

## **COMPORTEMENT DES PLANTULES DE COLZA *Brassica napus* EN PRESENCE D'UN BLEACHING HERBICIDE LE NORFLURAZON**

ABROUS-BELBACHIR O.<sup>(1)</sup>, BOULAHIA K.<sup>(1)</sup>,  
KHELIFA-BEGGAH N.<sup>(1)</sup> et BENHASSAINE-KESRI G.<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Laboratoire de Biologie et Physiologie des Organismes, Equipe de Physiologie Végétale, Faculté des sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumedienne, BP 39, El Alia, Bab Ezzouar, Alger, Algérie,

<sup>(2)</sup> Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire, Université Pierre et Marie Curie (UMR 7632 CNRS, Casier 156 - Le Raphaël, 3 Rue Galilée - 94200 Ivry sur Seine. France.

### **R E S U M E**

Des plantules de colza *Brassica napus* L. variété Eurol, sont traitées par un bleaching herbicide : le norflurazon à des doses de 10 $\mu$ M et 100 $\mu$ M.

Comparées aux plantules de colza témoins, les plantules traitées par la dose 10 $\mu$ M de norflurazon ne présentent pas de différences morphologiques ni du point de vue pigmentation, ni du point de vue taille. Les plantules traitées avec la dose 100 $\mu$ M par contre, sont de taille réduite et leurs feuilles sont soit partiellement soit totalement dépigmentées résultat d'une forte chute des pigments caroténoïdes et chlorophylles. Ces feuilles sont également appauvries en protéines et en lipides. En revanche, il est observé au niveau de ces feuilles une augmentation des hydroperoxydes d'acides gras signe d'un endommagement des lipides membranaires suite au stress oxydatif induit par l'herbicide. Les plantules de colza essayent de faire face à ce stress oxydatif en augmentant leur quantité d'anthocyanes produits du métabolisme secondaire à propriétés antioxydantes.

**Mots clefs** : colza, norflurazon, bleaching, stress oxydatif, peroxydation des lipides, anthocyanes.

## ABSTRACT

Plants of *Brassica napus* L. variety Eurol, are treated before sowing by a bleaching herbicide norflurazon 10µM and 100µM. In comparison with control plants, the treated plants with norflurazon 10µM did not show any differences neither on the morphology, nor in pigmentation or in growth.

Plants treated with norflurazon 100µM have a decreased size and their leaves are partially or totally bleached after a loss of carotenoids and chlorophyll pigments. These leaves contain also less reducing proteins and lipids. In contrary, an increase of hydroperoxydes of lipids resulting from oxidative stress engendered by the herbicide is observed in these leaves. The treated plants try to counteract the oxidative stress by enhancing the anthocyanins which are products of secondary metabolism involved in detoxification.

**Key words :** Rape, norflurazon, bleaching, oxidative stress, lipid peroxidation, anthocyanins.

## ملخص

تم معالجة شتلات الكولزا *Brassica napus* L. صنف Eurol بمبيد الأعشاب: نورفلورازون المسبب للبياض بتركيز 10 µM و 100 µM. مقارنة مع شتلات الشاهد، الشتلات التي عُولجت بتركيز 10 µM من النورفلورازون لم تبد أي تغيير في الشكل سواء من ناحية الطول أو الصبغة. في حين أظهرت الشتلات المعالجة بتركيز 100 µM نقص في الطول و فقدان جزئي أو كلي لصبغة الأوراق و ذلك نتيجة لإنخفاض محسوس في نسبة اليخضور و الجزرين.

من جهة أخرى، سُجل كذلك إنخفاض في نسبة البروتينات و الدسم، في حين إرتفعت نسبة إدروبروكسيدات الأحماض الدسمة كمؤشر لتلف الدسم الغشائية نتيجة للتوتر الأوكسيدي.

لمقاومة هذا التوتر الأوكسيدي تحاول شتلات الكولزا رفع نسبة الأنتوسيان ذي الخصائص المضادة للتأكسد و الناتج عن عملية الأيض الثانوي.

**مصطلحات مفتاحية :** كولزا، نورفلورازون، مبيض، توتر أوكسيدي، أكسدة الدسم، أنتوسيان .

## INTRODUCTION

Les herbicides sont des substances chimiques utilisées en agriculture pour lutter contre les adventices et augmenter ainsi le rendement. Toutefois l'utilisation des herbicides n'est pas restreinte à l'amélioration de la production végétale ; ces substances sont également employées en tant qu'outil biochimique en vue de préciser certaines étapes du métabolisme cellulaire c'est le cas du norflurazon, pyridazinone substitué, utilisé dans l'étude du métabolisme des caroténoïdes (BRAMLEY, 1994 ; Böger et SANDMANN, 1998) et celui des lipides (AËROUS *et al.*, 1998 ; Di BACCIO *et al.*, 2002).

Le norflurazon 4 chloro, 5 méthyl amino 2,  $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$  trifluorométhyl phényl 3- (2H) pyridazinone appelé encore San 9789 est un bleaching herbicide qui bloque la synthèse des caroténoïdes en agissant en tant qu'inhibiteur non compétitif de la phytoène désaturase (SANDMANN et ALBRECHT, 1990), enzyme catalysant la désaturation du phytoène en phytofluène. Les caroténoïdes qui sont des composants essentiels des membranes des thylakoides sont non seulement impliqués 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 et /ou les molécules d'oxygène singulet (KNOX et DODGE, 1985). En bloquant la biosynthèse des caroténoïdes, le norflurazon réduit l'extinction des chlorophylles à l'état triplet (ayant accumulé un excès d'énergie). Il s'ensuit alors une augmentation de la production de molécules actives d'oxygène donc un stress oxydatif (JUNG *et al.*, 2001) pouvant endommager les composants cellulaires : protéines, acides nucléiques et lipides.

Les lipides et principalement leurs acides gras insaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par les molécules réactives d'oxygène plus particulièrement le radical hydroxyl ( $\text{OH}^\bullet$ ) ; celui-ci est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, ce qui aboutit à un réarrangement intramoléculaire des liaisons insaturées. Ce réarrangement conduit dans un premier temps à la formation d'un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxy formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (ESTERBAUER *et al.*, 1992). Ces hydroperoxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution : être réduits et neutralisés par des enzymes telles la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en d'autres molécules réactives : radical alkoxy ( $\text{LO}^\bullet$ ), aldéhydes (malondialdéhyde) ou encore en acides et alcanes (éthane, pentane, éthylène...). Les produits de la peroxydation particulièrement les aldéhydes peuvent diffuser à travers les membranes et

atteindre divers compartiments cellulaires, ils peuvent alors interagir avec les protéines et les acides nucléiques et perturber leur fonctionnement ou les détruire (MARNETT, 1999).

Il faut cependant rappeler que la peroxydation des lipides lorsqu'elle n'est pas induite par un phénomène exogène anormal, est un phénomène physiologique naturel qui intervient dans la dégradation de nombreux métabolites cellulaires (hormones, acides gras etc....).

Les plantes possèdent généralement des systèmes de nettoyage des formes actives d'oxygène (scavengers) parmi lesquels figurent les caroténoïdes et les flavonoïdes dont les anthocyanes. Les anthocyanes qui sont des composés du métabolisme secondaire sont impliqués dans les réponses à différents stress (CHALKER-SCOTT, 1999) dont le stress oxydatif (STRATIL et *al.*, 2006). Le présent travail s'inscrit dans l'optique d'une meilleure compréhension du comportement des plantules de colza soumises à un stress herbicide. En effet la compréhension du mode d'action des herbicides représente un élément dans la recherche du métabolisme des plantes ce qui a facilité et facilite encore leur application dans différentes pratiques agricoles.

## MATERIEL ET METHODES

Le norflurazon (San 9789) appartient à la famille des dérivés pyridaziniques ou pyridazinones. Sa formule chimique est le 4 chloro 5 méthyl amino 2  $\alpha,\alpha,\alpha$  trifluoro méthyl phényl 3-(2H) pyridazinone et sa masse moléculaire est de 303,7g. Il se présente sous la forme d'un solide blanc cristallin ou d'une poudre marron ; sa solubilité dans l'eau est de 28 mg.l<sup>-1</sup> à 23°C.

Il est efficace sur les graminées et un certain nombre de dicotylédones annuelles et bisannuelles (BESTE et HUMBERG, 1989) ; Il est utilisé dans le désherbage d'un certain nombre de plantes (soja, coton, arachide.....) et d'arbres fruitiers (abricotier, pêcher, poirier, pommier et prunier).

L'herbicide préparé en solution aqueuse est appliqué en pré-semis au niveau du sol avant la mise en terre des graines ou en pré-émergence avant la levée des plantules.

Il pénètre par les racines puis il est véhiculé par les vaisseaux du bois (herbicide systémique) jusqu'au niveau des feuilles où il agit ; c'est un herbicide d'application racinaire à action foliaire. Il est généralement utilisé à raison de 2000 g.ha<sup>-1</sup> (Dossier d'homologation INPV 1991).

Les graines de colza *Brassica napus* variété Eurol nous ont été fournies par la station agronomique Monsanto France. Après stérilisation à l'eau de Javel (hypochlorite de sodium) pendant 10 minutes puis plusieurs rinçages à l'eau distillée, les graines sont mises à imbiber pendant 3 heures dans l'eau.

Elles sont ensuite mises à germer dans des pots remplis de terre. Les pots correspondant aux témoins sont arrosés avec de l'eau, ceux correspondant aux essais sont arrosés avec les solutions herbicides à des concentrations de 10 $\mu$ M (dose considérée comme faible car n'entraînant pas d'effets morphologiques apparents) et 100 $\mu$ M dose forte provoquant le blanchissement (bleaching) des plantules et correspondant à la dose appliquée au champ.

Par la suite les lots témoins et les lots essais sont arrosés avec de l'eau. La croissance a lieu dans les conditions du laboratoire. Les expérimentations réalisées sur les feuilles ont nécessité des plantules âgées de 4 à 5 semaines, à ce stade les plantules ont développé 3 à 4 feuilles. Toutes les analyses sont le résultat de trois expérimentations différentes.

## 1. EXTRACTION ET DOSAGE DES PIGMENTS FOLIAIRES

Les pigments foliaires sont extraits (à partir d'une feuille) dans l'acétone à 80% et les teneurs en chlorophylles totales et en caroténoïdes sont déterminées selon les formules de LICHTENTHALER (1987).

## 2. DOSAGE DES HYDROPEROXYDES DE LIPIDES

Les hydroperoxydes de lipides sont des produits intermédiaires instables qui sont formés suite au stress oxydatif et qui sont rapidement dégradés pour donner des composés hydroxylés et carbonylés.

Le dosage des hydroperoxydes des acides gras est effectué par spectrophotométrie sur des extraits lipidiques de feuilles de plantules de colza témoins et traitées par le norflurazon. La méthode au thiocyanate de fer (SHANTA et DECKER, 1994), repose sur l'oxydation en milieu acide des ions ferreux ( $Fe^{2+}$ ) en ions ferriques ( $Fe^{3+}$ ) par les hydroperoxydes de l'échantillon suivie d'une mesure spectrophotométrique à 480 nm du complexe formé entre les ions ferriques et le thiocyanate (complexe ferrithiocyanique). Cette méthode requiert une extraction préalable des lipides. Au moment du dosage, 350 $\mu$ l d'extrait lipidique, 1 ml de d'éthanol absolu, 100 $\mu$ l d'HCl (1N) et 100 $\mu$ l d'une solution d'ammonium ferreux (1%) sont mélangés; après 30 secondes, 500 $\mu$ l de thiocyanate d'ammonium (20%) sont ajoutés. La lecture est faite après 3 min. Un blanc est réalisé en remplaçant l'extrait lipidique par du chloroforme. Les résultats sont donnés en  $\Delta_{DO}$  à 480 nm.

### 3. EXTRACTION DES LIPIDES FOLIAIRES

Après fixation des feuilles (1g) dans l'eau bouillante pendant 3 à 5 minutes, les lipides sont extraits dans un mélange méthanol : chloroforme : eau (1 : 1 : 1, v/v/v) (BLIGH et DYER, 1959). Une quantité aliquote des lipides totaux est méthylée (METCALFE et al., 1966) en présence d'un témoin interne l'acide heptadécanoïque (C<sub>17:0</sub>). Les esters méthyliques des acides gras sont séparés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire carbowax de 50 m x 0,32 mm.

### 4. EXTRACTION ET DOSAGE DES ANTHOCYANES

Le protocole repose sur l'hydrolyse acide des hétérosides du matériel végétal (BATH-SMITH, 1954 ; LEBRETON et al., 1967) ; il permet à la fois d'extraire et d'identifier les anthocyanes et les aglycones. Les anthocyanes sont obtenus après transformation en milieu acide des proanthocyanes natives correspondantes.

0.2 g de matériel végétal frais (feuilles) sont broyés à sec puis hydrolysés par 20 ml d'HCl 2N au bain marie bouillant avec insufflation d'air (fourniture d'oxygène) toutes les 10 min pour permettre l'oxydation des proanthocyanes en anthocyanes correspondants. Après refroidissement et filtration, le mélange est placé dans une ampoule à décanter en présence d'éther diéthylique (10 ml). Deux phases sont formées dont l'inférieure aqueuse ou hypophase contenant les anthocyanes, celle ci est récupérée, filtrée ; son volume est mesuré et les anthocyanes sont dosés au spectrophotomètre à 520 nm.

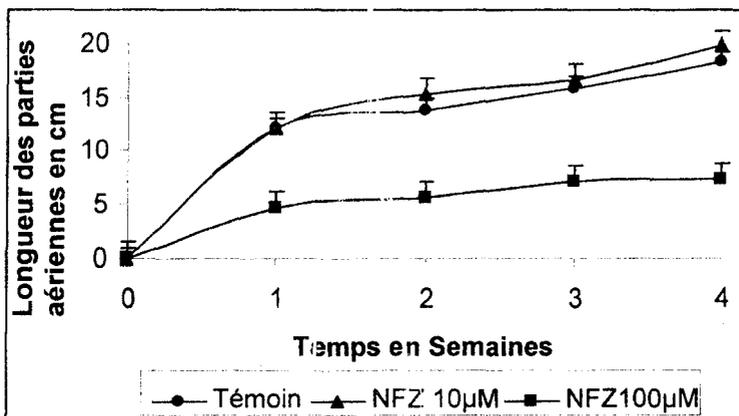
## RESULTATS

### 1. EFFET DU NORFLURAZON SUR LA MORPHOLOGIE DES PLANTULES DE COLZA

A la faible dose 10µM, le norflurazon ne semble pas avoir d'effets morphologiques apparents sur les plantules de colza ; ces dernières sont de taille sensiblement égale à celle des plantules témoins et les feuilles formées après le traitement sont vertes. Ces plantules évoluent pratiquement normalement et forment de nouvelles feuilles.

A la dose 100 $\mu$ M de norflurazon, deux phénotypes se manifestent : des plantules panachées mi vertes mi blanches et des plantules entièrement dépigmentées ou albinos. La dépigmentation démarre de la base des feuilles puis se propage au reste du limbe foliaire. Ce phénomène est qualifié de bleaching.

Ces plantules présentent également une réduction de leur taille ainsi que des signes de sénescence. Après quatre semaines de croissance, la taille de ces plantules est réduite de 58% comparativement aux plantules témoins (Figure 1).



**Figure 1** : Effet du norflurazon sur la croissance des parties aériennes des plantules de colza. (Les mesures ont été faites sur une moyenne de 10 individus).

Un grand nombre d'herbicides appliqués à des doses convenables sur des plantules entraînent un ralentissement de la croissance et du développement par rapport à un lot témoin cultivé dans les mêmes conditions. Ces plantes forment un nombre plus restreint de feuilles ; celles-ci sont plus petites et souvent dépigmentées (blanchâtres) ; les tiges et les racines sont également plus petites. Dans le cas du traitement par le norflurazon, la réduction de la taille résulte de la réduction de la photosynthèse engendrant une réduction voire une absence de photosynthétats et donc d'énergie découlant de l'absence de tissus verts.

## 2. EFFET DU NORFLURAZON SUR LA TENEUR EN PIGMENTS FOLIAIRES

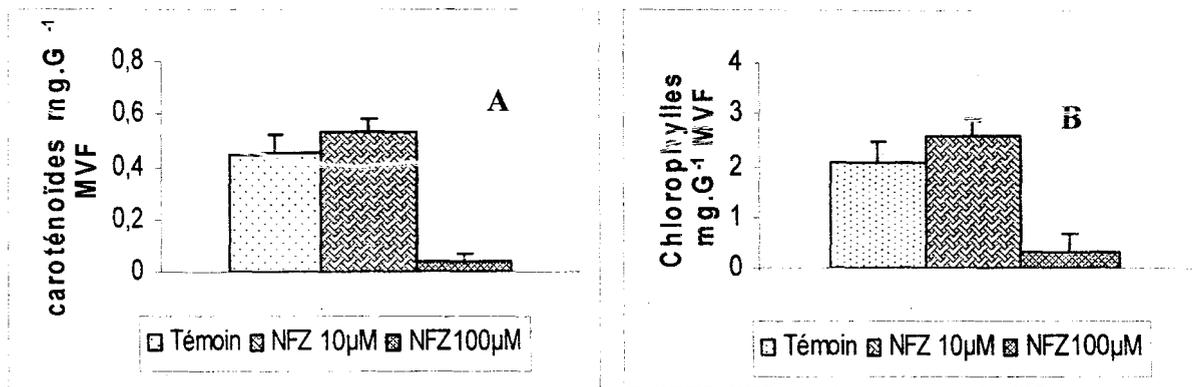
Les figures 2A et B, montrent les variations de la teneur en pigments foliaires caroténoïdes et chlorophylles engendrées par le norflurazon. Les plantules de colza traitées par la dose 10 $\mu$ M sont vertes ; le dosage des pigments caroténoïdes (figure 2A) et chlorophylles (figure 2B), révèle une certaine augmentation de ces derniers. La teneur en caroténoïdes est augmentée de 17% en effet, elle est de  $0.45 \pm 0.07 \text{ mg.g}^{-1}$  MVF dans les feuilles des plantules témoins, elle passe à  $0.53 \pm 0.05 \text{ mg.g}^{-1}$  MVF dans les feuilles des plantules traitées (figure 2 A) ; celle des chlorophylles passe de  $2.1 \pm 0.4 \text{ mg.g}^{-1}$  MVF dans les feuilles des plantules témoins à  $2.6 \pm 0.3 \text{ mg.g}^{-1}$  MVF dans les feuilles des plantules soumises à l'herbicide soit une augmentation de 23% (figure 2 B).

Sous l'effet de la dose 100 $\mu$ M, il est observé une disparition quasi totale des caroténoïdes :  $0.04 \pm 0.01 \text{ mg.g}^{-1}$  MVF soit 90% de réduction (figure 2 A) et des chlorophylles :  $0.3 \pm 0.04 \text{ mg.g}^{-1}$  MVF soit 86% de réduction (figure 2 B).

La chute des pigments occasionnée par le norflurazon est due à l'inhibition par le norflurazon de la synthèse des caroténoïdes suite au blocage de la phytoène désaturase (SANDMANN et ALBRECHT, 1990). La diminution de la teneur en chlorophylles est un processus secondaire : les caroténoïdes sont considérés comme des systèmes non enzymatiques scavengers des molécules actives d'oxygène (YOUNG, 1991); l'inhibition de leur biosynthèse exacerbe la formation des molécules actives d'oxygène notamment l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2^*$  (JUNG, 2004) engendrant ainsi un stress oxydatif sévère ; il s'ensuit un manque de protection des chlorophylles qui sont alors détruites par photooxydation. Par ailleurs, le norflurazon en provoquant la forte chute des pigments photosynthétiques entraîne également une disparition des transcrits d'un grand nombre de gènes codant pour les protéines chloroplastiques (YURINA et al., 2006), une décomposition des complexes protéines/pigments du PSII (GUSEINOVA et al., 2005) et une destruction des membranes des thylakoides (La ROCCA et al., 2004).

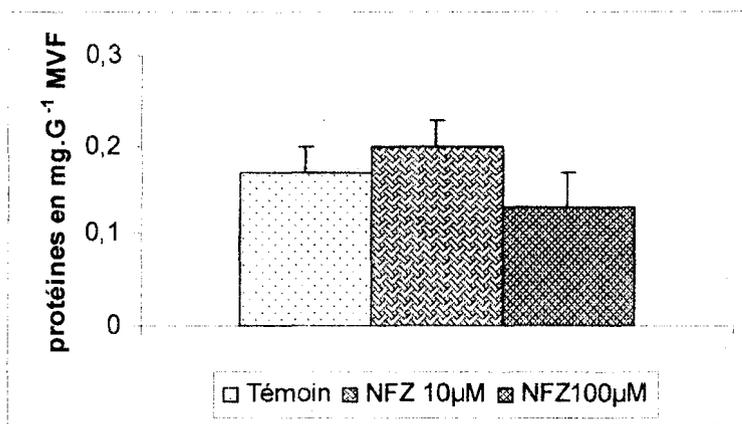
## 3. EFFET DU NORFLURAZON SUR LA TENEUR EN PROTEINES FOLIAIRES

La teneur en protéines des feuilles témoins est de  $0.17 \pm 0.02 \text{ mg.g}^{-1}$  MVF (Figure 3), chez les plantules traitées avec la dose 10 $\mu$ M, cette teneur augmente légèrement à  $0.19 \pm 0.03 \text{ mg.g}^{-1}$  MVF, soit une augmentation de 12 %; au contraire elle diminue à  $0.14 \pm 0.01$  sous l'effet de la dose 100 $\mu$ M



**Figure 2** : Effet du norflurazon sur la teneur en caroténoïdes (A) et en chlorophylles (B) des feuilles de colza. (Chaque valeur est la moyenne de trois expérimentations différentes).

soit une réduction de 18%, ce qui se reflète au niveau de la taille des feuilles qui sont plus réduites comparativement aux témoins. La diminution des protéines foliaires peut résulter d'une part de la réduction de leur biosynthèse et d'autre part de leur destruction vu que le norflurazon accélère la sénescence des plantules fortement dépigmentées.

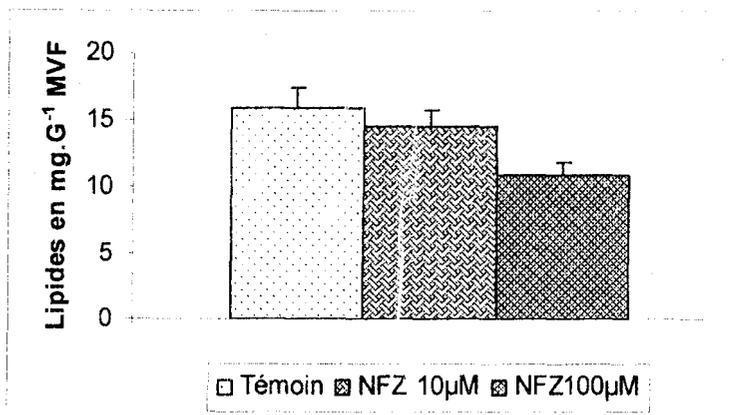


**Figure 3 :** Effet du norflurazon sur la teneur en protéines des feuilles de colza. (Chaque valeur est la moyenne de trois expérimentations différentes).

#### 4. EFFET DU NORFLURAZON SUR LA TENEUR EN LIPIDES TOTAUX

La teneur en lipides totaux est évaluée à partir du niveau des acides gras totaux. Comme le montre la (figure 4), la masse des lipides totaux des feuilles de plantules de colza varie très peu sous l'effet de la dose 10 µM. La dose 100µM par contre affecte les lipides totaux dont la masse accuse une baisse de 32% par rapport aux plantules témoins. En effet la teneur en lipides totaux qui est de  $15.95 \pm 1.4$  mg.g<sup>-1</sup> MVF dans les feuilles des plantules témoins diminue à  $10.85 \pm 0.9$  mg.g<sup>-1</sup> MVF dans les feuilles des plantules traitées.

La réduction des lipides totaux peut découler de l'inhibition de leur biosynthèse sous l'effet de l'herbicide et/ou de l'accélération de leur dégradation.



**Figure 4 :** Effet du norflurazon sur la teneur en lipides totaux des feuilles de colza. (Chaque valeur est la moyenne de trois expérimentations différentes).

Une réduction de la masse des lipides totaux a déjà été rapportée par WILLEMOT (1977) dans les racines de plantules de blé traitées par le BASF 13338 ou San 9785 et par Di BACCIO et *al.*, (2002) dans les étiooplastes de feuilles d'orge traitées par le norflurazon. De même que ABROUS et *al.*, (1998) ont obtenu une réduction de près de 50% de la masse des lipides totaux dans les feuilles de plantules de soja traitées par le norflurazon.

Par ailleurs RAJASEKHARAN et SASTRY, (1987), ont observé une inhibition de l'acide gras synthétase par cinq pyridazinones substitués dans les feuilles d'*Arachis hypogea*.

L'effet exercé par le norflurazon sur les lipides n'est pas un phénomène secondaire résultant de son action sur les pigments ; il s'agit d'une action directe car d'une part, le même effet a été observé sur les lipides des tissus non photosynthétiques tels que les racines (St JOHN, 1982) d'autre part, des herbicides de la famille des pyridazinones tels le BASF 13338 qui n'est pas un bleaching herbicide affecte le métabolisme des lipides (NORMAN et St JOHN, 1987).

Du point de vue composition en acides gras, les lipides totaux des feuilles de colza (Tableau I), sont riches en acides gras insaturés : linoléique (17.52%), linoléique (47.71%) et hexadécatriénoïque (11.55%). L'acide palmitique représente 11.3% des acides gras totaux.

La présence de l'acide hexadécatriénoïque (C16 :3) fait que le colza est une plante qui appartient au groupe de végétaux dits de type C16 :3.

En fonction des voies de désaturation des acides gras composant leurs glycolipides, les végétaux sont divisés en deux types distincts (ROUGHAN et SLACK, 1982) : ceux qui ne désaturent que les acides gras à 18 atomes de carbones (acide stéarique et ses dérivés) par la voie coopérative plaste-réticulum endoplasmique ou voie eucaryote formant les plantes dites en C18 :3 tels le soja, le pois, le haricot, le blé etc... et ceux qui possèdent une voie plastidiale supplémentaire ou procaryote qui désaturent l'acide palmitique et ses dérivés formant les plantes en C16 :3 tels l'arabidopsis, le colza, l'épinard etc.... Alors que les plantes en C18 :3 ne synthétisent que du monogalactosyldiacylglycérol ou MGDG, (lipide membranaire majoritaire des cellules végétales chlorophyllienne et lipide le plus abondant sur terre) de type eucaryote qui contient des espèces moléculaires 18/18 et 16/18, les plantes de type C16 :3 synthétisent du MGDG de type eucaryote mais aussi du MGDG de type procaryote contenant des espèces moléculaires 18/16.

Le tableau I, montre les remaniements provoqués par le norflurazon dans la composition en acides gras des lipides totaux des feuilles de colza.

**Tableau 1 :** Effet du norflurazon sur la composition en acides gras des lipides des feuilles de colza (les acides gras sont donnés en % des acides gras totaux).

Acides gras	Témoin	NFZ 10µM	NFZ 100µM
<b>C16:0</b>	14.14	15.10	12.48
<b>C16:1c</b>	0.25	0.15	1.32
<b>C16:1t</b>	1.24	2.45	3.21
<b>C16:2</b>	1.31	1.67	0.48
<b>C16:3</b>	11.55	13.67	3.83
<b>C18:0</b>	2.39	2.16	2.74
<b>C18:1</b>	7.89	4.15	25.57
<b>C18:2</b>	17.52	15.12	18.51
<b>C18:3</b>	43.71	45.40	31.85
<b>IDL</b>	<b>213.56</b>	<b>217.54</b>	<b>175.12</b>

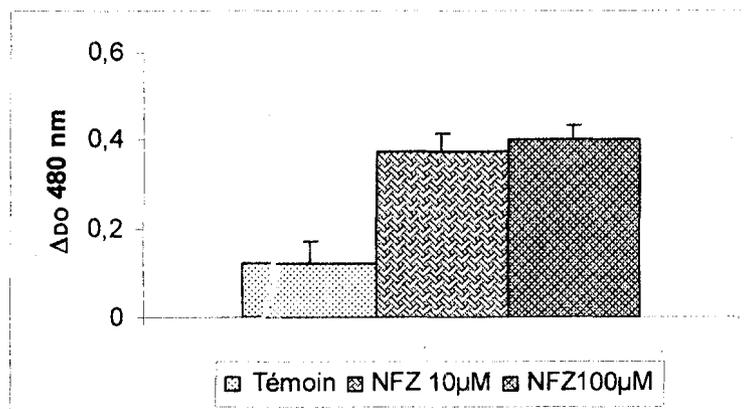
Sous l'effet du norflurazon 10 µM, une légère augmentation des taux des acides palmitique, trans hexadécénoïque, hexadécatrié-noïque et linolénoïque est observée. En présence de la dose 100 µM, une forte diminution du taux des acides hexadécadiénoïque et hexadécatriénoïque (64% de réduction) et de l'acide linolénoïque (26% de réduction) est observée, alors que les acides cis hexadécénoïque et oléique sont fortement augmentés ce qui traduit une inhibition de la désaturation des acides gras peu saturés en acides gras plus insaturés essentiellement la  $\Delta^3$  désaturase permettant la biosynthèse des acides triénoïques. Ceci est confirmé par le

calcul de l'indice de doubles liaisons ou IDL qui représente le nombre de doubles liaisons pour 100 acides gras ; en effet celui-ci est de 213.56 dans les plantules témoins, il augmente à 217.54 dans les plantules traitées par la dose 10  $\mu\text{M}$  suite à la légère augmentation des acides gras insaturés. Dans les plantules traitées par la dose 100 $\mu\text{M}$  l'IDL diminue à 175.12 en raison de la forte diminution des acides hexadécatriénoïque et linolénoïque. De nombreux travaux dont ceux de Norman et St John, (1987) et Di BACCIO et *al.*, (2002), ont rapporté une diminution du degrés d'insaturation des lipides foliaires sous l'effet des pyridazinones et plus particulièrement une réduction de l'acide linolénoïque suite à une inhibition de l' $\omega^3$  désaturase (ABROUS et *al.*, 1998).

## 5. EFFET DU NORFLURAZON SUR LA PEROXYDATION DES LIPIDES

La lipopéroxydation est le plus souvent définie comme une modification délétère conduisant à la modification structurale des complexes lipoprotéiques qui constituent les membranes biologiques. Celle ci peut être déclenchée par plusieurs facteurs dont les formes actives d'oxygène et les enzymes telles les lipoxygénases.

La figure 5, montre une augmentation par rapport au témoin des hydroperoxydes d'acides gras ; ces derniers sont en moyenne 3 fois plus élevés sous l'effet du norflurazon comparativement aux plantules témoins.

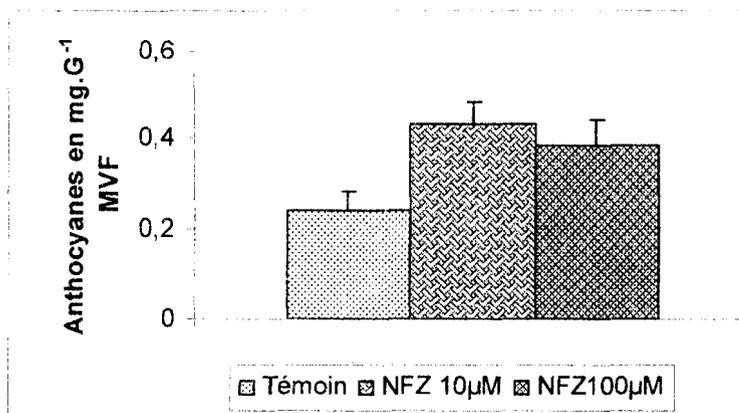


**Figure 5 :** Effet du norflurazon sur la teneur en hydroperoxydes de lipides des feuilles de colza. (Chaque valeur est la moyenne de trois expérimentations différentes).

Une activation des voies de peroxydation des acides gras en réponse à différents stress a été rapportée par MONTILLET *et al.*, (2004) dont le stress herbicide (KUNERT et BOGER, 1984).

## 6. EFFET DU NORFLURAZON SUR LA TENEUR EN ANTHOCYANES

Les plantules de colza traitées par le norflurazon montrent une coloration violette au niveau de leurs tiges et pétioles ; cette coloration est due aux anthocyanes, produits du métabolisme secondaire synthétisés au niveau des feuilles. Le dosage des anthocyanes (figure 6), dans les feuilles des plantules traitées montre en effet une augmentation de ces composés sous l'effet de l'herbicide ; cette augmentation est de 75% et 50% respectivement pour les doses 10 $\mu$ M et 100 $\mu$ M.



**Figure 6 :** effet du norflurazon sur la teneur en anthocyanes des feuilles de colza. (Chaque valeur est la moyenne de trois expérimentations différentes).

De nombreux auteurs ont rapporté une élévation du niveau d'anthocyanes sous l'effet de divers stress biotiques (Richardson, 1981) ou abiotiques tels le stress osmotique (DUTT *et al.*, 1991), stress lumière ou températures extrêmes (CHRISTIE *et al.*, 1994) ou encore une carence en éléments minéraux (COBBINA et MILLER, 1987) signe de protection contre la photooxydation (HOCH *et al.*, 2001). En effet toutes les enzymes de la voie de biosynthèse de l'acide shikimique (précurseur principal de la synthèse des acides aminés aromatiques) sont fortement induites en réponse à une agression ou à une élicitation chez plusieurs plantes supérieures. Un rôle protecteur des anthocyanes en tant qu'écran solaire

(sunscreen) ou encore en tant que scavenger des formes actives d'oxygène a été suggéré par MERZLYAK et CHIVKUNIVA, (2000), JUNG, (2004) et STRATIL et *al.*, 2006.

## CONCLUSION

L'étude de l'effet du norflurazon sur les plantules de colza montre que cet effet est différent selon la dose appliquée.

Les plantules traitées par la dose 10  $\mu\text{M}$ , ne semblent pas affectées ni du point de vue morphologique ni du point de vue métabolique, au contraire, ces plantules semblent activer leur métabolisme pour faire face au traitement par l'herbicide : bien qu'il est observé une augmentation des hydroperoxydes d'acides gras (signe d'endommagement des lipides membranaires), ces plantules présentent une augmentation de tous les paramètres mesurés : chlorophylles totales, caroténoïdes, lipides et anthocyanes. Chez ces plantules, les moyens de défense semblent plus importants que les dommages occasionnés par l'herbicide.

Les plantules traitées par la dose 100 $\mu\text{M}$  de norflurazon, sont de deux phénotypes : elles sont soit partiellement dépigmentées (mi blanches mi vertes) soit totalement dépigmentées (blanches). Le dosage des pigments foliaires, montre en effet une très forte diminution des caroténoïdes et chlorophylles. Les feuilles ainsi blanchies ne reverdissent jamais. Les feuilles de ces plantules sont également appauvries en protéines et en lipides totaux ; en revanche il est observé une augmentation des peroxydes d'acides gras et des anthocyanes.

Le norflurazon en bloquant la phytoène désaturase (cible principale de cet herbicide), appauvrit les cellules foliaires en caroténoïdes qui sont non seulement des pigments accessoires dans la collecte de l'énergie lumineuse mais ils sont également des antioxydants, leur absence fait donc augmenter les formes actives d'oxygène lesquelles s'attaquent aux acides gras insaturés des lipides membranaires d'où l'augmentation des hydroperoxydes d'acides gras observée. La perturbation du métabolisme lipidique représente un problème complexe où effets directs et indirects s'entremêlent.

La diminution des lipides totaux observée peut découler de la modification du métabolisme général du végétal par réorientation de leur métabolisme carboné vers la synthèse de produits du métabolisme secondaire tels les anthocyanes ou de l'accélération de leur dégradation (péroxydation).

Chez les plantules traitées par la dose 100 $\mu$ M, les dommages semblent l'emporter sur les mécanismes de défense : certes il est noté une augmentation de la teneur en anthocyanes (produits impliqués dans les mécanismes de détoxification contre le stress oxydatif) mais en parallèle l'herbicide entraîne une disparition quasi-totale des chlorophylles et des caroténoïdes entraînant le bleaching des plantules, de même qu'il provoque une forte peroxydation des lipides foliaires suite au stress oxydatif induit ; les plantules finissent par dépérir.

L'action herbicide globale est toujours complexe et variable mais il existe des sites primaires d'action qui représentent des maillons fragiles de l'activité cellulaire (pour le norflurazon il s'agit de la synthèse des caroténoïdes et du métabolisme des lipides) dont le blocage peut entraîner à plus ou moins long terme et plus ou moins indirectement la réduction de la croissance du végétal voire même sa mort.

Les mécanismes de défense induits chez le végétal se caractérisent par un bouleversement du métabolisme. Il y a alors synthèse ou augmentation de la synthèse de molécules constitutives ou non de la plante pouvant entraîner des modifications morphologiques visant essentiellement à empêcher ou stopper les endommagements.

A la dose 10 $\mu$ M, les plantules de colza font face au stress chimique représenté par l'herbicide en effet les moyens de défense semblent plus importants que les dommages puisqu'il est noté une augmentation de pigments et des anthocyanes ; par contre pour la dose 100  $\mu$ M, bien qu'il est noté une augmentation de la teneur en anthocyanes les dommages causés par l'herbicide semblent l'emporter et les plantules finissent par dépérir.

Les observations effectuées sur les plantules de colza traitées par le norflurazon montrent que cette substance à la dose 100 $\mu$ M (dose appliquée généralement au champ) est toxique car la croissance et le métabolisme général s'en trouvent affectés.

Si l'on rapproche les effets morphologiques (blanchiment des feuilles) de la nette diminution des pigments foliaires, de la forte réduction des lipides chloroplastiques et de la complète désorganisation du système lamellaire révélés par divers auteurs (ABROUS *et al.*, 1998 ; Di BACCIO *et al.*, 2002) dans de nombreux tissus foliaires blanchis par le norflurazon, il apparaît dans l'ensemble qu'ils sont compatibles avec l'hypothèse d'un arrêt de développement normal des chloroplastes sous l'effet du norflurazon ce qui à long terme entraîne le dépérissement des plantules

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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.
- BATH-SMITH E.C. 1954 –** Leucoanthocyanidins formed leucoanthocyanins in plant tissues. *Biochem. J.*, **58**, 122-125
- BESTE C.E. et HUMBERG N.E., 1989.-** Herbicide Handbook of the weed Science Society of America. Sixth ed., *Weed Science of America*. Champaign, IL.
- BLIGH E.G. et DYER W.J. 1959.-** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.
- BÖGER P. et SANDMANN G., 1998.-** Carotenoid biosynthesis inhibitor herbicides- Mode of action and resistance mechanisms. *Pestic. Outlook*. **9**, 29-35.
- BRADFORD M.M., 1976.-** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, **7**, 248-254.
- BRAMLEY P.M., 1994.-** Carotenoid biosynthesis : a target site for bleaching herbicides. *Lipid Biochem. And Pestic Action*. **22**, 625-629.
- CHALKER-SCOTT L., 1999.-** Environmental significance of anthocyanins in plant stress response. *Photochem. Photobiol.* **70**, 1-9.
- CHRISTIE P.J., ALFENITO M.R. et WALBOT V., 1994.-** Impact of low temperature on general phenyl propanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*. **194**, 541-549.
- COBBINA J. et MILLER M.M., 1987.-** Purpling in maize hybrids is influenced by temperature and soil phosphorus. *Agronomy Journal*. **79**, 576-582.
- CUSEINOVA I.M., SULEIMANOV S.Y. et ALIYEV J.A., 2005.-** The effect of norflurazon on protein composition and chlorophyll organization in pigment-protein complex of photosystem II. *Photosynth. Res.*, **84**, 71-76.
- DALLA VECCHIA 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.

- DI BACCIO D., QUARTACCI M.F., DALLA VECCHIA 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.
- DUTT S.K., BAL A.R. et BANDYOPADHAY A.K., 1991.-** Salinity induced chemical changes in *Casuarina equisetifolia*. *Forest Egypt. J. Soil Sci.*, **31**, 57-63.
- ESTERBAUER H. , GEBICKI J. , PUHL H. And JURGENS G. , 1992.-** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.*, **13**, P. 341.
- HOCH W.A., ZELDIN E.L. et MC COWN B.H. 2001.-** Physiological significance of anthocyanins during autumnal leaf senescence. *Tree Physiology*. **21**, 1-8.
- JUNG S. Y., KERNODLE S.P., et SCANDALIES J.G., 2001.-** Differential antioxidant responses to norflurazon induced oxidative stress in maize. *Redox Rep.* **6** (5), 311-317.
- JUNG S., 2004.-** Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. *Plant Physiology and Biochemistry*. **42**, 225-231.
- KNOX J.P. et DODGE A.D., 1985.-** Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry*. **24**; 889-896.
- KUNERT , K. J. ET BOGER , P., 1984.-** The DPE herbicide oxyfluorfen : Action of antioxidants. *J. Agric. Food. Chem.* **32**, 725 – 728.
- LA ROCCA N., BARBATO R., BONORA A. DALLA VALLE L., DE FAVERI S. et RASCIO N., 2004.-** Thylakoid dismantling of damaged unfunctional chloroplasts modulates the Cab and RbcS gene expression in wheat leaves. *J. Photochem. Photobiol. B.*, **73**, 159-166.
- LICHTENTHALER H.K. 1987.-** Chlorophylls and carotenoids : Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methodes in Enzymology*. **148**, 350-382.
- MARNETT L.J., 2000.-** Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. **21**, 361-370.
- METCALFE L.D., SHMITZ A.A. et PELKA J.R., 1966.-** Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatography analysis. *Anal. Chem.*, **38**, 514-515.
- MERZLYAK M.N., CHIVKUNOVA O.B., 2000.-** Light stress induced pigment changes and evidence for anthocyanin photoprotection in apples. *J. Photochem. Photobiol. B.*, **55**, 155-163.

- MONTILLET J.L., CACAS J.L., GARNIER L., 2004.-** The upstream oxylipins profile of *Arabidopsis thaliana*: a tool to scan for oxidative stress. *The Plant Journal*, **40**, 439-451.
- NORMAN H.A et ST JOHN J.B., 1987.-** Differential effect of a substituted pyridazinone BASF 13 338 on pathways of monogalactosyldiacylglycerol synthesis. *Plant Physiol.*, **85**, 684-688.
- RAJASEKHARAN R. et SASTRY P.S., 1987.-** Effect of pyridazinone herbicides on lipid metabolism in groundnut (*Arachis hypogaea*) leaves. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **29**, 163-175.
- RICHARDSON P.M., 1981.-** Phytoalexin induction in Spinacia. *Biochem. Syst. Ecol.*, **9**, 105-107.
- ROUGHAN P.G. et SLACK C.R., 1982.-** Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 97-131
- SANDMANN G. et ALBRECHT M., 1990.-** Accumulation of colourless carotenes and derivatives during interaction of bleaching herbicides with phytoene desaturation. *Z. Naturforsch.*, **45**, 487-491.
- SHANTHA N.C. and DECKER E.A., 1994.-** Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, **77**, 421-424.
- STRATIL P., KLEJDUS B. and KUBAN V., 2006.-** Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 607-616.
- WILKINSON R.E. 1985.-** Carotenogenic inhibition by norflurazon in wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **23**, 370-375.
- YOUNG A.J., 1991.-** The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia Plantarum*, **83**, 702-708.
- YURINA N.P., POGULSKAYA E.N., et KARAPETYAN N.V., 2006.-** Effect of photodestruction of plastids from norflurazon treated barley seedlings on exoression of nuclear genes encoding chloroplast stress proteins. *Biochemistry*, **71**, 430-436.