

Impact du norflurazon sur une culture de blé dur

Rafika SOUALHI

Laboratoire de Biologie et Physiologie des Organismes, Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene Alger, Algérie

* Correspondance, courriel : soualhi.rafika@hotmail.fr

Résumé

Les progrès dans la protection des plantes avec l'utilisation de la lutte chimique ont largement contribué à l'augmentation des rendements et à la régularité de la production. Cependant l'utilisation systématique de ces produits chimique est remise en question, avec la prise de conscience croissante des risques qu'ils peuvent générer pour l'environnement, voir pour la santé de l'homme. Pour ce faire une étude sur le devenir d'un herbicide appelé le norflurazon a été réalisé sur une culture de blé dur en vue d'apporter des réponses à ces contraintes, l'analyse macroscopique traduite par une dépigmentation (photobleaching) des feuilles représente un indice irréfutable quant au transfert du norflurazon du sol vers la plantule. Les analyses par CPG constitue donc une confirmation et permet aussi une quantification. Celle-ci a été étayée par la cinétique de transfert du norflurazon qui a montré globalement qu'après seulement 6 jours de culture, l'état physiologique affecté, les racines des plantules semblent relarguer une quantité de norflurazon dans le sol.

Mots-clés : *norflurazon, herbicide, blé dur, photobleaching.*

Abstract

Impact of the norflurazon on durum wheat crops

The progress on the protection of plants by the use of chemical control has largely contributed to a yield increases and also to a regularity of the production. However the systematic use of these chemical products is put into question with a growing awariness of risks which they may create for the environment and also for human health. In order to do this, a study into the fate of an herbicide named Norflurazon was conducted on hard wheat production in order to give some responses to these constraints. Macroscopic analysis which has been reflected by a depigmentation (photobleaching) of leaves represent a sure sign of norflurazon's transfert from the soil into the plantule. GC analysis therefore constitutes a confirmation and enables also quantification. It is supported by kinetics of norflurazon's transfert wich shows that after 6 days of cultivation physiological state is affected, the roots of the seedlings seem to release a quantity of norflurazon in the soil.

Keywords : *norflurazon, herbicide, hard wheat, photobleaching.*

1. Introduction

De tout temps, l'Homme a tenté de préserver ses cultures et ses récoltes des fléaux (pestis en latin) que sont les insectes ravageurs et les maladies parasitaires et plus récemment à grande échelle, les plantes adventices qui sont parfois de redoutables concurrentes. Depuis la fin de la seconde Guerre mondiale, le développement prodigieux de la chimie organique de synthèse a entraîné l'utilisation croissante de la lutte chimique. Ce qui a eu pour conséquence une fabuleuse progression des rendements observés au cours des dernières décennies. En effet, la protection phytosanitaire contribue au maintien et au développement d'une agriculture intensive, à haut rendement et à qualité plus uniforme, au même titre que le choix et la sélection des variétés et le contrôle de la nutrition de la plante. Cependant, on prend conscience, depuis quelques années, que les pesticides n'agissent pas seulement contre la cible pour laquelle ils sont homologués, mais aussi sur l'ensemble de l'écosystème. Cette utilisation de produits pour lesquels des compromis sur la sécurité pour l'homme (et l'environnement) ont été considérés comme inévitables pose actuellement problème et leur impact a certainement été insuffisamment estimé. Les consommateurs, individuellement ou à travers les organisations de consommateurs, appréhendent les questions relatives à la qualité des produits tout autant au travers de l'ampleur de l'emploi de substances agrochimiques par les agriculteurs, que par rapport aux effets constatés sur les produits. Au regard de l'intensité de la lutte phytosanitaire, la présence éventuelle de résidus, si faible soit-elle, introduit la suspicion sur la qualité sanitaire des produits agricoles et alimentaires.

La crainte ne porte pas obligatoirement sur le risque toxicologique : elle se déplace sur la présence de résidus. Dans la rationalité du consommateur, cette crainte se justifie d'autant plus que ce consommateur ne dispose d'aucune information sur le niveau effectif de résidus dans les produits récoltés et mis en marché. Fondée sur le concept de *limite maximale de résidus*, la procédure d'homologation est susceptible de faire naître, ou en tous cas, de renforcer le doute quant à la qualité sanitaire du produit. Elle admet, en effet, comme envisageable, la présence de résidus et, en même temps, ne permet pas de donner une indication sur leur niveau exact. La seule information disponible est que quel que soit ce niveau, le risque toxicologique est nul, sous réserve que les pratiques agricoles réelles correspondent à celles supposées dans la procédure d'homologation [1]. L'objectif de ce travail est d'apporter en premier lieu des réponses à cette contrainte qui spéculent sur une éventuelle présence de ces résidus dans notre alimentation et à promouvoir une étude de leurs modes de transfert au niveau de la plante. Pour ce faire nous avons choisi comme sujet d'étude le Norflurazon herbicide phytotoxique ($C_{12}H_9ClF_3N_3O$) que nous avons testé sur le blé dur (*Triticum durum* var. Waha). Il s'agit en fait d'un herbicide qui inhibe la biosynthèse des caroténoïdes en bloquant l'enzyme clé « la phytoène désaturase » ; enzyme codée par le noyau. Il entraîne ainsi une déficience en chlorophylle par manque de protection par les caroténoïdes induisant le photobleaching [2, 3]. Le choix du blé est justifié par une consommation sans cesse croissante dans notre pays, puisqu'il représente la base de notre alimentation.

2. Méthodologie

Notre étude a été effectuée sur une plante monocotylédone, le blé dur « *Triticum durum* » qui est une plante herbacée annuelle, appartenant à la famille des Poacées. Les graines nous ont été fournies par l'ITGC (institut de technologie des grandes cultures), la variété utilisée est « Waha » produite dans la région de Médéa, Algérie. Le choix de cette espèce est dû au fait de sa bonne sensibilité à la plupart des herbicides et à sa rapidité de croissance. Les semences de blé dur ont été cultivées en pots dans les conditions de laboratoire. Le sol utilisé provient de la station ITGC de Oued Smar, Alger. Il est caractérisé par une forte teneur en argile, un pH voisin de la neutralité ainsi qu'une teneur en matière organique faible (1.5 %). Le norflurazon employé est d'origine suisse (SANDOZ) commercialisé sous le nom de « ZORIAL », appelé aussi

SAN-9789 est un produit agro pharmaceutique, phytosanitaire, inflammable appliqué en pré-semis [4]. Le traitement du sol s'effectue par ajout d'une solution de norflurazon. La quantité ajoutée dans chacun des pots est calculée sur la base de 1,6 Kg / hectare. Pour cela une solution mère de norflurazon de concentration 10^{-3} M est préparée et 2,11 ml de cette solution réparti dans chaque pot. Ce volume est déterminé pour avoir une dose équivalente à 1,6 Kg / ha. Les graines de blé dur (*Triticum durum var. Waha*) sont désinfectées dans de l'hypochlorite de sodium (5°) pendant 5 min, puis rincée plusieurs fois à l'eau distillée. Elles sont ensuite mises à germer dans des pots préalablement traité avec du norflurazon. Chaque pot contient 150 g de sol à raison de 50 graines par pot. Les pots sont arrosés tous les jours avec de l'eau distillée pour maintenir l'humidité à l'intérieur des pots (30 % de la capacité au champ). L'arrosage est réalisé de manière à compenser la perte de poids due à l'évaporation au quotidien. Les analyses ont porté sur la mise en évidence et la quantification de l'herbicide au niveau du végétal (plante + racine) ainsi qu'au niveau des sols traités (sol adhérent et sol rhizosphérique). Pour apprécier le devenir du norflurazon nous avons aussi tenté de réaliser une cinétique ; après 6 jours, 11 jours et 15 jours de culture.

2-1. Extraction à partir de la plante [5]

Le but de cette extraction est la mise en évidence et le dosage éventuel du norflurazon dans la plante. Elle est effectuée selon les étapes suivantes :

- Broyage : 5 g de matière végétale fraîche des plantules traitées sont broyées dans 50 ml de méthanol ;
- Sonification : le broyat est soumis aux ultrasons (43 KHZ) pendant 2 heures ;
- Filtration : la solution est filtrée en utilisant un papier filtre, on ajoute par la suite 50 ml de HCL à 1 % ;
- Lavage au chloroforme : la solution contenant l'herbicide est récupérée après deux lavages avec le chloroforme (2 x 10 ml) à l'aide d'une ampoule à décanter ;
- Evaporation sous vide : la solution obtenue est soumise à l'évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapor, et cela en vue d'obtenir un résidu brun, dépourvu d'humidité ;
- Ce résidu est dissout dans 1 à 2 ml de méthanol puis analysé par :
 - Chromatographie en phase gazeuse (CPG) ;
 - Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

2-2. Extraction à partir du sol [6]

Le but de cette extraction est la mise en évidence et le dosage éventuel du norflurazon dans le sol. Elle est effectuée selon les étapes suivantes :

- Agitation : 10 g de sol prélevés à partir de chaque pot sont soumis à l'agitation pendant 2 h et cela après avoir ajouté 20 mL de méthanol pour chaque échantillon prélevé ;
- Centrifugation : à 4000 tours / min, pendant 20 min ;
- Après centrifugation on récupère le surnageant à l'aide de micropipette ;
- On ajoute au surnageant récupéré : 50 mL d'eau distillée + 50 mL d'une solution contenant un mélange dichlorométhane et d'hexane (3 volumes / 7 volumes) ;
- Evaporation : les échantillons sont soumis ensuite à une évaporation sous vide et cela en vue d'obtenir un résidu ;
- Chaque résidu est dissout dans 1 à 2 mL d'acétate d'éthyle puis analysé par :
 - Chromatographie en phase gazeuse (CPG) ;
 - Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

2-3. Méthodes d'analyses

2-3-1. Analyse qualitative des extraits de sol et de végétal par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les échantillons à analyser sont dissous dans un solvant vaporisable n'ayant aucune affinité pour les matériaux qui constituent la colonne [7, 8].

Conditions opératoires

Tableau 1 : Conditions opératoires de la chromatographie en phase gazeuse

Marque de l'appareil	Gow-Mac série 600
Détecteur	FID
Gaz vecteur	Azote
Colonne	DB5
Température du détecteur	250°C
Température de l'injecteur	250°C
Programmation de température	40°C (2 min)- 5°C / min 275°C (5 min)
Debit de gaz vecteur (N ₂)	0.5 mL / min
Volume injecté	3 µL

2-3-2. Analyse qualitative et quantitative des extraits de sol et de végétal par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) [9]

Les conditions opératoires de la chromatographie liquide à haute performance est résumé dans le **Tableau** suivant :

Tableau 2 : Conditions opératoires de la chromatographie liquide à haute performance

Nom de l'appareil	Agilent série 1100
Phase mobile	Méthanol 80 % Eau 20 %
Phase stationnaire	Colonne type : ZORBAX® SB-C18 rapid resolution (150 mm. 4,6 mm, 3,5 µ)
Détecteur	DAD
Longueur d'onde	210 nm
Volume injecté	50 µL
Débit	1 mL / min

3. Résultats et discussion

3-1. Analyse macroscopique des plantes

La visualisation macroscopique du végétal après traitement au Norflurazon a donné les résultats suivants :

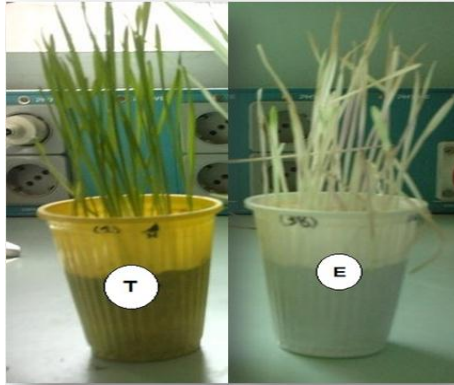


Figure 1 : *Observation macroscopique des plantules après 6 jours de culture (T : échantillon témoin, E : échantillon expérimental)*



Figure 2 : *Observation macroscopique des plantules après 11 jours de culture (T : échantillon témoin, E : échantillon expérimental)*



Figure 3 : *Observation macroscopique des plantules après 15 jours de culture (T : échantillon témoin, E : échantillon expérimental)*

On observe dès le quatrième jour un blanchiment net des plantules qui s'intensifie progressivement avec le temps (dépigmentation des feuilles ou photobleaching). Ceci est dû à la destruction de la chlorophylle résultant de l'interruption de la synthèse des caroténoïdes par le Norflurazon [10, 11].

3-2. Devenir du norflurazon dans une culture de blé dur en pots

3-2-1. Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Cette technique a été utilisée pour une évaluation qualitative. Les analyses des extraits ont montrés la présence du Norflurazon au niveau du végétal. Le temps de rétention du Norflurazon est de correspondant aux temps de rétention suivants : 39,946 min (6 jours après le traitement), 39,293 min (11 jours après le traitement), 40,260 min (15 jours après le traitement) et ceux correspondant au temps de rétention de l'étalon qui est de 40,956 min.

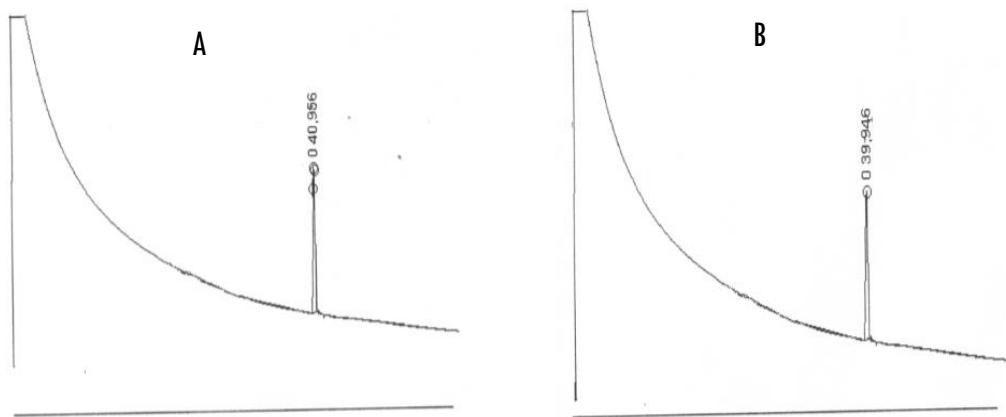


Figure 4 : Profils chromatographiques des extraits de blé dur établis par CPG
A : témoin norflurazon, B : 6 ème jour

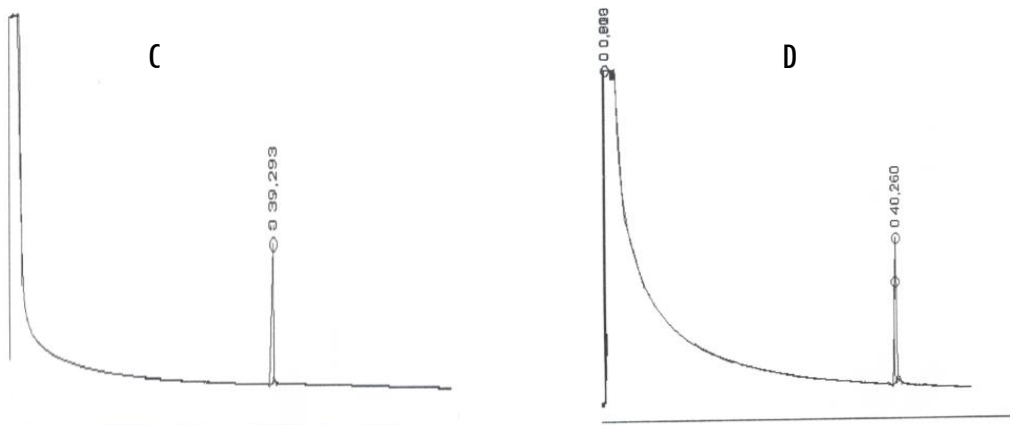


Figure 5 : Profils chromatographiques des extraits de blé dur établis par CPG
C : 11 ème jour, D : 15 ème jour

Les analyses qualitatives des extraits des sols adhérents ont montré la présence du norflurazon correspondant aux temps de rétention suivants : 40,263min (6 jours après le traitement), 40,080min (11 jours après le traitement), 40,370 min (15 jours après le traitement) et ceux correspondant au temps de rétention de l'étalon qui est de 40,956min.

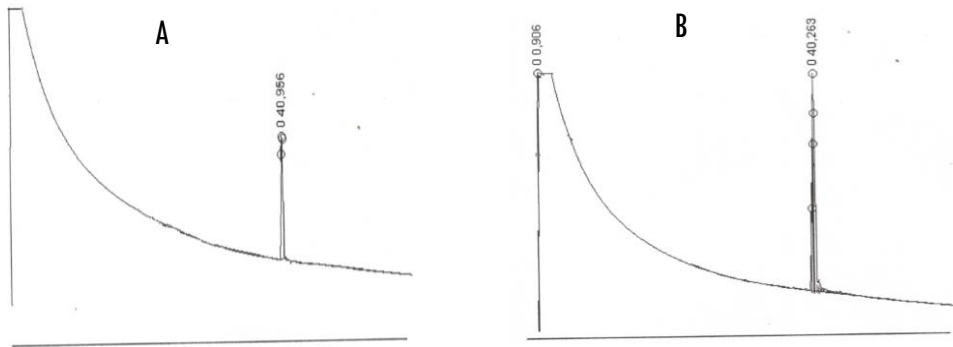


Figure 6 : Profils chromatographiques de l'extrait du sol adhérent aux racines de blé dur par CPG.
A : témoin Norflurazon, B : 6ème jours

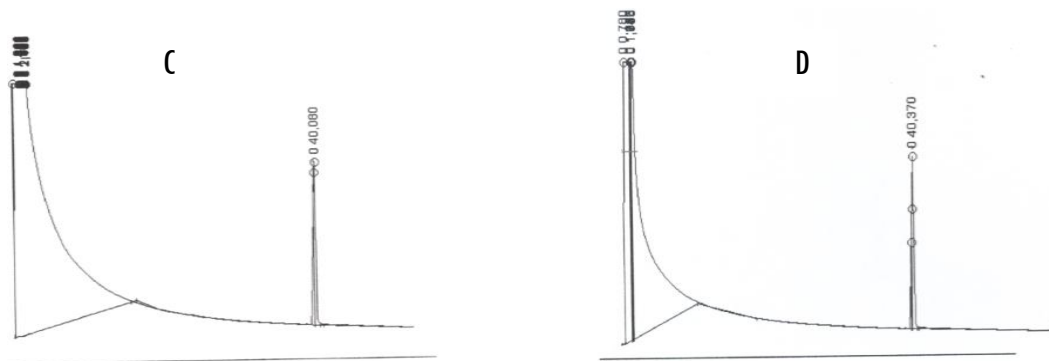


Figure 7 : Profils chromatographiques de l'extrait du sol adhérent aux racines de blé dur par CPG
C : 11ème jours, D : 15ème jours

Nous avons suivi l'évolution de la teneur en Norflurazon au niveau du sol adhérent ainsi qu'au niveau des plantules de blé dur. Cette expérience est réalisée pour apprécier les flux de Norflurazon du sol vers la plante. La variable temps a été ajoutée afin de réaliser une cinétique.

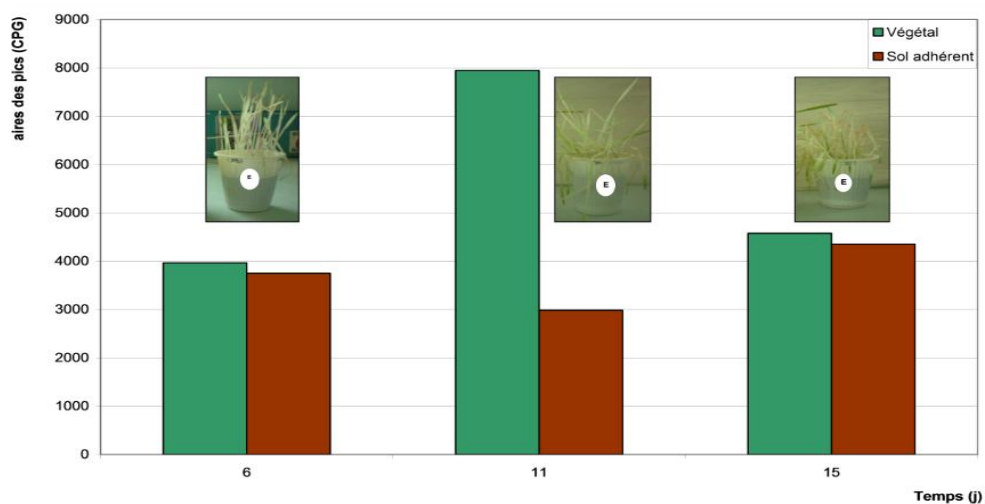


Figure 8 : Histogramme comparant l'évolution des teneurs en norflurazon dans le blé dur et dans le sol adhérent. Les photos permettent d'apprécier l'état physiologique du blé dur

Au niveau des plantules, on note une nette augmentation de la teneur en norflurazon entre le 6^{ème} jour et le 11^{ème} jour (2 fois plus de norflurazon au 11^{ème} jour qu'au 6^{ème} jour). Celle-ci diminue ensuite considérablement au 15^{ème} jour. Nous pouvons aussi noter l'effet du norflurazon sur les plantules de blé dur, qui se traduit par une dépigmentation des feuilles [12] comme indiqué sur les photos de la **Figure 8**. La présence du norflurazon dans la plante ne peut s'expliquer que par une absorption de l'herbicide à partir du sol et dont l'effet est le blanchiment des feuilles [13, 14]. En ce qui concerne la brusque diminution de la teneur en norflurazon au 15^{ème} jour, cela peut être expliqué soit par la dégradation de ce dernier en d'autres métabolites ou par un relargage de celui-ci vers le sol. Cette dernière hypothèse serait le résultat de la perturbation de la physiologie de la plante par une atteinte des racines qui laisseraient passer le norflurazon vers le sol rhizosphérique. Au niveau du sol la teneur en norflurazon enregistrée diminue à partir du 6^{ème} jour, il est à son niveau le plus bas au 11^{ème} jour, probablement en raison de l'absorption de l'herbicide par les plantules. Au 15^{ème} jour, cette teneur augmente dans le sol, ce qui confirmerait l'hypothèse d'un relargage du norflurazon par la plante.

3-2-2. Analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

- *Analyse qualitative :*

Les analyses par HPLC des extraits du végétal ont montré la présence du norflurazon correspondant aux temps de rétentions suivants : 1,112 min (6 jours après le traitement), 1,099 min (11 jours après le traitement), 1,088 min (15 jours après le traitement) ce qui est équivalent au temps de rétention de l'étalon qui est de 1,112 min.

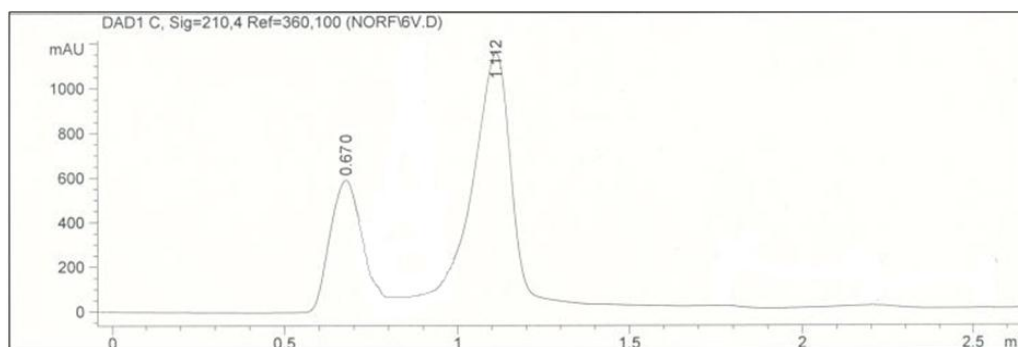


Figure 9 : Profils chromatographiques du témoin norflurazon par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

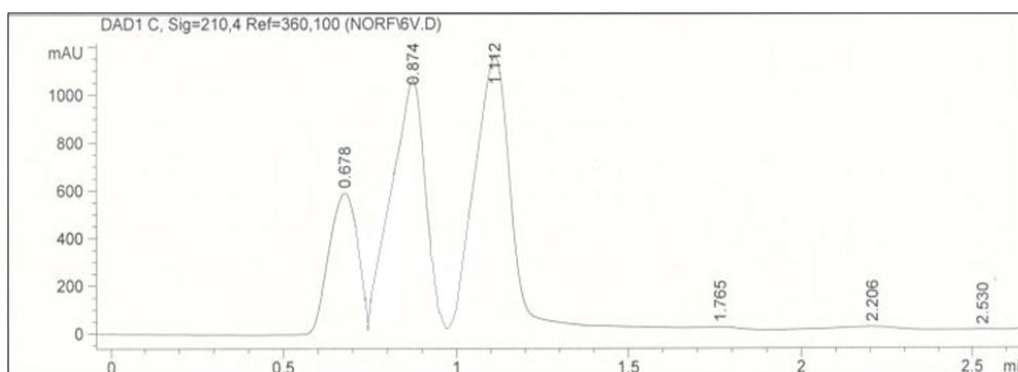


Figure 10 : Profils chromatographiques des extraits de culture de blé dur après le 6ème jour de culture par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

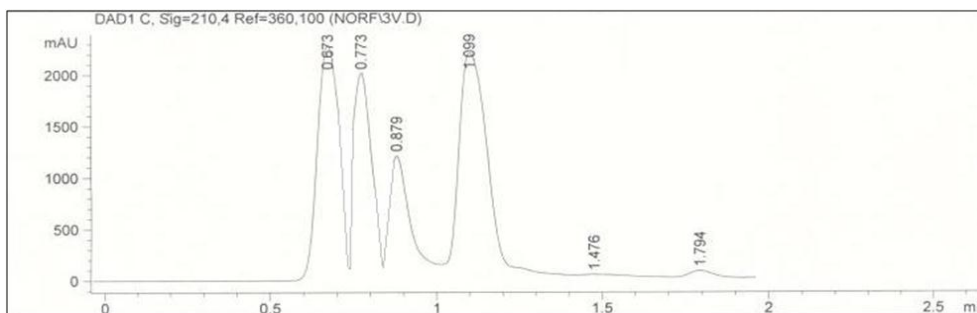


Figure 11 : *Profils chromatographiques des extraits de culture de blé dur après le 11ème jour par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)*

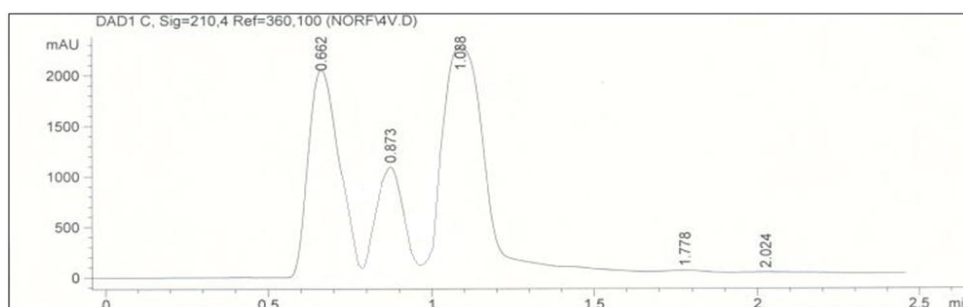


Figure 12 : *Profils chromatographiques des extraits de culture de blé dur après le 15ème jour de culture par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)*

Pour les sols l'analyse des extraits a montré la présence du norflurazon dans quelques échantillons ci-après :

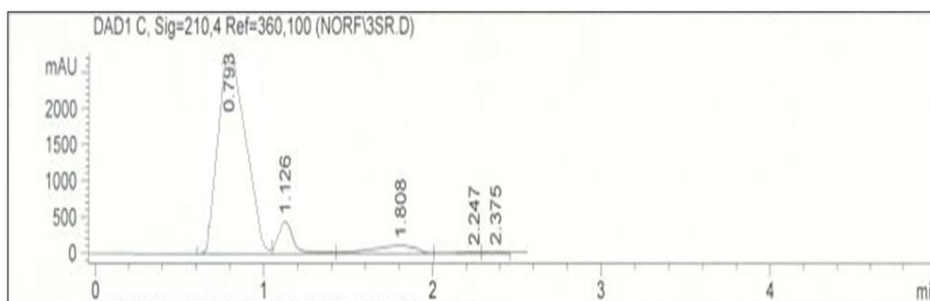


Figure 13 : *Profils chromatographiques d'un extrait du sol rizosphérique 11 jours après le traitement par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)*

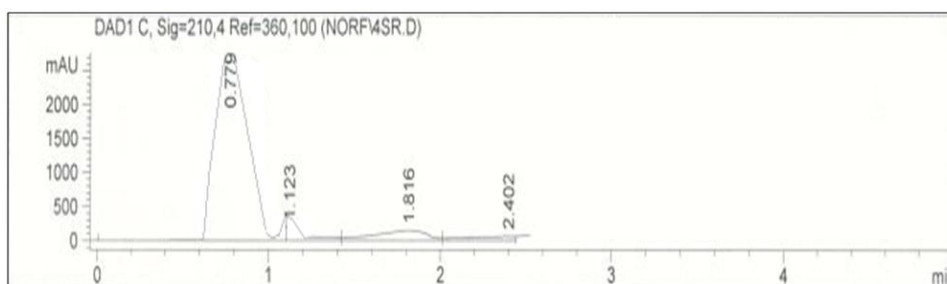


Figure 14 : *Profils chromatographiques d'un extrait du sol rizosphérique 15 jours après le traitement par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)*

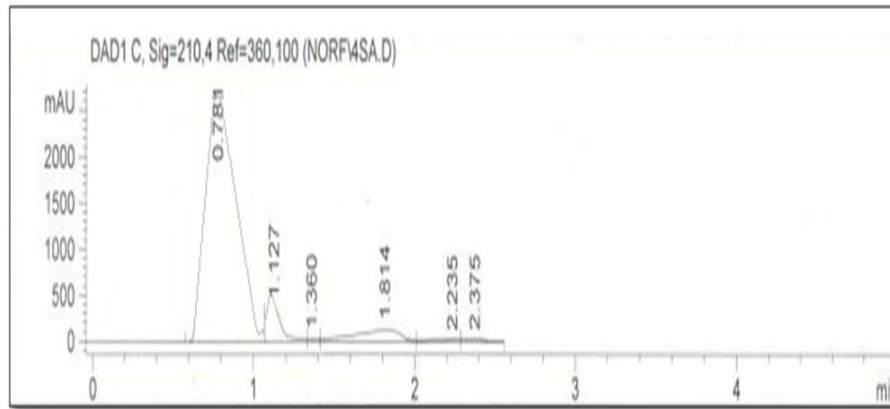


Figure 15 : Profils chromatographiques d'un extrait du sol adhérent 15 jours après le traitement par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

- *Analyse quantitative :*

On a déterminé les teneurs en norflurazon dans le blé dur, le sol rhizosphérique et le sol adhérent après 11 jours de culture. Les concentrations sont évaluées à partir de la courbe d'étalonnage suivante :

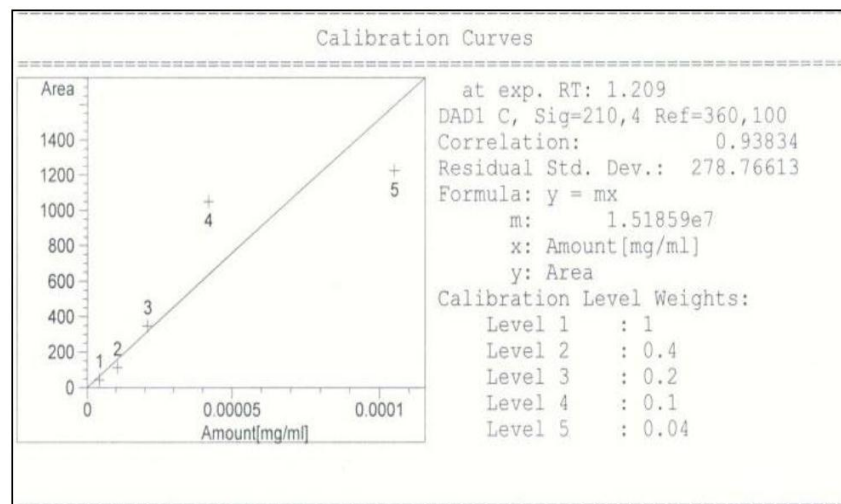


Figure 16 : Courbe d'étalonnage

Tableau 3 : Détermination de la teneur en norflurazon dans le blé dur, le sol rhizosphérique et le sol adhérent après 11 jours de culture

Compartiment	Aire de pic	Aire de pic	Concentration en mg / g de matière
Végétal	4352,9	4352,9	2,288
Sol rizosphérique	1642,0	1642,0	0,432
Sol adhérent	1277,8	1277,8	0,336

L'analyse quantitative par HPLC a donné des résultats similaires à ceux obtenus par CPG. En effet la concentration en herbicide qui est équivalente à 2,28 µg / g de matière végétale confirme l'absorption de ce dernier par la plante, de même que l'effet photobleaching observé au niveau des feuilles prouve le transfert du norflurazon du sol vers la plante.

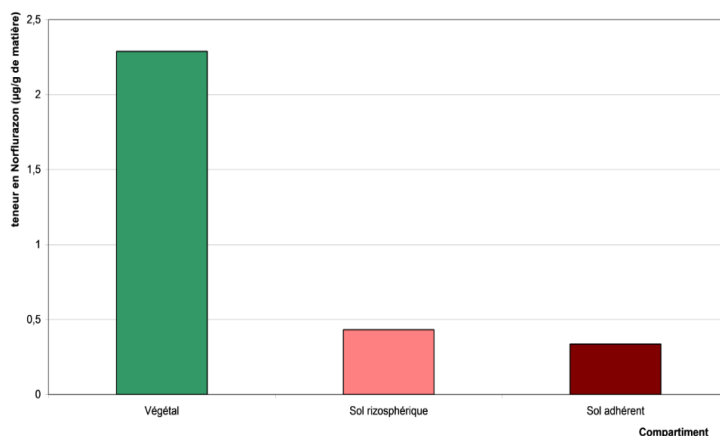


Figure 17 : Histogramme mettant en évidence la répartition du norflurazon dans les 3 compartiments (sol rizosphérique, sol adhérent et le blé dur)

L'histogramme présenté en **Figure 17** montre que les plantules de blé dur ont accumulé des quantités importantes de norflurazon (plus de 2 µg / g de matière végétale sèche). Ces valeurs obtenues au 11^{ème} jour indiquent que c'est durant les premiers stades de développement du végétal que l'absorption est importante. Dans le sol rizosphérique la teneur en norflurazon est moins importante, elle est estimée à 0,4 µg / g de sol, elle l'est encore moins dans le sol adhérent (0,3 µg / g de sol), sol au voisinage des racines et donc sous l'influence directe de la plante. A ce niveau de l'interprétation, nous pouvons émettre l'hypothèse suivante : la quantité de norflurazon contenue dans le sol adhérent est rapidement prélevée par la plante et il semblerait donc que la persistance du norflurazon est moins importante au niveau du sol adhérent que dans le reste du sol rizosphérique.

4. Conclusion

Nous avons testé tout au long de ce travail une étude sur le devenir du norflurazon dans une culture de blé dur en pot. Il apparaît que la chromatographie en phase gazeuse est la plus appropriée pour l'étude du norflurazon. D'autre part, cet herbicide a été mis en évidence au niveau des plantules de blé dur et au niveau du sol adhérent aux racines ainsi que dans le sol rizosphérique. En ce qui concerne le transfert du norflurazon du sol vers la plantule de blé dur, la dépigmentation des feuilles représente un indice irréfutable quant à ce transfert. L'analyse chimique du norflurazon dans la plantule de blé dur constitue donc une confirmation et permet aussi une quantification. Celle-ci a été étayée par la cinétique de transfert du norflurazon qui a montré globalement qu'après seulement 6 jours de culture, l'état physiologique des plantules de blé dur est atteint suite à une absorption importante de norflurazon. En effet, à ce stade affecté les racines des plantules semblent relarguer une quantité de norflurazon dans le sol.

Références

- [1] - A. VIALA, A. BOTTA, Toxicologie, 2^{ème} édition Lavoisier, (2005).
- [2] - J. M. DUCRUET, Les herbicides inhibiteurs du photosystème II. In Herbicides, mode d'action et principes d'utilisation, ed. R. Scalla, INRA, (1991).
- [3] - B. GODON & W. LOISEL, Guide Pratique d'analyses dans les industries des céréales. Lavoisier édit., collection Tec & Doc, Vol. 1, (1984) 686 p.

- [4] - ACTA, Index phytosanitaire. 52 ème édition, (2016).
- [5] - J. M. SCHNEIDERHEINZE, D. W. Armstrong, A. Berthod, Plant and soil enantioselective biodegradation of racemic phenoxyalkanoic herbicides. *Chirality*, 11 (1999) 330 - 337.
- [6] - G. D. KOUTSOULI, P. C. LOLAS, and G. TSIROPOULOS, Persistence and phytotoxicity of herbicide norflurazon in the field, (2004).
- [7] - P. KAMOUN, Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire, (1991) 147 p.
- [8] - J. TRANCHANT, Manuel pratique en chromatographie en phase gazeuse, 4ème Edition Masson, (1995).
- [9] - J. SHERMA, F. BERNARD, Handbook of thin-layer chromatography, (1991) 663 p.
- [10] - A. THOMAS, Norflurazon. Pesticide Synthesis Handbook, (1996) 522 p.
- [11] - W. MASSADA et al., Photodegradation of the herbicide Norflurazon sensitised by Riboflavin. A kinetic and mechanistic study, (2004).
- [12] - S. PANNEERSELVAM et al., Sonophotocatalytic mineralization of Norflurazon in aqueous environment. *Chemosphere*, Volume 146, (2016) 216 - 225 p.
- [13] - JAIME VILLAVERDE, Time-dependent sorption of norflurazon in four different soils : Use of β -cyclodextrin solutions for remediation of pesticide-contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*. Volume 142, Issues 1-2, 2, (2007) 184 - 190 p.
- [14] - B. KE SUNA et al, Assessment of herbicide sorption by biochars and organic matter associated with soil and sediment. *Environmental Pollution*. Volume 163, (April 2012) 167 - 173 p.