ; (A) : variété Terga ; (B) : variété Coco de Prague. A un taux de risque de 0,05 : (**) significatif, (***) hautement significatif.

Tableau XVI : Pourcentages d'augmentation sous l'effet du norflurazon de la teneur en malondialdéhyde dans les feuilles des plantules de haricot traitées par les différentes concentrations de norflurazon. Chaque détermination est la moyenne de 3 mesures indépendantes.

Norflurazon	Pourcentages d'augmentation de la teneur en malondialdéhyde	
	Variété Terga	Variété Coco de Prague
1 µM	59 % **	42 % **
10 µM	68 % **	54 % **
100 µM	79 % ***	67 % ***

L'élévation des peroxydes de lipides et de leurs dérivés dont le MDA, traduit une altération des membranes vu que ces produits sont en relation étroite avec la dégradation des systèmes membranaires de la cellule et d'une manière générale avec le stress oxydatif subi par la plante.

L'ensemble des résultats montrent que le norflurazon à la forte dose affecte la morphologie et la physiologie des deux variétés de plantules de haricot (tous les paramètres mesurés sont affectés), il entraîne également une détérioration des lipides

membranaires suite au stress oxydatif induit, entraînant ainsi une perturbation du transport à travers les différentes parties du végétal, les différents organes et compartiments cellulaires ainsi que les activités enzymatiques des protéines membranaires.

III.5 Effet du norflurazon sur l'environnement rhizosphérique des plantules de haricot :

III.5.1 Effet sur la nodulation :

Le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L) établit des relations symbiotiques avec les bactéries du sol appartenant au genre *Rhizobium*. Les rhizobia induisent sur les racines des plantules de haricot la formation de véritables organes appelés : « nodules », à l'intérieur desquels ils fixent l'azote atmosphérique.

III.5.2 Le nombre de nodules :

Le nombre moyen de nodules est plus important ($16,33 \pm 2,08$) chez les plantules témoins de la variété Coco de Prague par rapport à celui des plantules témoins de la variété Terga ($10,75 \pm 2,63$). Mais cette différence n'est pas significative.

En présence de la dose $1 \mu\text{M}$ de norflurazon, le nombre de nodules diminue à $11,66 \pm 1,52$ et $10 \pm 2,94$ respectivement pour les variétés Coco de Prague et Terga. Pour les doses $10 \mu\text{M}$ et $100 \mu\text{M}$, aucun nodule n'apparaît sur les racines des plantules des deux variétés de haricot (fig. 28).

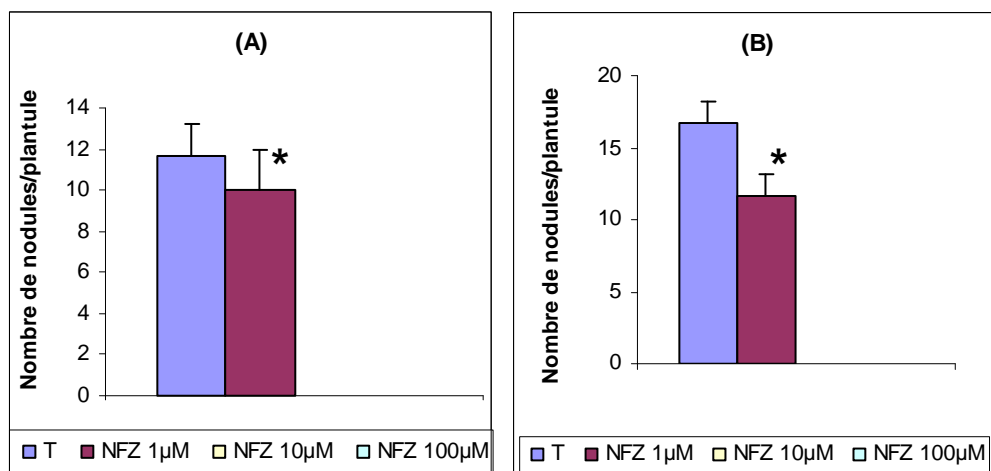


Figure 28 : Effet du norflurazon sur la nodulation des plantules de haricot âgées de 21 jours : Témoin ; **NFZ** : Norflurazon ; **(A)** : variété Terga, **(B)** : variété Coco de Prague .À un taux de risque de 0,05 : (*) peu significatif.

III.5.3 La masse fraîche des nodules :

La masse fraîche nodulaire des plantules témoins de la variété Terga est de $29,66 \pm 4,51$ mg, et $19,33 \pm 5,50$ mg à la dose $1 \mu\text{M}$ du norflurazon (fig. 29 A).

Les nodules témoins de la variété Coco de Prague ont une masse fraîche moyenne de $30,33 \pm 2,51$ mg, celle ci diminue à $24,66 \pm 3,05$ mg par la dose $1 \mu\text{M}$ de norflurazon, cependant cette différence est peu significative pour les deux variétés (fig. 29 B).

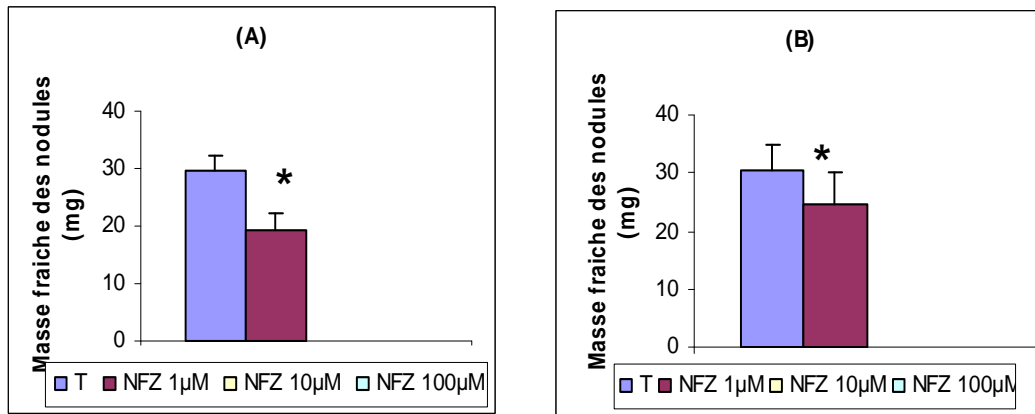


Figure 29 : Effet du norflurazon sur la masse fraîche des nodules des plantules de haricot âgées de 21 jours. **T** : Témoin ; **NFZ** : Norflurazon. **(A)** : variété Terga, **(B)** : variété Coco de Prague. À un taux de risque de 0,05 : (*) peu significatif.

III.5.4 La masse sèche des nodules :

Chez la variété Terga, la masse sèche des nodules des plantules traitées par la dose $1 \mu\text{M}$ ($1,8 \pm 0,2$ mg) ne diffère pas de celle des nodules de plantules témoins ($1,83 \pm 0,28$ mg) (fig. 30A). Il en est de même pour la masse sèche des nodules des plantules témoins de la variété Coco de Prague qui est de ($2,66 \pm 0,57$ mg), celle des plantules traitées par la dose $1 \mu\text{M}$ est de $2,33 \pm 0,57$ mg (fig. 30B).

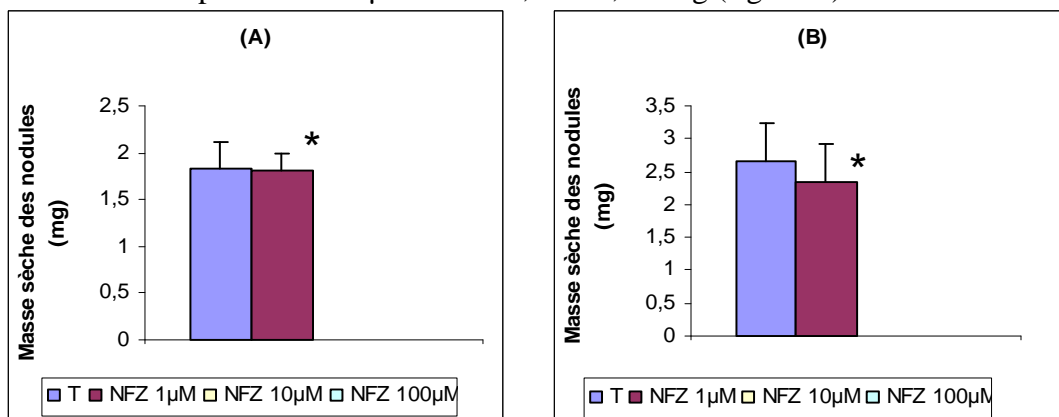


Figure 30 : Effet du norflurazon sur la masse sèche des nodules des plantules de haricot âgées de 21 jours. **T** : Témoin ; **NFZ** : Norflurazon ; **(A)** : variété Terga ; **(B)** : variété Coco de Prague . A un taux de risque de 0,05 (*) : Pas significatif.

III.5.5 Mise en culture des souches bactériennes :

Les souches rhizobiennes purifiées sur milieu YEM gélifié sont reconnaissables par leur aspect gommeux, translucide et par leur non absorption du rouge Congo, elles forment des colonies isolées de taille plus ou moins arrondie, en revanche les autres souches non purifiées forment des colonies très rapprochées ayant un aspect de développement continu sur le milieu de culture (fig. 31).

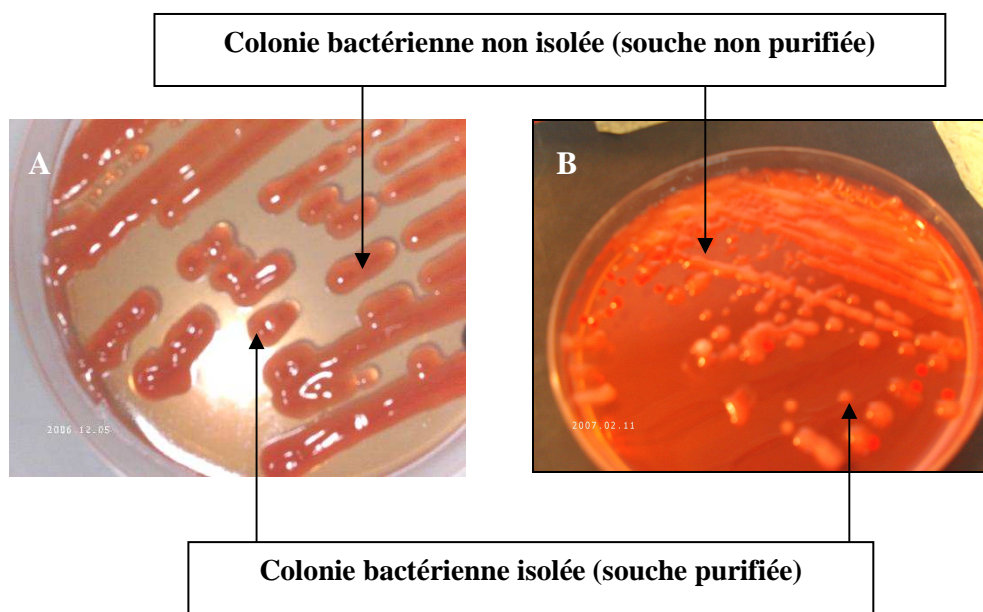


Figure 31: Culture de souches rhizobiennes sur milieu YMA modifié.

(A) : les souches de Rhizobia nodulant la variété Terga

(B) : les souches de Rhizobia nodulant la variété Coco de Prague

III.5.6 Utilisation du norflurazon par les Rhizobia :

Lorsque l'herbicide est appliqué en boîte de Petri comme source unique de carbone et d'azote à un inoculum de rhizobium extrait à partir des nodules racinaires des plantules de haricot, il est observé une prolifération des souches bactériennes, et ceci quelle que soit la dose d'herbicide administrée. (fig. 32)

Il semblerait que l'herbicide soit métabolisé par les Rhizobia, et qu'il serait utilisé comme source de carbone et d'azote.

L'effet direct du norflurazon sur les souches rhizobiennes nodulant les plantules de haricot est donc à écarter, puisque aucun effet négatif vis-à-vis des rhizobia n'a été mis en évidence.

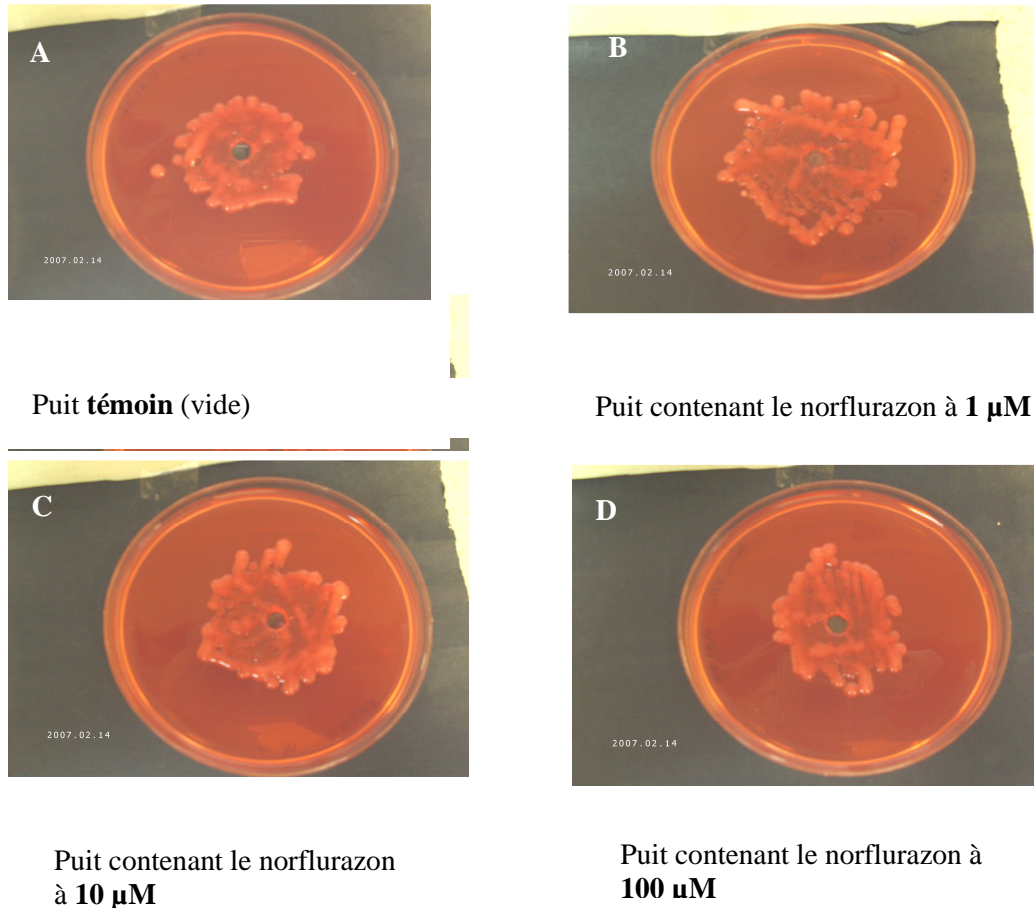


Figure 32: Photographies montrant la prolifération des colonies bactériennes cultivées en présence des solutions du norflurazon.

(A) : Puit vide (dépourvu de norflurazon).

(B) : Puit contenant le norflurazon **1µM**.

(C) : Puit contenant le norflurazon **10 µM**.

(D) : Puit contenant le norflurazon **100 µM**.

III.5.7 Inoculation des plantules de haricot en cultures axéniques :

Un essai a été mené en système aseptique de culture hydroponique en vue de tester l'établissement du processus symbiotique rhizobium- haricot.

Dans un premier temps, nous avons cultivé les deux variétés simultanément et dans les mêmes conditions, les observations quotidiennes sur une période de 21 jours de croissance ont révélé qu'après 15 jours de culture, les plantules de la variété Terga

meurent dès l'apparition des premières ébauches des feuilles embryonnaires . Ceci nous a amenés à poursuivre l'expérience avec la variété Coco de Prague seulement.

Après 21 jours de croissance, les plantules témoins inoculées sont vertes et bien développées, leur système racinaire est ramifié et présentent un nodule.

Les plantules traitées par les trois doses de norflurazon sont également bien développées et vertes à l'exception des plantules traitées par la dose 100 μM qui présentent un photobleaching partiel ; les systèmes racinaires de ces plantules ne présentent aucun nodule (fig. .33 A et B).

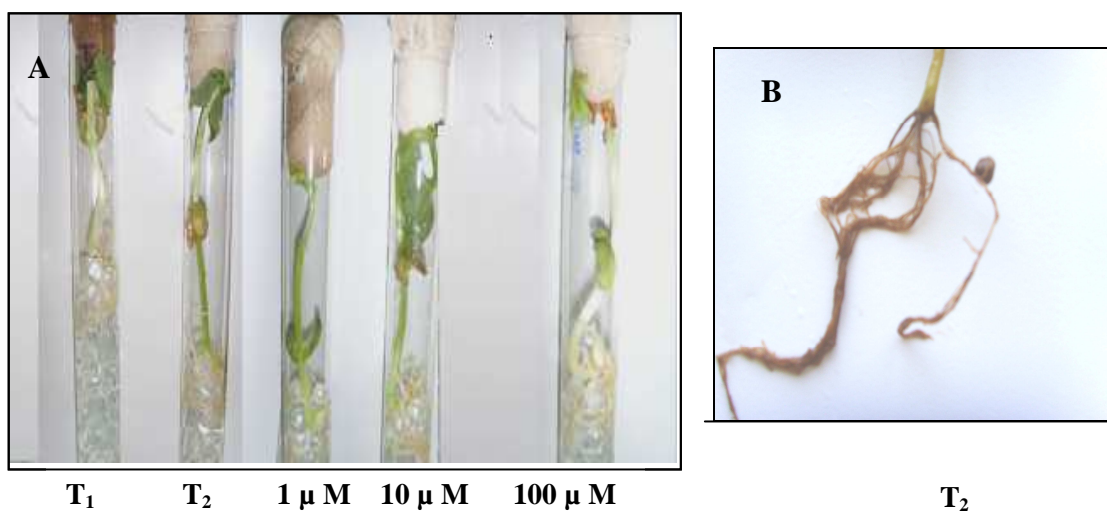


Figure 33: Photographies montrant l'effet du norflurazon sur les plantules de haricot (var Coco de Prague) en culture axénique. **(A)** : Plantules de haricot témoins et traitées âgées de 21 jours cultivées en conditions axéniques , **T₁** : témoin non inoculé, **T₂** : témoin inoculé, **(B)** : Système racinaire d'une plantule de haricot témoin inoculé.

Les résultats de nodulation obtenus en conditions axéniques sont différents de ceux obtenus en conditions de culture sur sol, qui ont montré un nombre important de nodules aussi bien chez les plantules témoins que chez les plantules traitées par la dose 1 μM (Fig. 19). Il semblerait que les conditions physico chimiques et biologiques du sol seraient favorables à la nodulation.

Chapitre IV

Discussion

Générale

Le présent travail se veut une contribution à une meilleure compréhension des modes d'action du norflurazon sur les plantules de deux variétés de haricot l'une importée (Coco de Prague) l'autre locale (Terga) et leur environnement rhizosphérique.

La première partie a porté sur l'étude de l'effet de l'herbicide appliqué en préémergence sur les aspects morphologiques (longueur de la partie aérienne, surface et pigmentation des feuilles, ramification des racines), mais également sur les aspects physiologiques et métaboliques (pigments photosynthétiques, sucres solubles et amidon, peroxydes d'acides gras, malondialdéhyde). La deuxième partie a concerné l'étude de l'effet du norflurazon sur l'association bactéries rhizosphériques-haricot (nombre de nodules, masse fraîche et sèche des nodules).

Des aspects variés de la toxicité du norflurazon ont été décrits dans de nombreux travaux (Agnolucci *et al.*, 1994 ; La Rocca *et al.*, 1998 ; Vecchia *et al.*, 2001).

L'ensemble de nos résultats montrent que les deux variétés de haricot se comportent relativement de la même façon vis-à-vis du norflurazon.

Le norflurazon à 1 μM ne provoque aucun symptôme morphologique apparent sur les plantules des deux variétés de haricot : celles-ci sont de taille relativement égale à celle des plantules témoins et les feuilles formées après le traitement sont vertes.

Sous l'effet de la dose 10 μM les plantes sont également vertes cependant leur taille comparée à celle des plantules témoins est légèrement réduite.

En présence de la dose 100 μM deux phénotypes se manifestent : des plantules vertes et des plantules partiellement dépigmentées ; le blanchiment débute à la base des feuilles et se propage au reste du limbe. Par ailleurs, les différents paramètres morphologiques mesurés : croissance en longueur de la partie aérienne, masse sèche des parties aériennes et des parties racinaires, surface foliaire sont nettement moins importants que ceux des plantules témoins.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de St John (1985) qui a noté un ralentissement de la croissance des plantes de seigle soumises sous l'action d'un pyridazinone substitué le R - 40244 et ceux de Vecchia *et al.*, (2001) qui ont également rapporté une réduction de la croissance des plantules de maïs traitées avec le norflurazon et l'amtrole .

Un grand nombre d'herbicides appliqués aux doses préconisées au champ sur des plantules entraînent un ralentissement de croissance et du développement par rapport au

lot de plantules témoins cultivées dans les mêmes conditions ; les plantes forment un moins grand nombre de feuilles, celles-ci sont généralement plus petites et souvent dépigmentées ; les tiges et les racines sont également plus petites. La réduction de la croissance des plantules de haricot est la conséquence des perturbations du métabolisme général des plantules. En effet, le norflurazon induit une diminution de la quantité des pigments photosynthétiques en fonction des doses testées ; la diminution des caroténoïdes et des chlorophylles est respectivement de 93 % et 70 % en moyenne pour la dose 100 μ M. Cette diminution des pigments résulte de l'effet direct du norflurazon sur la protéine cible à savoir la phytoène désaturase enzyme clef de la biosynthèse des caroténoïdes. L'interruption de la biosynthèse des caroténoïdes engendre un stress oxydatif sévère par la formation de molécules actives d'oxygène notamment l'oxygène singulet (Jung, 2004), il s'ensuit un manque de protection des chlorophylles qui sont alors photooxydées ce qui explique le bleaching des feuilles observé pour les deux variétés de haricot.

La forte baisse des teneurs en pigments photosynthétiques par le norflurazon se répercute sur l'activité photosynthétique des plantules de haricot estimée par les teneurs en sucres solubles et en amidon ; ces teneurs diminuent proportionnellement avec les doses appliquées atteignant une diminution de moitié pour les deux types de glucides sous l'effet de la forte dose 100 μ M. Cette réduction des glucides dérive d'une part, de la perturbation de la photosynthèse causée par le déficit en pigments photosynthétiques en rapport avec le bleaching mais également de la réduction de la surface foliaire.

Par ailleurs, le norflurazon agit sur les plantules en provoquant une destruction photooxydative des chloroplastes. En effet le norflurazon entraîne une décomposition des complexes protéines-chlorophylles et des protéines D1/D2 par manque de stabilisation par les caroténoïdes et les chlorophylles et il diminue voire supprime l'expression de nombreux gènes nucléaires dans les plantules dépigmentées suite à une interruption de signaux partant du chloroplaste vers le noyau. Parmi ces gènes figurent le gène *Rbcs* codant pour la petite sous unité de la ribulose 1,5 biphosphate carboxylase / oxygénase (enzyme clef de la fixation du CO₂) et le gène *Cab* codant pour le complexe chlorophylles a-b / protéines (Tamada *et al.*, 2003 ; Gray *et al.*, 2003).

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

également une inhibition du transfert des assimilats vers les racines chez les plantules traitées ce qui se traduit par une diminution du rapport masse sèche des racines sur masse sèche des parties aériennes.

A l'échelle cellulaire, la déficience en caroténoïdes entraîne une perturbation dans la structure des membranes ; cette perturbation a été évaluée par les dosages de peroxydes d'acides gras et des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr-TBA) dont le malondialdéhyde, molécules marqueurs du stress oxydatif induit par l'herbicide.

Nos résultats ont révélé que les teneurs en peroxydes d'acides gras de lipides ainsi que les substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr-TBA) dont le malondialdéhyde augmentent progressivement dans les feuilles des plantules traitées en fonction des doses herbicides appliquées. Cette élévation découle de l'accélération de la dégradation des lipides totaux traduisant ainsi un état de stress oxydatif sévère et une altération des membranes cellulaires en général et celles du chloroplaste en particulier, celles-ci étant riches en acides gras polyinsaturés.

Le malondialdéhyde, produit secondaire de la peroxydation des acides gras polyinsaturés, sert comme indicateur du statut des membranes, il est largement utilisé comme marqueur de stress des membranes cellulaires endommagées (Ryu., 2006).

Dans la deuxième partie du travail, l'impact du norflurazon a été évalué au niveau de la rhizosphère des plantules de haricot et ceci par l'étude du phénomène de la nodulation.

La plupart des études conduites sur l'interaction herbicide – rhizobium- plante hôte ont montré que les herbicides peuvent influencer la nodulation (nombre et la taille des nodules). Drew *et al.*, (2004) ont rapporté que des herbicides de contact (à action foliaire) et des herbicides systémiques réduisent significativement le nombre de nodules chez le petit pois

Nous avons recherché l'effet de cet herbicide sur la nodulation des plantules de haricot par les populations bactériennes rhizosphériques du genre rhizobium.

Les résultats obtenus ont montré que les plantules soumises à la dose 1 μM présentent un système racinaire bien développé et bien ramifié et un nombre de nodules proche de celui des plantules témoins. Les doses 10 μM et 100 μM s'avèrent inhibitrices de la nodulation des plantules de haricot (aucun nodule n'est observé) qui présentent un

système racinaire très réduit, et beaucoup moins ramifié en comparaison de celui des plantules témoins.

La réduction de la croissance des racines est donc associée à une inhibition de l'initiation de la mise en place des nodules : la croissance du système racinaire étant très affectée par l'herbicide, il y a inhibition de l'émergence et de l'élongation des poils absorbants et donc absence de sites potentiels d'infection. L'inhibition de la nodulation pourrait également provenir de la perturbation par l'herbicide de la capacité des rhizobia à reconnaître les plantes hôtes. Fox *et al.*, (2004) ont rapporté que certains herbicides peuvent mimer naturellement certaines substances biochimiques impliquées dans la reconnaissance bactérie- plante hôte et donc interférer avec les processus de signalisation entre les deux partenaires.

Les résultats obtenus avec les essais de la biodégradation du norflurazon par les rhizobia ont montré que quelle que soit la dose herbicide utilisée, il y a développement de l'inoculum bactérien autour du puits, ce qui laisse suggérer que le norflurazon a été biodégradé et utilisé comme source de carbone par les rhizobia.

Aamil (2002) et Eberbach (1989) ont rapporté que les effets des herbicides sur les bactéries dépendent de leurs concentrations et aussi des espèces et des souches bactériennes utilisées .

Il semble donc que le norflurazon en empêchant la nodulation, n'agit pas sur les bactéries mais agit plutôt sur la reconnaissance ou dialogue moléculaire entre les bactéries et la plante hôte.

La croissance des rhizobia n'est cependant qu'un aspect de la symbiose qui dépend aussi de la formation des nodules, de la croissance des nodules et de la fonction des nodules. En définitive, tous ces processus sont susceptibles d'être affectés par l'herbicide.

L'effet du norflurazon sur le développement des nodosités semble également lié à l'aptitude des organes photosynthétiques à approvisionner les organes puits (racines) en photoassimilats ; une réduction dans l'approvisionnement des racines en photosynthétats quand la plante est en phase de nodulation peut entraîner une réduction dans le nombre et/ou la taille des nodules.

Singh et Wright (1999, 2002) ont montré que de nombreux herbicides réduisent la nodulation par manque d'alimentation des organes puits (racines) suite à un effet sur la croissance des feuilles et des tiges.

Plusieurs études ont montré que les herbicides agissent indirectement sur la nodulation, et ceci à travers leur action sur la croissance du végétal et par conséquent sur la disponibilité des photosynthétas aux nodules racinaires (Rennie et Dubetz, 1984 ; Bertholet et Clarck 1985 ; Sprout *et al.* , 1992 ; Vidal *et al.*, 1992 ; Abd Allah *et al.*, 2000).

Par ailleurs il a été montré que l'influence des herbicides sur la nodulation semble étroitement liée à la teneur du sol en argile et en matière organique ; l'effet le plus négatif étant associé aux sols sableux dont la teneur en matière organique est inférieure à 2% (Bollich *et al.*, 1985 ; Moraes *et al.*, 1989).

Les résultats de l'échantillon du sol utilisé dans le cadre de nos expérimentations ont révélé un sol de type argileux (48%) et une teneur moyenne en MO (11%). Ces deux paramètres ne semblent pas en défaveur de la nodulation en présence de l'herbicide utilisé.

Dans le cas du norflurazon, les données sur le devenir de cet herbicide dans le sol et son éventuelle métabolisation par les bactéries rhizosphériques notamment les rhizobia restent fragmentaires et peu nombreuses.

Nos résultats suggèrent que les fortes doses du norflurazon 10 μM et 100 μM exercent un effet direct sur la croissance des plantules de haricot et un effet indirect sur le phénomène de la nodulation. Ces doses s'avèrent extrêmement toxiques pour l'établissement de la symbiose haricot – rhizobia.

Conclusion et perspectives

Le norflurazon qui est un herbicide de présemis ou de préémergence à la dose proche de celle utilisée au champ agit à la fois sur la morphologie (bleaching et ralentissement de la croissance) et la physiologie des plantules de haricot (réduction de l'activité photosynthétique), il endommage les membranes cellulaires en augmentant la peroxydation des lipides membranaires suite au stress oxydatif induit, il empêche également la mise en place de la nodulation en interrompant la relation plante –bactérie. L'influence de l'herbicide sur la nodulation dépend de la dose mais aussi de l'importance des dommages occasionnés par l'herbicide à la plante hôte.

Les herbicides présentent donc un risque d'endommagement des cultures ; l'ampleur et la gravité des dommages dépendent du stade de croissance, de la vigueur des plantes et de leur capacité à métaboliser la substance. Une culture peut ne pas métaboliser l'herbicide assez rapidement et se trouver ainsi endommagée.

Les herbicides sont devenus incontournables dans la gestion de l'agriculture moderne ; toutefois, leur utilisation doit impérativement tenir compte de leurs potentiels effets nuisibles. Au stade actuel des connaissances, le message aux agriculteurs est d'être vigilants au sujet du potentiel impact des herbicides sur les symbioses rhizobia-légumineuses

Pour une meilleure appréciation de l'impact du norflurazon sur les plantules de haricot et sur les rhizobia symbiotiques, il serait intéressant de compléter et d'enrichir cette étude par :

- Une étude au niveau quantitatif et qualitatif des exsudats racinaires excrétés par les racines des plantules traitées par le norflurazon.
- Un dosage de l'herbicide dans les différentes parties de la plante par des techniques de marquage ou par HPLC / CPG /MS .
- Une étude de l'un des mécanismes de détoxification (activité enzymatique Glutathion S transférase.
- Une étude de l'activité enzymatique de la nitrogénase.

Références

Bibliographiques

(A)

Abrous O., Benhassaine-Kesri G., Trémolières A. et Mazliak P. (1998) – Effect of norflurazon on lipid metabolism in soya seedlings. *Phytochemistry*, **49 (4)**: 979-985.

Amarger N. (1998) - Microbiologie des Sols, INRA-CMSE Dijon and soil aggregate stability. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* **64**: 1479-1486.

Anderson A., Baldock J.A., Rogers S.L., Bellotti W., Gill. G. (2004) -Effects of chlorsulfuron on the ability of chickpea Rhizobium to effectively infect chickpea roots 12th International Congress on Nitrogen Fixation: From molecules to crop productivity,

Appleby A.P. (1985) - Factors in examining fate of herbicides in soil with bioassays. *Weed Sciences*. **33(2)**: 2-6.

Asada K., Takahashi M. (1987)- Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis, p. 227–287. In: *Photoinhibition*. Kyle, D.J., Osmond, C.B. and Arntzen, C.J. (Eds.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands.

Ayele J., Delage L., Tourte E., Mazet M. (1996) - Sorption of herbicides by soils an application in apple orchards. Association Nationale pour la Protection des Plantes (ANPP), Paris, France. *J of Agric. Res.* **55**:1059-1070.

(B)

Barry P., Young A .J., Briton G. (1990) - Photodestruction in higher plants by herbicide action. *Journal of Experimental Botany*. **41** : 123-126.

Belbachir O., Matringe M., Tissut M. et Chevallier D. (1982) – Physiological action of dinoterb, a phenol derivative : 1 - Physiological effects on the whole plant and on tissue fragments of pea. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **14** : 303-308.

Belkebir A., De Paepe R., Trémolières A., Aïd F. et Benhassaine-Kesri G. (2006) - Sethoxydim affects lipid synthesis and acetyl-CoA carboxylase activity in soybean. *J . Exp. Bot* ,**57**: 3553–3562.

Bergum A.A., Leibovitch S ., Migner P., Zhang F .(2001) - Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of Rhizobium leguminosarum increased pea (pisum sativue L .) and lentil (lens culinaris L.) nodulation in controlled growth chamber environments . *J. Exp . Bot .* **52 (360)**: 1537 – 1543.

Blight E.G. et Dyer W.J.(1959)- A rapid method of total lipid extraction and purification . *Can. J.Biochem. Physiol.*, **37** :103-106.

Bollich P. K., Denigan E. P., Kitchen L. M., Burn R. C. (1985) -The influence of trifluralin and pendimethalin on nodulation, N₂ (C₂H₂) fixation and seed yield of field grown soybean (*Glycine max* L.). *Weed Res*, **36**: 15-19.

Bramley P., Schuch W. (1984)- Cloning and characterization of a gene involved in phytoene synthesis from tomato. *Plant Mol Biol.*, **19(3)**:401–404.

Bramley P.M. (1994) – Carotenoid biosynthesis : a target site for bleaching herbicides. *Lipid Biochem. And Pestic Action.*, **22**, 625-629.

(C)

Cadet J ., Triantaphylidès C ., Dany A. L. et Douki T. (1999) - Optimisation of *Arabidopsis thaliana* DNA extraction for the analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine formation after gamma irradiation, *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, **96**: 152-161.

Calvet R., Tercé M., Arvieu J. C. (1977)- Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants. *Ann. Agron.*, **31**: 239-257.

Cao G., Sofic E., Prior L. R. (1997)- Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure- activity relationships .*Free Radicals, Biol Med*, **22**: 749-760.

Cardina J., Hartwig N.L. et Lukezic F.L. (1986) - Herbicidal effects on crownvetch rhizobia and nodule activity. *Weed Science* .**34**: 338–343.

Chamovitz D., Sandmann G . et Hirschberg J. (1993) – Molecular and biochemical characterisation of herbicide resistant mutant of cyanobacteria reveal that phytoene desaturation is rate limiting step on carotenoide biosynthesis . *J. Biol. Chem.* , **268** : 17348 – 17353 .

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

Chenu C., Le Bissonais Y. et Arrouays D. (2000).- Organic matter influence on clay wettability and soil aggregate stability. *Soil Sci. Am. J.*, **64** :1479-1486,

Clark S. A., Mahanty H. K. (1991) - Influence of herbicides on growth and nodulation of white clover, *Trifolium repens*Trifolium repens. **Soil Biol. Biochem.** **23**:725-730.

(D)

Davies A.O., Harwood J.L. (1983) - Effect of Substituted Pyridazinones on Chloroplast Structure and Lipid Metabolism in Greening Barley Leaves , *Journal of Experimental Botany* ,**34 (9)** : 1089 – 1100 .

Davet P. (1996).- Vie microbienne du sol et production végétale, INRA, Paris, 383p.

Del Río L.A., Pastori G.M., Palma J.M., Sandalio L.M., Sevilla F., Corpas F.J., Jiménez A., López-Huertas E., Hernández J.A. (1992) - The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiol* **116**: 1195–1200.

Dénarié J. et. Joly P.-B. (1994) - La fixation de l'azote. - Les enjeux de la recherche. *Biofutur* **133**: 30-34.

Dessaux Y. (2005) - Interactions plantes et microorganismes de la rhizosphère .ISV-CNRS.

Di Baccio D., Quartacci M.F., Vecchia D.F., La Rocca N., Rascio N. et Navari-Izzo F.(2002) – Bleaching herbicide effects on plastids of dark-grown plants : lipid composition of etioplasts in amitrole and norflurazon-treated barley leaves. *Journal of Experimental Botany*, **53 (376)**: 1857-1865.

Dommergues Y., Duhoux E., Diem H.G. (1999) - Les arbres fixateurs d'azote, 500p., IRD.

Duke S. (1990) – Overview of herbicide machanisms action . *Environmental health perspectives* . **87**:263- 271.

Dunigan E.P.; Frey J.P., Allen L.D., McMahon A. (1972) - Herbicidal effects on the nodulation of *Glycine max* (L.), Merrill. *Agronomy Journal*, **64**: 806-808.

(E)

Edwards R. et Owen W. J. (1975) - Comparison of glutathione s-transferases of *Zea mays* responsible for herbicide detoxification in plants and suspension-cultured cells. *Planta*. **169**: 208-215.

Elmerich C., Zamaroczy M., Arsène F., Pereg L., Paquelin A. et Kaminski A. (1997) - Regulation of nif gene expression and nitrogen metabolism in *Azospirillum*. *Soil Biol. Biochem.*, **29**, 847-852.

Eshdat Y., Holland D., Faltin Z., Ben-Hayyim G .(1997) -Plant glutathione peroxidases. *Physiol Plant* , **100**: 234-240.

Everaere L ., Petkinko P .et Thiebault P.H . (1990) – Les sulfonylurées , nouvelle génération d'herbicides . *Phytoma* . **420** : 20.

(F)

Fisher R.F., Long S.R. (1992) - Rhizobium-plant signal exchange. *Nature*, **357** :.655-659.

Foyer C.H., Descourvières P., Kunert K.J. (1994) - Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell. Env.* **17** :507–523.

Freyssinet G. (1990) – Résistance aux herbicides et transfert de gènes .*Phytoma*, 415.

Fryer M.J. (1992) - The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). *Plant Cell and Environment*, **15**: 381–392.

(G)

Genot C.; Meynier A.; Riaublanc A.; Chobert J.M. (2003)- Protein alterations due to lipid oxidation in multiphase systems. In: “*Lipid Oxidation Pathways*”, Kamal-Eldin, A. (Ed.); AOCS Press, Chapter 9, 266-293.

George G. S., Buchanan G. (1990)- Isolation, properties and induction of plaice liver cytosolic glutathione S-transferases. *Fish Physiol. & Biochem.*, **8 (6)**: 437-449.

Géraldine G., Josiane A. (2002) – Study of norflurazon behaviour in soils, influence of formulation additives upon sorption parameters. *Agronomie* , **22 (5)** : 467-478 .

Geurts R., Franssen H.(1996)- Signal transduction in *Rhizobium*-induced nodule formation. *Plant Physiol* .**112**: 447–453.

Gibson A.H.et Jordan D.C. (1983) - Ecophysiology of nitrogen-fixing systems. In *Physiological Plant Ecology III. Responses to the Chemical and Biological Environment* . Berlin: Springer-Verlag , 301–390.

Gonzales A., Gonzales -Murua C., Royuela M . (1999) - Influence of imazethapyr on *Rhizobium* growth and its symbiosis with pea (*Pisum sativum* L.). *Weed Science*, **44**: 31.

Grill D., Tausz M., De Kok L.J. (2001) - Significance of glutathione in plant adaptation to the environment. *Handbook of plant ecophysiology*, **2**.

Gronwald J.W. (1994)- Resistance to photosystem II inhibiting herbicides., *Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry*. 27–60.

(H)

Hacker J., Kaper J. B (2000) - Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Ann. Rev. Microbiol.*, **54**: 641-679.

Halliwell B. et Gutteridge J.M.C (1989)- Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford, U.K.

Havaux M. (1998) – Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science*, **3**: 147-151.

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

Hubbs C.W., Lavy T.L. (1990) - Dissipation of norflurazon and other persistent herbicides in soil. *Weed Science*, **38**: 81-88.

(I)

Igamberdiev A.U., Bykova N.V., Kleczkowski L.A. (1999) - Origins and metabolism of formate in higher plants. *Plant Physio Biochem.* **37**: 503–13 .

Isbell H.S., Frush H.L., Martin E.T. (1973) - Reactions of carbohydrates with hydroperoxides. Oxidation of aldoses with sodium peroxide. *Carbohydr Res.* **26**:287–95.

(J)

Josse ., (2000) - Plastid terminal oxidase an its biological significance, *Springer Berlin*, **218 (6)**: 896 – 899.

Joyard J., Blick M.A., Douce R. (1991) - Molecular aspects of plastid envelope biochemistrey. *European Journal of Biochemistry* ,**199** :489 – 509.

Jung S.Y., Kernodle S.P., Scandalies J.G. (2001) - Differential antioxydant responses to norflurazon induced oxidative stress in maize. *Redox Rep.* **6 (5)**, 311-317.

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

Juszczuk I.M., Bykova N.V., Møller I.M. (2007) - Protein phosphorylation in plant mitochondria. . *Plant Physiol.* **129** : 90–113 .

(K)

Kaci Y., Heyraud A., Barakat M. et Heulin T. (2005) - Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. *Research in Microbiology.* **156**: 522-531.

Kapchina-Toteva V., Slavov S., Batchvarova R., Krantev A., Stefanov, D et Uzunova A. (2004)- Stress markers in chlorsulfuron tolerant transgenic tobacco plants, *Plant physiol*, **30(1-2)**: 103-111.

Karpinska B., Karlsson M., Schinkel H., Streller S., Süß K-H., Melzer M., Wingsle G. (2001). A novel superoxide dismutase with a high isoelectric point in higher plants: expression, regulation and protein localisation. *Plant Physiology*. **26**: 1668–1677.

Keyser H., Somasegaran P., Bohlool B.(1993) - Rhizobial ecology and technology, p. 205-226. In F. Blaine Metting , Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management. Marcel Dekker, Inc., New York.

Khan M. S., Zaidi A., Aamil M. (2004)- Influence of herbicides on chickpea *Mesorhizobium* symbiosis. *Agronomie*. **24**: 123-127.

Khelifa N. (2002) - Effets d'un herbicide : le Sulfosulfuron sur la germination, le début de croissance et le métabolisme cellulaire des feuilles de soja *Glycine max* L. Mémoire de thèse de Magister . 100p.

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

Krieger A., Rutherford A.W. (1998) - Comparison of chloride depleted and calcium depleted PSII: the midpoint potential of QA and susceptibility to photodamage *Biochim Biophys Acta Bioenergetics*. 1319 : 91-98.

Kucey R. M. N., Chaiwanakupt P., Snitwongse P. (1988) -Nitrogen fixation (¹⁵N dilution) with soybeans under Thai field conditions. III. Effect of *Bradyrhizobium japonicum* strains and herbicides in northeast Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol*. **34**:243-253.

(L)

La Rocca N., Bonora A., Dalla Vecchia F., Barbato R. et Rascio N. (1998) – Effects of amitrole and norflurazon on carotenogenesis in barley plants grown at different temperatures. In Garab G. (ed) photosynthesis : mechanisms and effects, vol V. Kluwer, Dordrecht, 3459-3462.

Lichtenthaler H.K. (1987) –Chlorophylls and carotenoids : Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methodes in enzymology*, **148**, 350-382.

Lindstrom D.L. et Hartzog G.A. (2001)- Genetic interactions of Spt4–Spt5 and TFIIS with the RNA polymerase II CTD and CTD modifying enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **159**: 487–497.

Lindström K., Sorsa M., Polkunen J., et Kansaner P. (1985) - Symbiotic nitrogen fixation of *Rhizobium* (Galega) in acid soils, and its survival in soil under acid and cold stress. *Plant Soil* **87**:293-302.

Lingnowski E.M. et Scott E.G. (1972).-Effects of trifluralin on mitosis ,*Weed Science*, **20**.

Ljunggren H. et Martensson A. (1980) - Herbicide effect on leguminous symbiosis.,
Swedish Weed Conference . 99-106.

Lolas P.C. (2003) - Herbicides, Fate and behaviour in the environment (in Greek),
Weed Science: Weeds, 588.

(M)

Mallik M A B., Tesfai K. (1985)- Pesticidal effect on soybean rhizobia symbiosis.
Plant Soil .**85**: 33-41.

Martensson A.M. (1992) - Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. *Soil Biology and Biochemistry* .**24**: 435–445.

Martinez E., Poupot R. (1993) - Chemical signaling of *Rhizobium* nodulating bean. New Horizons in Nitrogen Fixation. R. Palacios, J. Mora and W. E. Newton. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 171-175.

Matringe M . et Scalla R .(1988) – Effects of acifluorfen methyl on cucumber cotyledons, porphyrin accumulation . *Pestic . Biochem . Physiol .*, **32**:164 – 172.

Maxwell K., Badger MR., Osmond C.B . (1999)- A comparison of CO₂ and O₂ exchange patterns and the relationship with chlorophyll fluorescence during photosynthesis in C₃ and CAM plants. *J Plant Physiol.* **25**: 45-52 .

Mc Ready R.M, Guggoz J., Silverir V. et Owensh S. (1950). Determination of strach and analyse in vegetables.

Middeldorp P.J.M., Luijten B.A., Van Eekert M.H., Kengen S.W.M . (1999)- Anaerobic microbial reductive dehalogenation of chlorinated ethenes . *Bioremediation Journal* .**3**: 151 – 169.

Minotti G., Aust S.D. (1992) - Redox cycling of iron and lipid peroxidation *Lipids* . **27**: 219-226.

Mittler R. (2002) - Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, **7**: 405–410.

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

Müller J., Boller T. et Wiemken A. (2001)- Trehalose becomes the most abundant non structural carbohydrate during senescence of soybean nodules. *Journal of Experimental Botany.* **52**: 943 – 947.

(N)

Ni W., Trelease R.N. (1991) - Two genes encode the two subunits of cottonseed catalase, *Arch Biochem Biophys* , **289**: 237-243.

Noctor G., Foyer C.H. (1998) - Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Plant Physiol*, **49**: 249–279.

(O)

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

(P)

Packer L. (1991) - Protective role of vitamin E in biological systems. *American Journal of Clinical Nutrition* , **53**: 1050–1055.

Pompella A., Maellaro E., Casini A.F., Comporti M. (1987) - Histochemical detection of lipid peroxidation in the liver of bromobenzene–poisoned mice. *Am J Pathol*. **129**:295–301

(R)

Ray J, Moureau P, Bird C, Bird A, Grierson D, Maunders M, Truesdale M, Bramley P, Schuch W. 1984- Cloning and characterization of a gene involved in phytoene synthesis from tomato. *Plant Mol Biol.*, **19**(3):401–404.

Reddy K.N., Megh S., Alva A.K. (1992) -. Sorption and desorption of diuron and norflurazon in Florida citrus soils. *Water Air Soil Poll.*, **64**: 487-494.

Rennie R.J., et Dubetz. S. (1984) - Effect of fungicides and herbicides on nodulation and N₂-fixation in soybean files lacking indigenous *Rhizobium japonicum*. *Agron. J.* **76**:451-454.

Ribera D. (1990)-. Métabolisme oxydatif chez la moule : peroxydation lipidique et biotransformation des xénobiotiques. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux I, 38-51

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G . (1996) -Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*. **20**:933-956.

Ryu J.H. (2006) - Vitamin E Protects against Photoinhibition and Photooxidative Stress in Plants Lab of Floriculture and Landscape Plants.

(S)

Salguero A., de la Morena B., Vigarra J., Vega J.M., Vilchez C. et Leon R. (2003) – carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomol. Engineer.*, **20** : 249-253.

Salin M.L. (1987) - Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol Plant* .**72**:681-689.

Sanchez F., Padilla J., Pérez H et Lara M. (1991) - Control of nodulin genes in root nodule development and metabolism. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **42**: 507 – 528.

Sandmann G. et Albrecht M. (1994) – Accumulation of colourless carotenes and derivatives during interaction of bleaching herbicides with phytoene desaturation. *Z. Naturforsch.*, **45**: 487-491.

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

Scalla R. (1991) – Les herbicides: Mode d'action et principes d'utilisation. Collection INRA du labo au terrain. INRA Editions, Versailles, France.

Scandalios L.M. (1987)- Developmental Analysis of Steady-State Levels of Cu/Zn and Mn Superoxide Dismutase mRNAs in Maize Tissues , *Plant and Cell Physiology*, **31** (8) :**1163 – 1167**.

Schnelle H. A., Hensley D. L. (1990) - Effects of pesticides upon nitrogen fixation and nodulation by dury bean. *Pestic. Sci.* **28**:38-88.

Serraj R., Roy G., Drevon J.J. (1994) - Salt stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and in their permeability to oxygen. *Physiologia Plantarum* **91**, 161-8.

Serraj R., Sinclair T.R. (1996) - Inhibition of nitrogenase activity and nodule oxygen permeability by water deficit. *Journal of Experimental Botany*, **47**:1067-73.

Shaner D.L et Reider M.L. (1986) - Some effects of chlorsulfuron on the ultrastructure of root and leaf cells in pea plants, *Journal of plant growth regulation* , **16** : 1- 5 .

Singh G., Wright D. (2002)-. *In vitro* studies on the effect of herbicides on the growth of rhizobia. *Letters Appl Microbiol* ,**35**: 12-16.

- Singh G., Wright D. (1999)** - Effects of herbicides on nodulation, symbiotic nitrogen fixation, growth and yield of pea (*Pisum sativum*). *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* **133**: 21–30.
- Smirnoff N., Cumbes Q.J. (1989)** - Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Photochemistry*, **28**: 1057-1060.
- Sorensen S .R . et Aamand J.(2003)** - Rapid mineralization of the herbicide isoproturon in soil from a previously treated Danish agricultural field. *Pest Manag Sci* **59**: 1118-1124
- Sprent, J. I., Zahran H. H. 1988** - Infection, development and functioning of nodules under drought and salinity, p. 145-151. *In* D. P. Beck, and L. A. Materon (ed.), Nitrogen fixation by legumes in Mediterranean agriculture. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, Dordrecht, The Netherlands.
- Sprout S. L., Nelson L. M., Germida J. (1992)-.** Influence of metribuzin on the *Rhizobium leguminosarum* lentil (*Lens culinaris*) symbiosis. *Can. J. Microbiol.* **38**: 343, 1992.
- (T)
- Tamada Y., Imanari E., Kurotani K.I., Nakai M., Andreo S.A. et Izui K. (2003)** – Effect of photooxidative destruction of chloroplasts on the expression of nuclear genes for C₄ photosynthesis and for chloroplast biogenesis in maize. *J. Plant Physiol.*, **160**: 3-8.
- Telfer A. (2005)** - Too much light ? How beta – carotene protects the photosystem II reaction centre .*Photochem Photobiol Sci*, **4 (12)**: 950.
- Thies F., Backhaus T., Bossmann B. et Grimme L.H. (1996)** – Xenobiotic biotransformation in unicellular green algae : involvement of cytochrome P₄₅₀ in the activation and selectivity of the pyridazinone pro-herbicide metflurazon. *Plant Physiol.*, **112** :361-370.
- Tissut M. et Séverin F. (1984)** – Plantes, herbicides et désherbage. Association de coordination technique agricole, Paris.
- Tomlin C. D. S. (1997)** - The Pesticide Manual. British Crop Protection Council. Farnham (United Kingdom). **11**. 1606 p
- Tripoli E., Giammanco M., Tabacchi G., Di Majo D et La Gardia M .(2005)** -The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human, *Health Nutrition Research Reviews* , **18** :98-112

(U)

Udvardi M. et Day D. (1997) - Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **48**: 493 – 523 .

(V)

Van de Sande K., Bisseling T.(2000) – Signalling in symbiotic root nodule formation . *Essays in Biochemistry*. **32**: 127 – 142 .

Vecchia D.F., Barbato R., La Rocca N., Moro I. et Rascio N. (2001) - Response to bleaching herbicides by leaf chloroplasts of maize plants grown at different temperatures. *Journal of Experimental Botany*, **52 (357)**:811-820.

Vincent J.M. (1970) -A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. IBP Handbook no. 15 Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Visioli F., Bellomo G., Galli C. (1998) - Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247** : 60-64.

(W)

Werck-Reichhart D., Hehn A., Didierjean L. (2000) - Cytochrome P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends in Plant Science*. **5**:116–123.

Whipps J.M. et Lynch J.M. (1986) - The influence of the rhizosphere on crop productivity. *Plant physiology - Nutrition*

Wilkinson R.E. (1993) – Naphtalic anhydride partial reversal of carotenogenesis inhibition by norflurazon. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **47** : 81-86.

Willekens H., Chamnongpol S., Davey M. , Schraudner M. , Langebartels C. , Van Montagu M., Inzé D., Van Camp W. (1997)-Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants .*EMBO Journal.*, **16 (16)** : 4806-4816

(Y)

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

Young A.J., Orset S. et Tsavolas A.J. (1998) – Carotenoids in higher plant photosynthesis. *Handbook of photosynthesis*. 575-596.

Yueh L.Y.; Hensley D.L . (2004)- Pesticide effect on acetylene reduction and nodulation by soybean and lima bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v.118, p.73-76, 1993.

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

Yurina N.P. et Kloppstech K. (2001) – Accumulation of plastid protein precursors under norflurazon-induced carotenoid deficiency and oxidative stress in barley. *Plant Physiology and Biochemistry*, **39** (9) : 807-814.

Yves C. (2001)- Les raffinements sexuels d'une bactérie du sol au service du génie génétique, *médecine/sciences*, **17** : 856-66

(Z)

Zakhia F et de lajudie P. (2006) - La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques — application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL)

ANNEXE II

Temperature (°C)	Particules de 0,002 mm de diamètre			Particules de 0,002 mm de diamètre	
	Temps de chute pour 10 cm en h/m	Profondeur de decantation ou de prelevement en cm apres			Temps de chute pour 10 cm en m/s
		8 h	7 h	6 h	
10	10/23	7,7	6,7	5,8	6,14
11	10/06	7,9	6,9	5,9	6,03
12	9/49	8,1	7,1	6,1	5,54
13	9/34	8,4	7,3	6,3	5,44
14	9/19	8,6	7,5	6,4	5,39
15	9/05	8,8	7,7	6,6	5,27
16	8/51	9	7,9	6,8	5,19
17	8/37	9,3	8,1	7	5,10
18	8/24	9,5	8,3	7,2	5,03
19	8/12	8,9	8,6	7,3	4,55
20	8	10	8,8	7,5	4,48
21	7/48	10,3	9	7,7	4,41
22	7/37	10,5	9,2	7,9	4,34
23	7/26	10,8	9,4	8,1	4,28
24	7/16	11	9,7	8,3	4,22
25	7/06	11,3	9,9	8,5	4,15
26	6/56	11,5	10,1	8,7	4,10
27	6/47	11,8	10,3	8,9	4,04
28	6/38	12,1	10,6	9,1	3,59
29	6/29	12,3	10,8	9,3	3,54
30	6/21	12,6	11,8	9,5	3,48

ANNEXE III

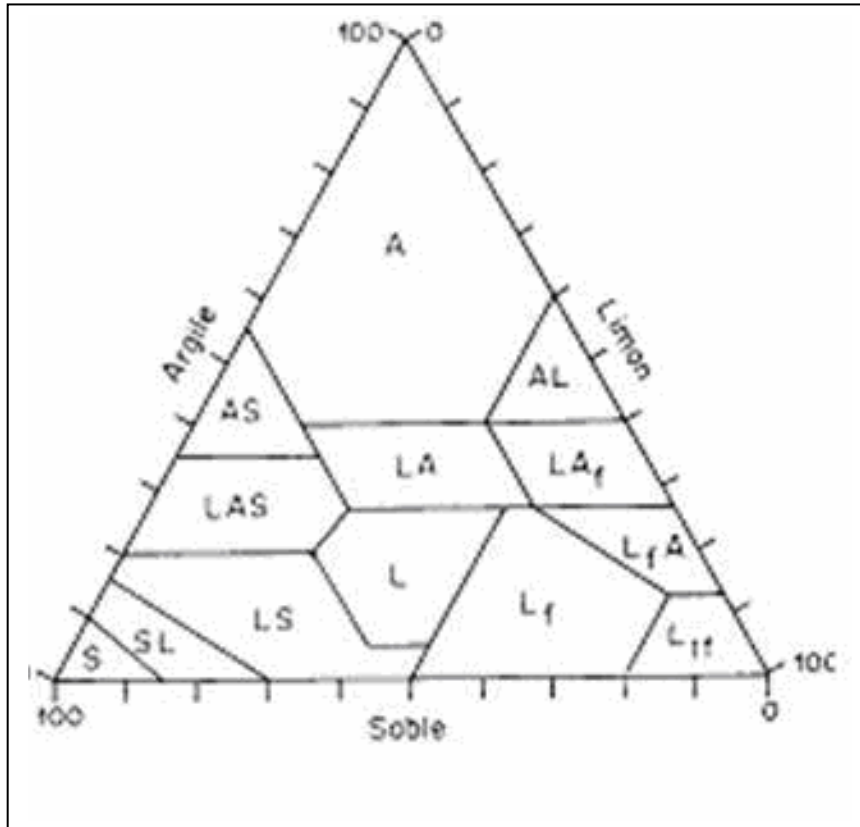


Diagramme des textures U.S.D.A.

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Composition biochimique de la graine de haricot commun <i>Phaseolus vulgaris</i> .	4
Figure 2 : Echanges de signaux entre les partenaires symbiotiques rhizobia et légumineuses au cours des premières étapes de la nodulation.	8
Figure 3: Formule générale des pyridazinones.	13
Figure 4 : Devenir d'un herbicide dans le sol.	17
Figure 5 : Schéma de métabolisation d'un herbicide.	20
Figure 6 : Peroxydation d'une portion de chaîne d'acide gras polyinsaturé.	26
Figure 7: Structure biochimique du malondialdéhyde.	26
Figure 8 : Cycle des xanthophylles.	28
Figure 9: Exemple de réaction antioxydante en chaîne mettant en jeu les vitamines E et C.	29
Figure 10 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques.	32
Figure 11 : Le cycle ascorbate- glutathion.	33
Figure 12 : Graines de la variété Coco de Prague et graines de la variété Terga.	34
Figure 13 : Formule chimique du norflurazon.	35
Figure 14 : Dispositif expérimental de la culture axénique.	47
Figure 15 : Effet du norflurazon sur la morphologie des plantules de haricot	50
Figure 16 : Effet du norflurazon sur la cinétique de la croissance des plantules de haricot.	51
Figure 17 : Effet du norflurazon sur la surface foliaire des plantules de haricot.	52
Figure 18 : Effet du norflurazon sur la masse sèche de la partie aérienne des plantules de haricot .	52
Figure 19 : Effet du norflurazon sur le système racinaire et la nodulation des plantules de haricot .	54
Figure 20 : Effet du norflurazon sur la masse sèche des racines des plantules de haricot.	55

Figure 21 : Effet du norflurazon sur le rapport masse sèche racinaire /masse sèche des parties aériennes des plantules de haricot.	57
Figure 22 : Effet du norflurazon sur la teneur en caroténoïdes dans les feuilles de plantules de haricot.	59
Figure 23 : Effet du norflurazon sur la teneur en chlorophylle totale dans les feuilles de plantules de haricot.	60
Figure 24: Effet du norflurazon sur la teneur en sucres solubles dans les feuilles de plantules de haricot.	61
Figure 25 : Effet du norflurazon sur la teneur en amidon dans les feuilles des plantules de haricot.	63
Figure 26 : Effet du norflurazon sur la teneur en peroxydes d'acides gras de plantules de haricot.	64
Figure 27: Effet du norflurazon sur la teneur en malondialdéhyde dans les feuilles des plantules de haricot.	66
Figure 28 : Effet du norflurazon sur la nodulation des plantules de haricot.	67
Figure 29 : Effet du norflurazon sur la masse fraîche des nodules des plantules de haricot.	68
Figure 30 : Effet du norflurazon sur la masse sèche des nodules des plantules de haricot.	68
Figure 31: Culture de souches rhizobiennes sur milieu YMA modifié.	69
Figure 32: Photographies montrant la prolifération des colonies bactériennes cultivées en présence des solutions du norflurazon.	70
Figure 33: Photographies montrant l'effet du norflurazon sur les plantules de haricot (var Coco de Prague) inoculées avec les souches de rhizobium.	71

INDEX DES TABLEAUX

Tableau I: Quelques dérivés de pyridazinones et leur influence sur le métabolisme cellulaire.	14
Tableau II. : Composition chimique du milieu de culture YEMA modifié .	44
Tableau III : Composition chimique du milieu YESB (milieu de Vincent liquide).	46
Tableau IV : Composition chimique du milieu de KNOP.	47
Tableau V. Description des 5 lots de culture axénique.	48
Tableau VI : Mesures de quelques paramètres de croissance chez les plantules de haricot.	49
Tableau VII : Pourcentages de réduction de la masse sèche de la partie aérienne des plantules de haricot.	53
Tableau VIII : Effet du norflurazon sur la nodulation des plantules de haricot.	55
Tableau IX: Pourcentages de réduction de la masse sèche des racines des plantules de haricot.	56
Tableau X : Mesures de quelques paramètres métaboliques de la photosynthèse dans les feuilles des plantules de haricot.	58
Tableau XI : Pourcentages de réduction de la teneur en caroténoïdes dans les feuilles des plantules de haricot.	59
Tableau XII : Pourcentages de réduction de la teneur en chlorophylles totales dans les feuilles des plantules de haricot.	60
Tableau XIII : Pourcentages de réduction de la teneur en sucres solubles dans les des feuilles des plantules de haricot.	62
Tableau XIV: Pourcentages de réduction sous l'effet du norflurazon de la teneur en amidon dans les feuilles des plantules de haricot.	63
Tableau XV: Pourcentages d'augmentation de la teneur en peroxydes d'acides gras dans les feuilles des plantules de haricot.	65
Tableau XVI : Pourcentages d'augmentation sous l'effet du norflurazon de la teneur en malondialdéhyde dans les feuilles des plantules de haricot.	66

ملخص:

هذا العمل يراد منه المساهمة في الفهم الجيد لأنماط عمل مبيد أعشاب مبييض، النورفلورازون عن طريق تراكيز مختلفة معالجة لنباتات الفاصولياء " كوكو دوبراق و ترقة و على محيطهم الجذري. قمنا بتقييم أثر النورفلورازون على مستوى المورفولوجي (طول الجهة العلوية المساحة الورقية، الكتلة الجافة للجذور و الجهات العلوية، على المستوى الفيزيولوجي بقياس مقاييس المتعلقة بالتركيب الضوئي (الأصبغة الورقية، السكريات المذابة و النشاء) و أيضا على درجة أكسدة الأغشية الخلوية، و هذا بتقييم نسبة أكاسيد الأحماض الدسمة و المالونديالدهيد. من جهة أخرى، تم تقييم أثر النورفلورازون على مستوى المساحة الجذرية و ذلك بحساب عدد العقد البكتيرية و الكتلة الطرية و الجافة لهذه العقد. النتائج المتحصل عليها بينت أن التركيز $1\mu\text{M}$ لا يؤثر بشكل كبير، بينما التراكيز $10\mu\text{M}$ و $100\mu\text{M}$ تؤثر على مورفولوجيا و فيزيولوجيا النباتات و هذا بتخفيض نسبة الأصبغة الورقية و السكريات الذائبة و النشاء على المستوى الخلوي. النورفلورازون أدى إلى رفع نسبة أكاسيد الأحماض الدسمة و المالونالدهيد مما يدل على تمزق مكونات الأغشية الخلوية و حدوث توتر أكسيجيني حاد تحت تأثير التراكيز $100\mu\text{M}$ و $100\mu\text{M}$ ، لا يوجد أية عقدة بكتيرية على مستوى جذور هذه النباتات. النتائج المتحصل عليها عن طريق التجارب في علب بتري تدل على أن تحت تأثير أي تركيز، النورفلورازون يفكك حيويا و يستعمل من طرف الريزوبيا كمصدر للكربون و الأزوت، حيث أنه لا يؤثر بطريقة مباشرة على البكتيريا و لكن على الحوار الجزيئي بين البكتيريا و النبات. **كلمات المفاتيح:** فازبوليس فولفارييس، نورفلورازون، توتر أكسيجيني، ريزوبيوم، قزنبوتيك، تعقد بكتيري.

Abstract:

The present work aims to contribute to a good understanding of the bleaching herbicide (the norflurazon) action modes, when it is applied at different doses on two varieties of bean seedlings (*Phaseolus vulgaris*) Terga and Coco de Prague .and also on rhizospherical environment.

The impact of norflurazon was evaluated at the morphological level (length of the shoot, leaf area, dry mass of roots and shoot) and at the physiological level by the determination of parameters relating to photosynthesis (pigments leaf, soluble sugars and starch) and also the degrees of peroxidation of cell membranes by the estimation of lipid peroxides and malondialdehyde.

The impact of the norflurazon is also evaluated at the rhizospherical level by counting nodules, fresh and dry mass of these nodules.

At the dose $1\mu\text{M}$, the effects of norflurazon on the bean seedlings is not very important, whereas, the doses $10\mu\text{M}$ and especially $100\mu\text{M}$ affect the plants' morphology (a partial photobleaching and reduction of different morphological parameters), and their physiology by reduction of the pigments leaf content, sugar and soluble starch.

At the cellular level, the herbicide increases the levels of lipid peroxides and malondialdehyde which means that there is a great deterioration of cellular membrane structures, and an acute oxidative stress.

Under the doses : $10\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$ of norflurazon, there are no nodules in the radicular system of seedlings.

The results obtained from the experiences using Petri bottles revealed that under any dose norflurazon has biodegraded and used as an energy source (carbon and azote) by bacteria of the genus *Rhizobium*. The norflurazon seems inhibitor of nodulation and does not affect directly the bacteria but on the molecular dialogue between bacteria and host plant.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, norflurazon, oxidative stress, rhizobium, xenobiotic.