



**EFFETS ALLELOPATHIQUES
DES EXSUDATS RACINAIRES
DE CALOPOGONIUM MUCUNOIDES**

Cécile LANCE

Mémoire d'ingénieur
74^{ème} promotion

Mai 1995

ESAP

Ecole Supérieure d'Agriculture de Purpan

75, voie du TOEC
31076 TOULOUSE CEDEX

CIRAD

Centre de coopération Internationale
recherche agronomique pour le
développement

2477, avenue du Val de Montferrand
BP 5035
34032 MONTPELLIER CEDEX 1

**EFFETS ALLELOPATHIQUES
DES EXSUDATS RACINAIRES
DE CALOPOGONIUM MUCUNOIDES**

Cécile LANCE

Mémoire d'ingénieur
74 ème promotion

Mai 1995

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu mon maître de stage, Monsieur Marcel de Raissac, pour son suivi constant, sa disponibilité et sa bonne humeur.

Je remercie également Monsieur Marnotte qui a participé au bon déroulement de cette étude, ainsi que Monsieur Guard pour son aide lors des montages expérimentaux.

Merci à Monsieur Siband, pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité de Recherche Fonctionnement du Peuplement Végétal, ainsi qu'à toutes les personnes du CFRAD-CA dont la gentillesse a permis que ce stage se déroule dans les meilleures conditions possibles.

Merci aussi à Lise Roca, pour sa sympathique collaboration.

J'associe à ces remerciements toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire : Madame Durand et Mademoiselle Sautéras, de l'Université Scientifique et Technique du Languedoc, ainsi que Messieurs Piombo, Gros et Risterucci du CFRAD.

Je tiens également à remercier Monsieur Aussenac, professeur à l'ESAP, dont les précieux conseils m'ont guidée tout au long de la rédaction de ce mémoire.

Enfin je remercie mes parents pour le soutien qu'ils n'ont cessé de m'apporter durant ces cinq années d'études.

RESUME

Les phénomènes allélopathiques, qui correspondent à la libération de molécules ayant une action stimulante ou inhibitrice sur le développement des plantes voisines, jouent un rôle crucial dans le fonctionnement des écosystèmes naturels aussi bien que manipulés.

Cependant, sur le terrain, ils sont souvent difficiles à séparer des phénomènes de compétition pour les facteurs trophiques.

Nous nous sommes intéressés dans cette étude aux phénomènes allélopathiques du *Calopogonium mucunoides*, plante de couverture d'utilisation courante en Afrique et en Amérique latine.

Notre objectif était d'étudier si les exsudats racinaires de cette plante avaient un effet sur la croissance et la germination de certaines adventices et plantes de culture.

L'originalité de notre étude réside dans le fait que nous avons utilisé des exsudats en concentration naturelle, c'est à dire en conditions proches de la réalité agronomique, alors que les auteurs d'études sur l'allélopathie concentrent les exsudats avant de les tester.

En nous appuyant sur la bibliographie, nous avons mis au point une démarche expérimentale permettant de mettre en évidence d'éventuels effets allélopathiques.

Grâce à des tests de croissance conduits en serre, nous avons montré l'action des exsudats sur différentes plantes, notamment *Euphorbia heterophylla* et le riz.

Nous avons également pu avancer une hypothèse concernant le mode d'action des substances exsudées : celles-ci pourraient provoquer une baisse de l'absorption racinaire chez les plantes traitées. Nous proposons quelques expériences supplémentaires qui permettraient de vérifier cette hypothèse.

Les tests de germination que nous avons mis en place ne nous ont pas permis, quant à eux, d'observer une quelconque action des exsudats sur la germination des graines traitées.

Après avoir montré l'effet dépressif des exsudats sur la croissance de certaines plantes, nous avons tenté d'identifier dans ces derniers la présence de composés allélopathiques courants dans les exsudats racinaires de plantes, notamment les acides phénoliques.

Cette recherche biochimique nous a permis de conclure à l'absence de ces composés dans les exsudats de *calopogonium*.

Lors de ces analyses, nous nous sommes heurtés à certaines difficultés qui nous ont conduit à souligner l'importance de certaines manipulations préalables nécessaires à l'identification de composés, manipulations qu'il convient de mettre au point avant d'envisager la poursuite de ce travail biochimique.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

1° partie : Synthèse bibliographique sur l'allélopathie des exsudats racinaires

- I- Les phénomènes allélopathiques
- II- Les exsudats racinaires
- III- Allélopathie et exsudats racinaires : recensement des études menées

2° partie : Mise en évidence des phénomènes allélopathiques d'exsudats racinaires du calopogonium

- I- Matériel et méthodes
- II- Présentation des résultats
- III- Conclusion-discussion

3° partie : Recherche dans les exsudats de Calopogonium de quelques familles allélopathiques

- I- Premiers renseignements bibliographiques
- II- Recherche des acides phénoliques
- III- Recherche du ou des composés présents dans l'extrait méthanolique et réagissant avec le réactif Folin-ciocalteu
- IV- Conclusion-discussion

CONCLUSION GENERALE

INTRODUCTION

Au sein d'un peuplement hétérogène formé par une culture, une plante de couverture et des adventices, s'exercent de nombreuses interactions entre ces différentes composantes végétales.

Celles-ci se rapportent essentiellement à deux phénomènes : la compétition des plantes pour les facteurs trophiques du milieu (eau, éléments nutritifs ainsi que le CO₂ et les radiations), et l'allélopathie (qui correspond à la libération de molécules ayant une action stimulante ou inhibitrice sur le développement des plantes voisines).

L'utilisation de plantes de couverture a été introduite dans les systèmes de culture par des agronomes du CIRAD (Centre de Coopération International de Recherche Agronomique pour le Développement) (cf annexe 1), notamment au Brésil, en Côte d'Ivoire et à la Réunion.

Le rôle majeur de ces plantes de couverture est la protection du sol s'exerçant contre l'action érosive de l'eau ou du vent et contre le lessivage et l'entraînement en profondeur des éléments fertilisants. Une des propriétés importantes des plantes de couverture est leur rôle thermoprotecteur : elles limitent l'échauffement du sol. Le système racinaire de ces plantes augmente la capacité de rétention d'eau du sol, mais en saison sèche, elles risquent de concurrencer la culture principale.

Les observations de ces agronomes sur la capacité de ces plantes de couverture à maîtriser l'enherbement suggèrent des effets allélopathiques. Cependant, sur le terrain, il est impossible de faire la part de l'effet de la compétition et de celui de l'allélopathie.

C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris des travaux en conditions contrôlées, permettant d'analyser les seuls phénomènes allélopathiques, en l'absence de compétition trophique.

Nous avons décidé de nous intéresser au *Calopogonium mucunoides*, plante de couverture qui fait l'objet d'études au champ et d'une utilisation courante en Afrique et en Amérique latine.

Alors qu'habituellement, 4 voies d'émission de substances chimiques par les plantes sont admises (volatilisation, lessivage des parties aériennes, exsudation racinaire et décomposition de débris végétaux), nous nous sommes penchés pour notre part sur l'effet des exsudats racinaires sur la croissance et la germination de quelques plantes tests.

L'originalité de cette étude, par rapport à l'ensemble des travaux déjà entrepris sur l'allélopathie, réside dans le fait que nous avons utilisé dans tous nos tests des exsudats

racinaires en concentration naturelle. En effet, l'objectif était de nous placer dans des conditions proches de la réalité agronomique.

Enfin, après avoir mis en évidence des effets allélopathiques grâce à des tests de croissance et de germination, il nous a semblé intéressant de vérifier si les exsudats racinaires du *calopogonium* contenaient les composés allélopathiques les plus couramment recensés dans les exsudats racinaires (d'après la bibliographie).

En fait, cette partie biochimique doit être considérée comme une démarche préparatoire à la recherche biochimique de composés dans les exsudats avec comme principal objectif de mettre en évidence les multiples contraintes attachées à ce genre de prospective.

Pour la mise en place de cette étude, nous nous sommes très largement appuyés sur la bibliographie. C'est à partir de celle-ci que nous avons mis au point un dispositif de récolte d'exsudats racinaires et que nous avons défini les modalités des essais biologiques. L'étude bibliographique nous a également permis d'orienter notre recherche biochimique et nous a guidés dans le choix des outils analytiques à mettre en oeuvre.

La première partie de ce document correspond donc à une synthèse bibliographique : approche de l'allélopathie en termes généraux, des exsudats racinaires, et de l'allélopathie des exsudats racinaires plus particulièrement.

La deuxième partie concerne, la mise en évidence de phénomènes allélopathiques chez le *calopogonium* à l'aide de tests biologiques.

Enfin, un essai de recherche des composés allélopathiques courants dans les exsudats de *calopogonium* (composés susceptibles de jouer un rôle dans les effets allélopathiques observés) est présenté dans la troisième partie.

première partie :

**Synthèse bibliographique sur
l'allélopathie des exsudats racinaires**

1° partie : Synthèse bibliographique sur l'allélopathie des exsudats racinaires

Notre étude devait impérativement débiter par une recherche bibliographique. Il semblait important, en effet, de bien comprendre ce que l'on désigne sous le terme allélopathie, de mieux connaître les phénomènes qui lui sont associés et d'être conscient de l'importance de son rôle dans les écosystèmes.

De même, la connaissance des phénomènes d'exsudation était une condition nécessaire à la mise en place d'une étude mettant en jeu les exsudats racinaires du calopogonium.

Enfin, l'analyse des travaux déjà réalisés sur les phénomènes allélopathiques d'exsudats racinaires devait nous permettre de définir une démarche expérimentale la mieux adaptée possible.

I- LES PHENOMENES ALLELOPATHIQUES

1. Définition de l'allélopathie

Allelopathie dérive du grec *allelon*, "réciproque", et *pathos*, "souffrir", et signifie donc souffrance réciproque.

L'allélopathie est un très vieux composant des sciences agricoles. 300 ans avant J.C, THEOPHRASTUS écrit que le pois chiche épuise le sol et détruit les adventices. Avant ça, le philosophe grec Democritus a rapporté l'utilisation de produits naturels issus de plantes comme une méthode pratique de contrôle des adventices (RICE, 1984).

En 1937, MOLISCH (cité par RICE, 1984) inventa le terme allélopathie pour désigner les interactions biochimiques entre tous les types de plantes, micro-organismes inclus. Pour lui, le terme recouvrait à la fois les interactions biochimiques bénéfiques et nuisibles.

Depuis, CAUSSANEL (1975), a proposé la définition suivante : l'allélopathie est "l'ensemble des phénomènes qui sont dus à l'émission ou à la libération de substances organiques par divers organes végétaux vivants ou morts et qui s'expriment par l'inhibition ou la stimulation de la croissance des plantes se développant au voisinage de ces espèces ou leur succédant sur le même terrain".

En 1984, RICE donne la définition suivante : "l'allélopathie désigne tout effet direct ou indirect nuisible ou bénéfique d'une plante (micro-organisme inclus) sur une autre à travers la production de composés chimiques qui s'échappent dans l'environnement".

En 1955, GRUMMER classe les différents composés chimiques impliqués dans des phénomènes d'allélopathie en fonction de leur origine et des organismes affectés par leur action:

- les phytoncides sont des inhibiteurs produits par les végétaux supérieurs et actifs contre les micro-organismes.
- les marasmines sont produites par les micro-organismes et agissent contre les végétaux supérieurs.
- les cholines sont des inhibiteurs chimiques produites par les végétaux supérieurs agissant contre les végétaux supérieurs.
- les antibiotiques sont des substances chimiques produites par des micro-organismes agissant contre les micro-organismes.

2. Rôle de l'allélopathie dans les écosystèmes naturels et manipulés

Les interactions allélopathiques entre plantes jouent un rôle crucial dans le fonctionnement des écosystèmes naturels aussi bien que manipulés (RICE, 1984).

Durant la dernière décade un bon nombre de livres ont abordé l'allélopathie en détail (RICE, 1984 ; THOMPSON, 1985 ; PUTNAM et TANG, 1986).

Aussi, nous ne mentionnerons dans cette partie que les aspects majeurs de l'allélopathie.

a) répartition spatiale et succession

On a souvent pensé que la compétition était responsable de la répartition spatiale de la végétation. Cependant, il semble de plus en plus évident qu'à part la compétition, l'allélopathie joue un rôle important dans cette répartition (RICE, 1984).

Les découvertes de la recherche ont démontré que tous les types de plantes, c'est à dire plantes herbacées, arbustes et arbres affectent de façon allélopathique le type de végétation dans leur proche voisinage.

La succession est un autre phénomène écologique qui a été un sujet d'intérêt ces dernières années.

La majorité des chercheurs ont essayé d'expliquer ce phénomène en se basant sur les changements des facteurs physiques dans l'habitat, sur la disponibilité de minéraux essentiels et

sur la compétition, etc... mais en 1911 COWELS (cité par RICE, 1984) suggère que les toxines produites par les plantes peuvent agir comme un facteur important dans la succession de plantes.

b) allélopathie et agriculture

Un des aspects les plus étudiés de l'allélopathie dans les écosystèmes manipulés est celui qui s'applique à l'agriculture. Les effets des adventices sur les cultures, des cultures sur les adventices et des cultures sur les cultures sont invariablement soulignés dans tous les travaux sur l'allélopathie (EINHELLIG, 1984).

- effet des adventices sur les cultures

Les interférences provoquées par les adventices sont souvent dues à la fois à la compétition et à l'allélopathie, et les études sur le terrain ne séparent généralement pas ces facteurs. Cependant, un potentiel allélopathique a été rapporté pour plus de 70 espèces d'adventices, et la liste des interactions adventice-culture ne cesse de s'allonger.

Les rendements peuvent être fortement affectés par des pertes de production dues à ces adventices allélopathiques (EINHELLIG, 1984).

- interactions culture-culture

Les relations entre cultures concernent l'autotoxicité (inhibition qu'une plante exerce sur elle-même) et les effets qu'une culture peut avoir sur une culture différente (rotation culturale, résidus de culture). Ces derniers peuvent être à la fois stimulateurs ou inhibiteurs (EINHELLIG, 1984).

- inhibition d'adventices par les cultures

La capacité des cultures à maîtriser la croissance des adventices peut trouver une application immédiate pour la conduite culturale (EINHELLIG, 1984).

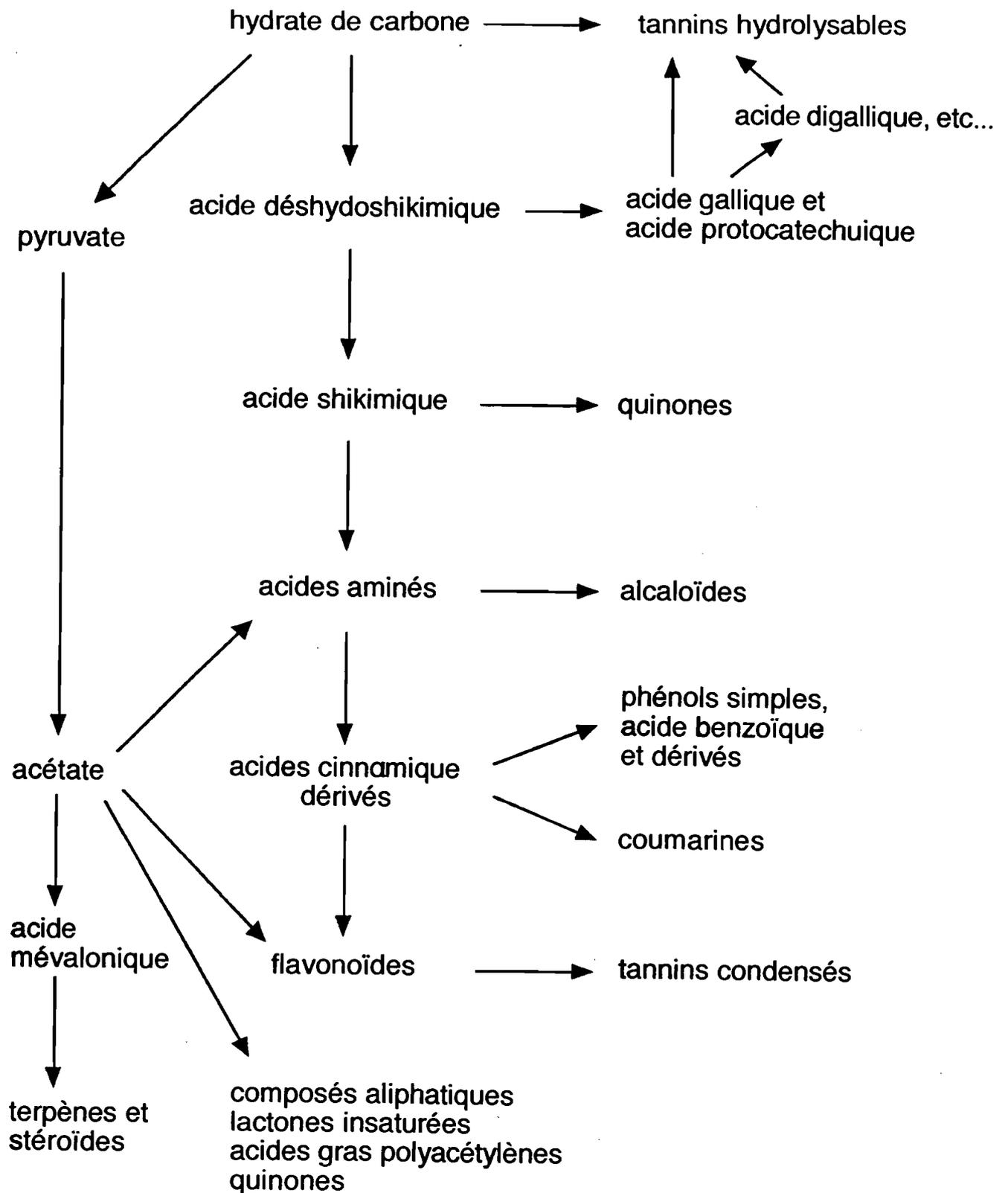


Figure 1 : voies probables de synthèse des différentes familles de composés allélopathiques (d'après Rice, 1984)

La connaissance de l'allélopathie et des fonctions des composés allélopathiques offre apparemment plusieurs possibilités intéressantes pour les pratiques agricoles (EINHELLIG, 1984).

L'espoir est que les stratégies exploitant l'allélopathie et les composés allélopathiques qui seront mises en place iront dans le sens d'une augmentation des rendements, une réduction des dépenses et dans le maintien d'une qualité de l'environnement.

Ces stratégies devraient inclure :

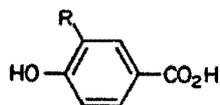
- une gestion des séquences des cultures (il est possible que les rotations de cultures soient utiles pour éviter les impacts négatifs des composés allélopathiques et capitaliser sur les aspects stimulateurs),
- l'utilisation des résidus de cultures,
- la sélection de cultures pour le contrôle des adventices (sélectionner des plantes capables de produire leurs propres herbicides),
- le développement de composés allélopathiques comme herbicides et régulateurs (EINHELLIG, 1984) et/ou pour minimiser les pertes agricoles dues aux insectes et nématodes, et contrôler les maladies (THOMPSON, 1985) (le plus grand avantage dans l'utilisation de composés allélopathiques repose dans le fait qu'étant facilement biodégradables, la plupart d'entre eux sont plus sûrs et plus propres pour l'environnement que les pesticides synthétiques couramment employés).

3. Nature chimique des composés allélopathiques

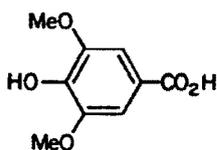
Les composés allélopathiques sont principalement des métabolites secondaires (RICE, 1984 ; MANDAVA, 1979). En effet, si les fonctions de ces métabolites secondaires n'ont, la plupart du temps, pas pu être déterminées, le rôle de certains d'entre eux est bien connu (RICE, 1974).

Alors que les métabolites primaires (sucres, acides aminés, acides organiques) ont une fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal (croissance, développement, source d'énergie), les métabolites secondaires n'ont pas de rôle visible dans le métabolisme ; ils participent surtout aux mécanismes de défense des plantes. Ils varient quantitativement et qualitativement durant le développement de la plante. Leur localisation est aussi très variable selon les espèces.

Les métabolites primaires et secondaires se différencient également par leur solubilité : les métabolites primaires sont des composés hydrophiles (exception faite des longues chaînes d'acides gras et leurs esters) alors que les métabolites secondaires sont généralement hydrophobes ou partiellement hydrophobes (TANG, 1986).

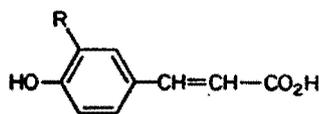


R = H, *p*-hydroxybenzoic acid
 R = OH, protocatechuic acid
 R = OMe, vanillic acid

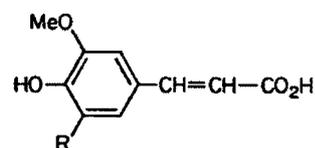


Syringic acid

Hydroxycinnamic acids

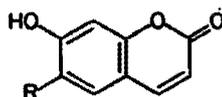


R = H, *p*-coumaric acid
 R = OH, caffeic acid



R = H, ferulic acid
 R = OMe, sinapic acid

Figure 2 : structure de quelques acides phénoliques (Harborne, 1984)



R = H, umbelliferone
 R = OH, aesculetin
 R = OMe, scopoletin

Figure 3 : structure de quelques coumarines (Harborne, 1984)

D'après ROBINSON (1983), la majorité des composés secondaires sont biosynthétisés à partir de l'acide acétique et de l'acide shikimique (figure 1 page précédente).

Plusieurs travaux (THOMPSON, 1985), ont permis de classer les inhibiteurs chimiques et plus particulièrement les cholines en différents groupes :

- les composés aromatiques
- les terpènes et stéroïdes
- les acides gras et polyacétylènes
- les lactones insaturées
- les composés aliphatiques

a) les composés aromatiques

Les phénols, les acides phénoliques, les dérivés de l'acide cinnamique, les coumarines, les flavonoïdes, les quinones et tannins forment le plus grand groupe des métabolites secondaires. Ils ont pour origine l'acide shikimique (ROBINSON, 1983) (cf figure 1). Ils sont souvent désignés sous le terme de "composés phénoliques" et ont souvent été considérés comme agents allélopathiques (RICE, 1974).

- les acides phénoliques

(figure 2)

Ils dérivent soit de l'acide benzoïque, soit de l'acide cinnamique (NEISH, 1964, cité par RICE, 1984 ; ROBINSON, 1983) (cf figure 1).

Ils sont largement répandus dans le règne végétal et sont connus pour avoir des propriétés allélopathiques (RICE, 1974 ; PUTNAM et TANG, 1986 ; EINHELLIG, 1984).

Ils sont présents en quantité suffisante dans les végétaux supérieurs pour inhiber la germination des graines et le développement des plantes (SCHREINER et REED, 1908, cités par RICE, 1984).

- les coumarines

(figure 3)

Elles dérivent de l'acide O-hydroxycinnamique (ROBINSON, 1983) (cf figure 1). Ce groupe contient les composés naturels végétaux les plus phytotoxiques et sont parmi les plus étudiés. NICOLLIER et THOMPSON (1982) (cités par FONTAR et THOMAS, 1987) ont montré que la coumarine est un inhibiteur de la germination plus puissant que tous les autres acides aromatiques.

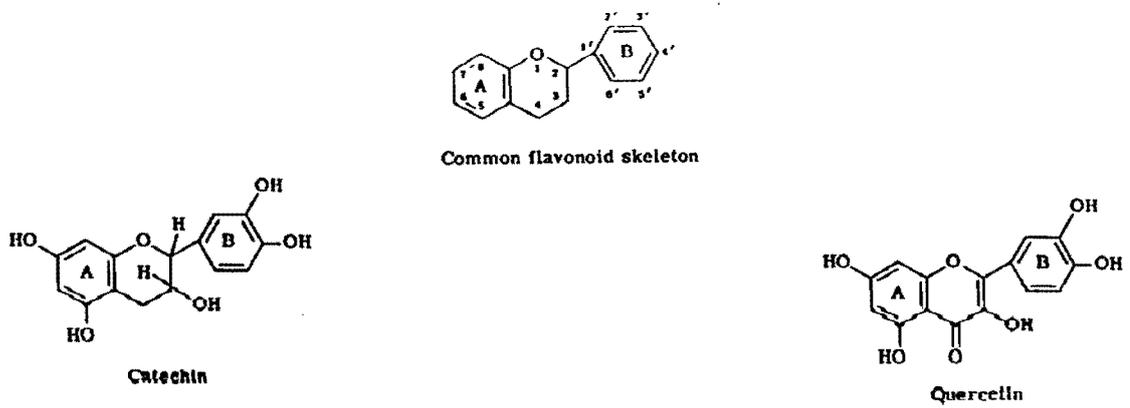


Figure 4 : structure de quelques flavonoïdes (Neish, 1964, cité par Rice, 1984)

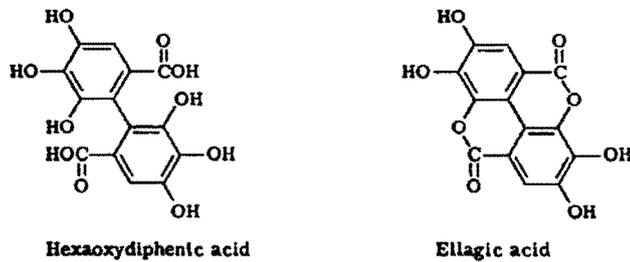


Figure 5 : structure de quelques composés acides de tannins hydrolysables (Robinson, 1983, cité par Rice, 1984)

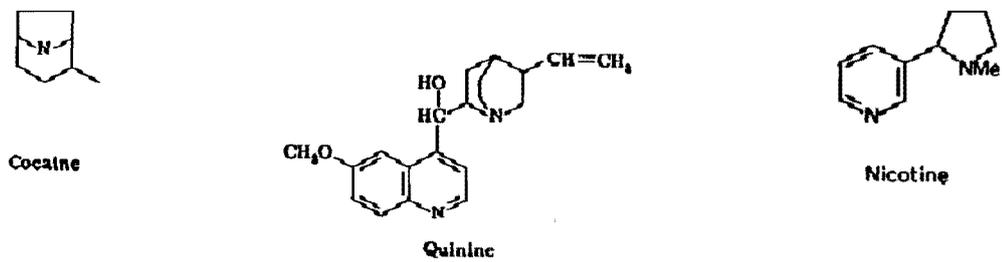


Figure 6 : structure de quelques alcaloïdes (Harborne, 1984 ; Rice, 1984)

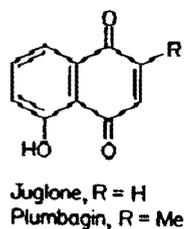


Figure 7 : structure de quelques quinones (Harborne, 1984)

- *les flavonoïdes*

(figure 4)

Les flavonoïdes sont à la fois issus de l'acétate et de l'acide shikimique (ROBINSON, 1983) (cf figure 1). La chaîne élémentaire des flavonoïdes est formée d'un groupe en C6 issu de l'acétate, et d'un groupe en C3 et un autre en C6 provenant de l'acide shikimique (NEISH, 1964, cité par RICE, 1974).

C'est un autre grand groupe de composés phénoliques et un certain nombre se sont avérés allélopathiques (THOMPSON, 1985).

Dans les tissus végétaux, les flavonoïdes sont généralement conjugués à des sucres (FONTAR et THOMAS, 1987).

- *les tannins*

(figure 5)

Ce sont des composés polyphénoliques solubles dans l'eau. Il existe des tannins hydrolysables et des tannins condensés, les deux formes étant connues pour posséder une activité allélopathique (RICE, 1974 ; EINHELLIG, 1984) (cf figure 1). Les tanins hydrolysables proviennent du deshydroshikimate alors que les tanins condensés ont comme origine les flavonoïdes (ROBINSON, 1983).

Ils inhibent la germination et/ou la croissance des plantes, et agissent au niveau du cycle de l'azote (RICE, 1974).

- *les alcaloïdes*

(figure 6)

Ils sont synthétisés à partir d'acides aminés (ROBINSON, 1983) (cf figure 1).

En fait, il n'y a pas de bonne définition d'un alcaloïde car il existe beaucoup d'exceptions. La plupart sont alcalins, contiennent un azote et un hétérocycle ; le précurseur essentiel est la tyrosine.

EVENARI (1949) a montré l'action inhibitrice des alcaloïdes sur la germination.

- *les quinones*

(figure 7)

Les quinones constituent une autre grande classe de composés phénoliques qui sont fréquemment trouvés dans les plantes.

Un exemple classique dans ce groupe est la juglone qui est connue comme un agent allélopathique (RICE, 1974 ; EINHELLIG, 1984).

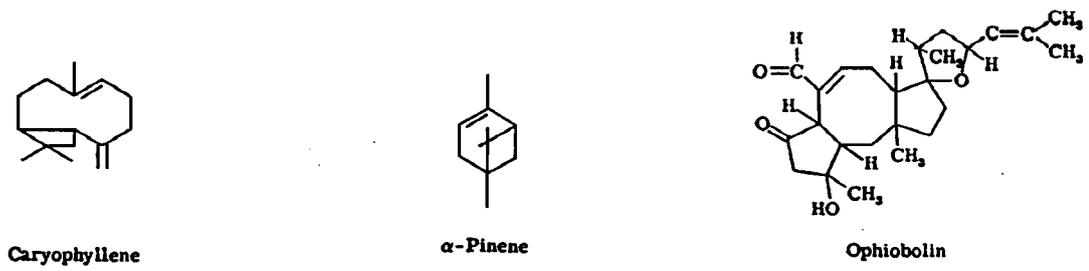


Figure 8 : structure de quelques terpènes et stéroïdes (Rice, 1984 ; Owens, 1969)



Figure 9 : structure de quelques lactones insaturées (Rice, 1984)

b) les terpènes et stéroïdes

(figure 8)

La voie de synthèse des terpènes et des stéroïdes est celle de l'acétate par le biais de l'acide mévalonique (ROBINSON, 1983) (cf figure 1).

Ces composés comprennent des unités d'isoprène assemblées en structures très différentes (FONTAR et THOMAS, 1987). Il existe un bon nombre de composés allélopathiques parmi les terpènes (MANDAVA, 1979).

c) les acides gras et polyacétylènes

Ils sont formés à partir de l'acétate (ROBINSON, 1983) (cf figure 1).

Bien que plusieurs acides gras, esters et alcools soient connus pour leur toxicité sur la croissance des plantes, leur rôle en allélopathie n'a pas été entièrement étudié (RICE, 1974).

d) les lactones insaturées

(figure 9)

Elles sont issues de l'acétate (ROBINSON, 1983) (cf figure 1).

La principale lactone identifiée comme un agent allélopathique est la patuline, produit par plusieurs *Penicillium* se développant sur le blé et d'autres plantes (RICE, 1974 ; MANDAVA, 1979).

e) Les composés aliphatiques

Ils sont issus de l'acétate (ROBINSON, 1983) (cf figure 1).

Plusieurs acides organiques et alcools simples solubles dans l'eau sont des constituants communs des plantes et du sol.

Ils inhibent la germination des graines ou la croissance des plantes. En conditions aérobiques, les acides aliphatiques sont métabolisés dans le sol et ne peuvent donc pas être considérés comme une source majeure d'activité allélopathique (FONTAR et THOMAS, 1987).

4. Mode d'émission des composés allélopathiques

L'émission de composés allélopathiques peut intervenir selon 4 modes (RICE, 1984) :

- la volatilisation

C'est l'exsudation de composés volatiles par les parties vivantes de la plante (tels que l'éthylène ou les terpènes).

- le lessivage

C'est l'entraînement dans le sol de substances excrétées par les tissus végétaux aériens qui intervient sous l'action de la pluie, de la rosée ou du brouillard.

- la décomposition de débris

La décomposition de parties mortes de plantes (litières à la surface du sol) peut libérer des toxines soit directement, soit par la décomposition résultant de l'action des microbes du sol.

- l'exsudation racinaire

L'appareil racinaire vivant et intact excrète une grande variété de composés chimiques.

5. Mécanismes d'action des composés allélopathiques

L'observation des effets des composés allélopathiques sur la croissance et le développement des plantes conduit les physiologistes à se questionner sur les modes d'action. Bien que les chercheurs s'intéressent de plus en plus à ce sujet, ils commencent à peine à déterminer les mécanismes par lesquels les différentes sortes de composés allélopathiques exercent leur action.

Comme le dit WINTER (1961) (cité par RICE, 1979), les effets visibles des composés allélopathiques sur les plantes ne sont que les signes secondaires de changements primaires. Donc, les effets des composés allélopathiques sur la germination et/ou la croissance ne sont que la manifestation d'effets primaires se déroulant au niveau moléculaire.

Les composés allélopathiques peuvent affecter les plantes directement ou indirectement. Le mode d'action direct inclut les effets des composés allélopathiques sur des aspects variés de la croissance de la plante et son métabolisme. Les effets indirects s'appliquent sur les organismes du cycle de l'azote, sur les champignons du sol et les résistances aux maladies (EINHELLIG, 1984).

RICE (1974), indique que les composés allélopathiques agissent sur *la division, l'élongation et l'ultrastructure cellulaire*. HORSLEY (1977) (cité par RICE, 1979) confirme ce phénomène en nous apprenant que la division cellulaire est inhibée par des composés allélopathiques variés.

La *croissance induite par les hormones*, notamment les auxines et les gibberellines peut être affectée par l'action des composés allélopathiques (RICE, 1974).

Ceux-ci agissent également sur *la perméabilité de la membrane cytoplasmique* (RICE, 1974). En 1969, OWENS déclare que la plupart du temps, le premier signe de dégâts causé par des phytotoxines produites par des pathogènes sur des cellules est une altération de la perméabilité pour l'eau et les ions de la membrane cytoplasmique.

Plusieurs composés allélopathiques inhibent la *photosynthèse* (RICE, 1974).

DEDONDER et VAN SUMERE (1971), VAN SUMERE et AL (1971), STENLID (1970) et DEMOS et AL (1975) démontrèrent l'action de différents composés allélopathiques sur la *respiration* de plusieurs plantes. La modification de l'activité respiratoire se fait à plusieurs niveaux : absorption d'oxygène, altération de l'activité enzymatique, production d'ATP et production de dioxyde de carbone.

Ils inhibent la *synthèse des protéines* et provoquent des changements dans le *métabolisme des lipides et des acides organiques* (RICE, 1974).

Les composés allélopathiques inhibent ou stimulent l'action d'*enzymes spécifiques* (RICE, 1974).

Les composés allélopathiques ont également des effets sur la *circulation des éléments du xylème* (ils peuvent provoquer la formation de "bouchons" dans les vaisseaux), sur le *transit de l'eau dans la tige*, et sur les *relations hydriques internes* (RICE, 1974 ; BOGDAN 1971 ; GRODZINSKY et BOGDAN, 1972, 1973 , cités par RICE, 1984 ; BOGDAN et GRODZINSKY, 1974). VAN ALFEN et TURNER (1975) déclarent que la réduction du transit dans la tige explique le mieux dans leurs essais la baisse rapide de la transpiration, la fermeture des stomates, et le dépérissement résultant.

La *nitrification* effectuée principalement par Nitrosomas et Nitrobacter (cf annexe 2) ainsi que la *fixation de l'azote* par Azotobacter ou Rhizobium semblent être inhibées par des composés allélopathiques (RICE, 1984). De même, PURCHASE (1974), déclare que de nombreux éléments suggèrent l'action des composés allélopathiques provenant de plantes vivantes ou de leurs résidus sur la nitrification par Nitrosomas.

6. Facteurs influençant la production et l'activité des composés allélopathiques

Très peu d'études ont été entreprises sur ce sujet.

Cependant, RICE (1984), nous donne une série de facteurs influençant les quantités de composés allélopathiques produits par les plantes :

- les facteurs trophiques : la qualité de la lumière, l'intensité de la lumière visible, la longueur du jour, les déficiences en minéraux, le stress hydrique,
- les facteurs environnementaux : la température, la présence de phytocides commerciaux et/ou de pathogènes,
- les facteurs propres à la plante : l'âge des organes, la génétique.

DIETERMAN et al (1964) et HALL et al (1982) sont plus précis lorsqu'ils écrivent que les déficiences minérales, le traitement au froid, la lumière UV, les herbicides et d'autres conditions de stress provoquent une augmentation de la quantité de certains composés allélopathiques chez les plantes.

Une fois ces agents allélopathiques libérés dans le milieu, différents facteurs, environnementaux ou autres, peuvent influencer ou réguler l'efficacité des agents allélopathiques. Ces facteurs sont (RICE, 1984) :

- les facteurs liés au sol : l'activité microbienne du sol, sa teneur en matière organique, sa texture,
- les facteurs trophiques : l'eau disponible, les éléments minéraux,
- les facteurs propres aux substances : leur décomposition, leur durée d'activité, leur accumulation, et leur possible action synergique.

Enfin, la réponse d'une plante à un composé allélopathique spécifique dépend probablement de facteurs de stress, de la même manière que ceux-ci affectent la production de composés allélopathiques par la plante donneuse (RICE, 1984). Malheureusement, très peu de travaux ont été faits sur ce sujet.

Cependant, EINHELLIG et ECKRICH (1983) suggèrent qu'une température élevée peut déterminer le degré de réponse d'une plante à un composé allélopathique.

Après avoir défini rapidement l'allélopathie et décrit les principales caractéristiques des composés allélopathiques, nous nous intéressons dans la partie suivante à celles des exsudats racinaires puisque notre but est de mettre en évidence des phénomènes allélopathiques provoqués par des exsudats racinaires.

II- LES EXSUDATS RACINAIRES

1. Généralités

Le terme "exsudat" décrit toutes les substances organiques provenant de racines vivantes n'ayant pas été endommagées de façon significative par les organismes pathogènes ou de quelque autre façon et qui sont libérées dans le sol (RUSSEL, 1977). Pour TANG et YOUNG (1981), les exsudats racinaires sont définis comme des composés de faibles poids moléculaire qui sont libérés dans les milieu environnant par des racines vivantes et intactes.

Les systèmes racinaires des plantes présentent une large surface d'échange et un métabolisme actif pour puiser l'eau et les éléments nutritifs. D'autre part, des quantités non négligeables de matière organique sont libérées par les racines (PUTNAM et TANG, 1986).

D'après TANG et YOUNG (1982), en condition de croissance normale, l'exsudation représente probablement un mécanisme majeur de libération de produits chimiques organiques dans la rhizosphère.

En 1971, ROVIRA (cité par RICE, 1984) montre que les racines de jeunes plantules exsudent sous trois formes : sous forme de composés solubles, de composés insolubles dans l'eau (polysaccharides), et de substances volatiles (dont 70 à 80 % sont du CO₂). Les techniques du marquage par carbone radioactif indiquent que pour chaque unité de carbone exsudé comme composé soluble, 3 à 5 unités sont libérées sous forme de composés non-solubles et 8 à 10 unités sous forme de composés volatiles (ROVIRA, 1971, cité par RICE, 1984).

2. Nature chimique des exsudats

Depuis les travaux de LYON et WILSON (1921) (cités par RICE, 1984) démontrant que les racines de plusieurs plantes exsudent d'abondantes quantités de composés organiques même en condition stérile, de nombreux chercheurs ont trouvé que toutes sortes de composés organiques sont exsudés par les racines vivantes de nombreuses espèces.

Cependant, la plupart des techniques utilisées pour étudier les exsudats racinaires nous renseignent uniquement sur les composés solubles.

Les informations disponibles sur la nature chimique des exsudats concernent donc principalement les sucres, acides aminés, acides organiques et autres métabolites primaires présents dans tous les exsudats racinaires (HALE et MOORE, 1979 ; BOWEN et ROVIRA, 1976, cités par PUTNAM et TANG, 1986).

Il ne faut pas perdre de vue le fait que dans les études en conditions non stériles, la composition chimique des exsudats racinaires peut être altérée par les micro-organismes de la rhizosphère (MARSCHNER, 1986 ; ROVIRA et DAVEY, 1974).

La modification des produits chimiques dans la rhizosphère a été étudiée grâce des études de marquage au carbone radioactif. Par exemple, MARTIN (1971) (cité par PUTNAM, 1986) a étudié l'exsudation de composés solubles par les racines de blé, de trèfle et de ray-grass dans un sol sableux. Dans cet environnement non stérile presque naturel, les exsudats sont principalement constitués de composés de poids moléculaire élevé. Or, en conditions stériles, les exsudats solubles libérés par les racines consistent en composés de faible poids moléculaire (THOMPSON, 1985). Ceci témoigne du fait que ces composés de faible poids moléculaire sont très rapidement utilisés par les micro-organismes dans la rhizosphère, et sont métabolisés en formes plus complexes.

Bien que la connaissance de la chimie organique de la rhizosphère soit indispensable pour la compréhension de l'allélopathie et des autres disciplines associées (la microbiologie du sol, la nutrition des plantes, et la pathologie des plantes), la recherche n'a pas donné à l'étude de la chimie de la rhizosphère l'attention qu'elle mérite.

Le tableau des pages suivantes (tableau 1) reprend les principaux composés découverts dans les exsudats racinaires de plantes par différents auteurs

nature des composés :	origine des exsudats racinaires :	auteurs :
sucres :	non précisée	MARSCHNER (1986)
glucose	orge, blé, concombre, haricot blé blé et dans tous en général maïs	VANCURA et HANZLIKOVA (1970) ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985) ROVIRA et DAVEY (1974) KRAFczyk et al (1984) (cité par MARSCHNER, 1986)
fructose	orge, blé, concombre, haricot blé blé et dans tous en général maïs	VANCURA et HANZLIKOVA (1970) ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985) ROVIRA et DAVEY (1974) KRAFczyk et al (1984) (cité par MARSCHNER, 1986)
ribose	orge, blé, concombre, haricot blé blé et dans tous en général	VANCURA et HANZLIKOVA (1970) ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985) ROVIRA et DAVEY (1974)
arabinose	orge, blé, concombre blé maïs	VANCURA et HANZLIKOVA (1970) ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985) KRAFczyk et al (1984) (cité par MARSCHNER, 1986)
sucrose	idem	idem
raffinose	blé concombre, haricot	ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985) VANCURA et HANZLIKOVA (1970)
cellobiose	haricot	idem
maltose	orge, blé, haricot blé	idem ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
saccharose	concombre, haricot	VANCURA et HANZLIKOVA (1970)
galactose	orge, blé, concombre, haricot blé	idem ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
xylose	orge, blé, concombre, haricot blé	VANCURA et HANZLIKOVA (1970) ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
rhamnose	orge, blé, concombre, haricot blé	VANCURA et HANZLIKOVA (1970) ROVIRA et MCDUGALL (1967) (THOMPSON, 1985)
desoxyribose	orge, haricot	VANCURA et HANZLIKOVA (1970)
acides aminés :	non précisée	MARSCHNER (1986)
asparagine	orge, blé, concombre blé pois, avoine <i>Pinus radiata</i>	VANCURA et HANZLIKOVA (1970) ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985) ROVIRA (1965) (cité par RUSSEL, 1977) BOWEN (1969) (cité par RUSSEL, 1977)
glutamine	blé, concombre, haricot blé maïs pois, avoine <i>Pinus radiata</i>	VANCURA et HANZLIKOVA (1970) ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985) KRAFczyk et al (1984) (cités par MARSCHNER, 1986) ROVIRA (1965) (cité par RUSSEL, 1977) BOWEN (1969) (cité par RUSSEL, 1977)
α -alanine	orge, blé, concombre, haricot maïs pois, avoine <i>Pinus radiata</i>	VANCURA et HANZLIKOVA (1970) KRAFczyk et al (1984) (cités par MARSCHNER, 1986) ROVIRA (1965) (cité par RUSSEL, 1977) BOWEN (1969) (cité par RUSSEL, 1977)
β -alanine	blé	ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
glycine	orge, blé, concombre, haricot blé maïs pois, avoine <i>Pinus radiata</i>	VANCURA et HANZLIKOVA (1967) ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985) KRAFczyk et al (1984) (cités par MARSCHNER, 1986) ROVIRA (1965) (cité par RUSSEL, 1977) BOWEN (1969) (cité par RUSSEL, 1977)
leucine	orge, blé, concombre, haricot blé pois, avoine <i>Pinus radiata</i>	VANCURA et HANZLIKOVA (1970) ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985) ROVIRA (1965) (cité par RUSSEL, 1977) BOWEN (1969) (cité par RUSSEL, 1977)
serine	orge, blé, concombre, haricot blé maïs pois, avoine	VANCURA et HANZLIKOVA (1970) ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985) KRAFczyk et al (1984) (cités par MARSCHNER, 1986) ROVIRA (1965) (cité par RUSSEL, 1977)
sérine	<i>Pinus radiata</i>	BOWEN (1969) (cité par RUSSEL, 1977)

homosérine	pois, avoine	ROVIRA (1965) (cité par RUSSEL, 1977)
threonine	orge, blé, concombre, haricot blé	VANCURA et HANZLIKOVA (1970)
	pois, avoine	ROVIRA et MCDOUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
	<i>Pinus radiata</i>	ROVIRA (1965) (cité par RUSSEL, 1977)
valine	orge, blé, concombre, haricot blé	BOWEN (1969) (cité par RUSSEL, 1977)
	maïs	VANCURA et HANZLIKOVA (1970)
	<i>Pinus radiata</i>	ROVIRA et MCDOUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
lysine	blé, concombre blé	KRAFczyk et al (1984) (cités par MARSCHNER, 1986)
	avoine	BOWEN (1969) (cité par RUSSEL, 1977)
	<i>Pinus radiata</i>	VANCURA et HANZLIKOVA (1970)
arginine	orge, haricot	ROVIRA et MCDOUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
	maïs	ROVIRA (1965) (cité par RUSSEL, 1977)
acide aminobutyrique	maïs	ROVIRA (1965) (cité par RUSSEL, 1977)
	blé	BOWEN (1969) (cité par RUSSEL, 1977)
	pois, avoine	VANCURA et HANZLIKOVA (1970)
	<i>Pinus radiata</i>	ROVIRA et MCDOUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
acide aspartique	orge, blé, concombre, haricot blé	BOWEN (1969) (cité par RUSSEL, 1977)
	<i>Pinus radiata</i>	VANCURA et HANZLIKOVA (1970)
	maïs	ROVIRA et MCDOUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
acide glutamique	orge, blé, concombre, haricot blé	BOWEN (1969) (cité par RUSSEL, 1977)
	maïs	KRAFczyk et al (1984) (cités par MARSCHNER, 1986)
	<i>Pinus radiata</i>	VANCURA et HANZLIKOVA (1970)
acide cystéique	orge, blé, concombre	ROVIRA et MCDOUGALL (1967) (cités par Thompson, 1985)
cystine	orge, blé, concombre	KRAFczyk et al (1984) (cité par Marschner, 1986)
cystathionine	blé blé	BOWEN (1969) (cité par RUSSEL, 1977)
ornithine	orge, concombre, haricot	VANCURA et HANZLIKOVA (1970)
acide α -NH ₂ -adipique	orge, blé	idem
proline	orge, blé, haricot blé	idem
β -pyrazolylalanine	concombre	ROVIRA et MCDOUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
tyrosine	orge, blé, concombre, haricot blé	VANCURA et HANZLIKOVA (1970)
acide pipécolique	haricot	idem
phénylalanine	orge, blé, concombre, haricot blé	ROVIRA et MCDOUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
méthionine	blé	VANCURA et HANZLIKOVA (1970)
		idem
acides organiques :	non précisé	MARSCHNER (1986)
	<i>Betula alleghaniensis</i> , <i>Fagus grandifolia</i> , <i>Acer saccharum</i>	SMITH (1977)
acide oxalique	orge, blé, concombre, haricot blé	idem
	blé et dans tous en général	VANCURA et HANZLIKOVA (1970)
	maïs	ROVIRA et MCDOUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
acide citrique	blé et dans tous en général blé	ROVIRA et DAVEY (1974) (cités par THOMPSON, 1985)
	maïs	KRAFczyk et al (1984) (cités par MARSCHNER, 1986)
acide glycolique	orge, blé, haricot blé	ROVIRA et DAVEY (1974) (cités par THOMPSON, 1985)
	blé et dans tous en général	ROVIRA et MCDOUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
ac. adénosine	pousse de pois et blé	KRAFczyk et al (1984) (cités par MARSCHNER, 1986)
monophosphorique		VANCURA et HANZLIKOVA (1970)
acide benzoïque	non précisé	ROVIRA et MCDOUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
acide benzoïque	maïs	Rovira et Davey (1974) (cités par Thompson, 1985)
		Lundegardh et Stenlid (1944)
		RICE (1984)
		Krafczyk et al (1984) (cités par Marschner, 1986)

et ses dérivés	non précisés	Rice (1984)
acide fumarique	orge, blé, haricot	VANCURA et HANZLIKOVA (1970)
	blé	ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
	maïs	KRAFCHYK et al (1984) (cités par MARSCHNER, 1986)
acide maléique	idem	idem
acide succinique	orge, blé, concombre, haricot	VANCURA et HANZLIKOVA (1970)
	blé	ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
	maïs	KRAFCHYK et al (1984) (cités par MARSCHNER, 1986)
acide aconitique	idem	idem
acide glutarique	idem	idem
acide malique	orge, blé, haricot	VANCURA et HANZLIKOVA (1970)
	blé	ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
acide lactique	orge, blé, concombre, haricot	VANCURA et HANZLIKOVA (1970)
acide acétique	blé	ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
acide butyrique	blé	idem
valérique	blé	idem
nucléotides :	blé et dans tous en général	ROVIRA et DAVEY (1974) (cités par THOMPSON, 1985)
adénine	pois	FRIES et FORSMAN (1951)
	blé	ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
guanine	pois	FRIES et FORSMAN (1951)
	blé	ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
cytidine	pois	FRIES et FORSMAN (1951)
uridine	pois	idem
flavonones	blé et dans tous en général pousse de blé	ROVIRA et DAVEY (1974) (cités par THOMPSON, 1985) LUNDEGARDH et STENLID (1944)
ENZYMES :		
invertase	blé et dans tous en général	ROVIRA et DAVEY (1974) (cités par THOMPSON, 1985)
	blé	ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
amylase	blé et dans tous en général	ROVIRA et DAVEY (1974) (cités par THOMPSON, 1985)
	blé	ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
protéase	blé et dans tous en général	ROVIRA et DAVEY (1974) (cités par THOMPSON, 1985)
	blé	ROVIRA et MCDUGALL (1967) (dans THOMPSON, 1985)
ions inorganiques :	Betula alleghaniensis, Fagus grandifolia, Acer saccharum	SMITH (1977)
citrate	Lupinus albus	GARDNER et al (1983a) (cités par MARSCHNER, 1986)
composés phénoliques :	non précisés	MARSCHNER (1986)
acide caféique	non précisés	RICE (1974)
acide férulique	non précisés	idem
acide cinamique	non précisés	idem
coumarine		
scopolectine	avoine	MARTIN (1957)

tableau 1 : principaux composés présents dans les exsudats racinaires

3. Importance quantitative des exsudats racinaires

On en sait plus sur la composition des exsudats racinaires que sur la quantité totale qui est produite. En effet, d'après HALE et al (1971) (cités par RUSSEL, 1977), "les quantités de matériel perdu par les racines en conditions naturelles sont inconnues".

Les raisons de cette méconnaissance sont évidentes : il est impossible de construire des systèmes expérimentaux dans lesquels tout le matériel quittant les racines est retrouvé (RUSSEL, 1977). D'ailleurs, il apparaît également très difficile de simuler l'action des nombreux facteurs environnementaux sur le mécanisme d'exsudation racinaire (RUSSEL, 1977).

Les techniques utilisées pour étudier les exsudats racinaires ignorent donc largement les composés volatiles ainsi que les composés insolubles qui peuvent excéder de loin la quantité de composés solubles (ROVIRA et DAVEY, 1974).

VANCURA et GARCIA (1969) (cités par RUSSEL, 1977) concluent de leur travail sur les racines d'orge que les exsudats peuvent représenter jusqu'à 7 % du poids des parties aériennes dans les plantes qui ont été soumises à un stress hydrique.

Pour BARBER et GUNN (1974) (cité par MARSCHNER, 1986), les exsudats d'orge représentent environ 9 % du poids des racines (les hydrates de carbone représentant plus de 80% du total).

D'après ROVIRA (1969) (cité par RICE, 1984), la quantité de composés organiques exsudés par les racines excède rarement 0,4 % du carbone synthétisé.

D'après MARSHNER (1986), la quantité de carbone libérée dans la rhizosphère varie de 1 % à 30 % de la proportion du poids sec total.

4. Facteurs influençant l'exsudation

Les changements quantitatifs ou qualitatifs des exsudats peuvent être dus à de nombreux facteurs (HALE et al, 1971) (cités par RUSSEL, 1977) :

- l'espèce, l'âge de la plante,
- la nutrition de cette dernière : une déficience en azote et en phosphate peut conduire à une diminution de l'exsudation (ROVIRA, 1969, cité par RICE, 1984) ; avec une déficience en potassium, les proportions de sucres et d'acides organiques dans les exsudats de maïs sont déplacées en faveur des acides organiques (KRAFFCZYK et al, 1984, cités par MARSCHNER, 1986), tandis qu'en condition de déficience en fer dans les plantes herbacées, les acides aminés dominent dans les exsudats (MARSCHNER, 1986). Dans beaucoup d'espèces de dicotylédones, la déficience en fer conduit à une augmentation de la libération de phénols (MARSCHNER, 1986).

- la qualité et la quantité d'éclairement : THOMPSON en 1985 relève qu'un éclairement de forte intensité peut augmenter l'exsudation racinaire, surtout durant les premières semaines de croissance.
- la température : une température faible pour des périodes courtes peut favoriser l'exsudation (VANCURA, 1967, cité par RUSSEL) ; pour THOMPSON (1985), une forte température, particulièrement durant les premières semaines de croissance, peut augmenter l'exsudation racinaire.
- l'état hydrique : le stress hydrique peut favoriser l'exsudation (KATZNELSON et al, 1954 ; VANCURA et GARCIA, 1969 ; AYERS et THORNTON, 1968, cités par RUSSEL, 1977).
- l'humidité, le type et le pH du sol,
- la présence de spray foliaires (produits chimiques agricoles) et celle de micro-organismes : La présence de micro-organismes semble augmenter l'exsudation et certains herbicides ont le même effet (KAISER et REBER, 1970, cité par RUSSEL, 1977).

5. Action de ces exsudats

Pour ROVIRA (1969) (cité par RICE, 1984), les composés exsudés par les racines exercent de fortes influences sur les micro-organismes du sol. Ils peuvent également affecter la disponibilité des éléments nutritifs et donc leur mobilisation.

Il existe plusieurs voies possibles selon lesquelles les exsudats racinaires affectent la mobilisation des éléments nutritifs (MARSCHNER, 1986) (figure 10 page suivante).

Les sucres ont seulement des effets mineurs sur la mobilisation des éléments minéraux (MARSCHNER, 1986).

Les acides organiques présents dans les exsudats racinaires semblent augmenter la solubilisation de MnO_2 (BROMFIELD, 1958 ; UREN, 1982 ; GODO et REISENAUER, 1980, cités par MARSCHNER, 1986) (figure 10 a) page suivante). A un pH donné, les exsudats racinaires de blé ont dissous 10 à 50 fois plus de manganèse à partir de MnO_2 que ne l'a fait une solution tampon (GODO et REISENAUER, 1980, cités par MARSCHNER). L'acide malique est un composé important de ces exsudats racinaires..

La mobilisation ne peut pas être expliquée simplement par un effet de pH mais également par un phénomène de réduction (le manganèse ne peut être absorbé que sous forme réduite) et peut-être aussi par des chélation ultérieures. En effet, la chélation de Mn^{2+} empêche sa réoxydation et augmente la mobilité dans la rhizosphère du manganèse réduit .

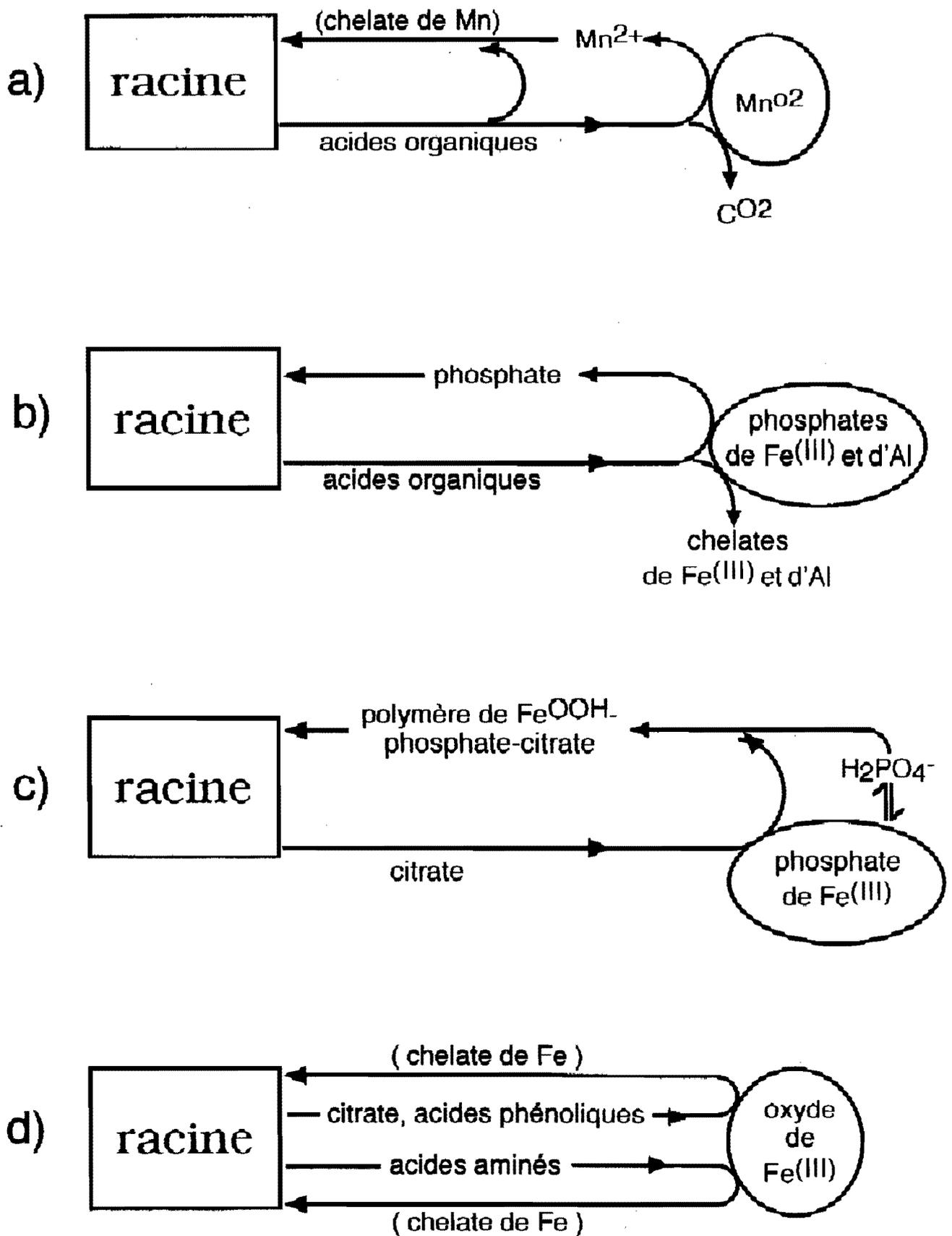


Figure 10 : différents mécanismes de solubilisation de composés inorganiques par les exsudats racinaires dans la rhizosphère (Marschner, 1986)

Les acides organiques des exsudats racinaires sont également considérés importants pour la solubilisation des phosphates inorganiques qui sont très peu solubles (figure 10 b). Dans la rhizosphère du blé, on trouve des concentrations relativement importantes d'acide 2-kétogluconique ; c'est le principal composant responsable de l'acidification de la rhizosphère par les exsudats racinaires et de l'augmentation de l'absorption de phosphate à partir de la roche phosphate (MOGHIMI et al, 1978, cité par MARSCHNER, 1986).

Les moyens par lesquels les acides organiques mobilisent le phosphate ne se limitent pas à baisse du pH de la rhizosphère.

Le citrate, par exemple, est bien connu pour ses capacités à désorber le phosphate des surfaces sesquioxides, par échange d'anions (PARFITT, 1979, cité par MARSCHNER, 1986).

En fait, une combinaison des deux phénomènes de désorption et de chélation est responsable de la mobilisation du phosphate à partir des chélates de fer et/ou d'aluminium. Les acides citriques et maliques forment des chélates relativement stables avec Fe^{3+} et l'aluminium, et donc augmentent la solubilité et le taux de prélèvement du phosphore.

Il a été postulé que le citrate réagit dans le sol, en formant des polymères de citrate hydroxyphosphate ferrique qui diffusent à la surface des racines, où Fe^{3+} est réduit et le phosphate prélevé par les racines (GARDNER et al., 1983, cités par MARSCHNER, 1986) (figure 10 c).

Les phénols contribuent à la réduction du manganèse (BROMFIELD, 1958, cité par MARSCHNER, 1986) et particulièrement à celle du fer (qui n'est également absorbé que sous forme réduite) par les exsudats racinaires (figure 10 d). Les phénols favorisent la mobilisation du fer et du manganèse dans la rhizosphère. Cet effet est probablement suivi par la chélation, qui facilite le transport jusqu'aux membranes plasmiques, site d'absorption.

Certains acides aminés favorisent également la solubilisation et la mobilisation du fer (figure 10 d).

La capacité des exsudats racinaires à mobiliser les composés inorganiques difficilement solubles dépend également de leur concentration par unité de volume de sol. Donc, il peut être postulé qu'avec une densité croissante de racines ou de racines latérales, les chances augmentent de mobiliser ces composés par les exsudats racinaires (GARDNER et al, 1983, cités par MARSCHNER, 1986).

Après nous être intéressés aux études sur l'allélopathie et à celles concernant les exsudats racinaires, nous allons nous intéresser aux travaux portant sur des phénomènes allélopathiques provoqués par des exsudats racinaires de plantes.

C'est le résultat d'une recherche bibliographique sur ce thème qui est présenté dans la partie suivante.

III- ALLELOPATHIE ET EXSUDATS RACINAIRES : RECENSEMENT DES ETUDES MENEES

Il nous est très vite apparu que les phénomènes allélopathiques des exsudats racinaires ont été très peu étudiés.

Malgré tout, il nous a semblé intéressant de recenser les résultats des études existantes, de procéder en quelque sorte à un inventaire des différents résultats de ces études.

1. Inventaire

Le tableau des pages suivantes (tableau 2) synthétise les caractéristiques et résultats des travaux que nous avons lus concernant les phénomènes allélopathiques des exsudats racinaires. Nous avons reporté dans ce tableau le nom des plantes donneuses et receveuses (celles produisant les exsudats racinaires et celles les recevant), le ou les tests biologiques mis en oeuvre par l'auteur, le dispositif de récolte d'exsudat qu'il a utilisé et enfin les effets qui ont pu être observés.

Ce tableau nous a permis d'avoir une idée des dispositifs de récolte d'exsudats racinaires et des tests biologiques les plus couramment utilisés dans les études sur les phénomènes allélopathiques d'exsudats racinaires.

Dans la partie suivante, nous décrivons de manière plus précise ces différents dispositifs et ces tests biologiques.

plante donneuse d'exsudats	plante receveuse	auteurs	n°
<i>Agropyron repens</i>	orge (<i>Hordeum vulgare</i>)	LOVETT et JOKINEN (1984)	1
avoine sauvage (<i>Avena fatua</i>)	blé de printemps (<i>Triticum aestivum</i>)	SCHUMACHER (1982), cité par FONTAR et THOMAS (1987)	2
avoine sauvage	blé de printemps	PEREZ et ORMENO-NUNEZ (1991)	3
<i>Chenopodium album</i> L.	tomate	QASEM et HILL (1989)	4
pois (<i>Pisum arvense</i> L.)	orge	RAKHTEENKO et al (1973), cité par RICE (1984)	5
vetch (<i>Vicia villosa</i>)	avoine (<i>Avena sativa</i>) orge avoine		
kikuyu (<i>Pennisetum clandestinum</i> Hochst.)	piquant (<i>Bidens pilosa</i>) oumine (<i>Cyperus rotundus</i>) tomate	HUMEAU (1993)	6
tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) oumine ou zourmine (<i>Cyperus rotundus</i> L.) piquant (<i>Bidens pilosa</i>)	kikuyu	HUMEAU (1993)	7
<i>Chromolaena odorata</i> (L.)	<i>Tithonia diversifolia</i> (Homs) <i>Cucumis melo</i>	FENCHARD (1989) NIBOUCHE (1988)	8
ground-ivy	radis bowny bromc	RICE (1986), cité par PUTNAM et TANG (1986)	9
asparagus	asparagus	YOUNG (1986), cité par PUTNAM et TANG (1986)	10
riz	avoine sauvage	OSVALD (1953), cité par PUTNAM et TANG (1986)	11
riz	lathue (<i>Lactuca sativa</i>) tomate	BARNES et PUTNAM (1983), cité par PUTNAM et TANG (1986)	12
sorgho (<i>Sorghum bicolor</i>)	<i>Amaranthus retroflexus</i>	ALSAADAWI (1992), cité par RIZVI (1992)	13
<i>Kalmia angustifolia</i>	black spruce (<i>Picea mariana</i>) red pine (<i>Pinus resinosa</i>) meleze	MALLIK et ROBERTS, unpublished data , cité par RICE (1984)	14
johansongrass	plusieurs sortes de plantes	ABDUL-WAHAB (1964); ABDUL- WAHAB et RICE (1964) KOVACS (1972) cités par THOMPSON (1985)	15
prickly sida (<i>Sida spinosa</i>) johansongrass (<i>Sorghum halapense</i> L.) bihagrass (<i>Paspalum notatum</i>) lantana (<i>Lantana camara</i>) common purslane <i>Portulaca oleracea</i>	soja	Pope et al (1984), cité par THOMPSON (1985)	16
prickly sida	radis (<i>Raphanus sativus</i>) tomate	POPE et al (1984), cité par THOMPSON (1985)	17
prickly sida johansongrass bihagrass cocongrass (<i>Imperata cylindrica</i>) coton soja	<i>Beta vulgaris</i> . <i>Abelmoschus esculentus</i> <i>Beta vulgaris</i> <i>Abelmoschus esculentus</i> idem <i>Beta vulgaris</i> <i>Abelmoschus esculentus</i> <i>Beta vulgaris</i> <i>Abelmoschus esculentus</i>	POPE et al (1984), cité par THOMPSON (1985)	18
johansongrass	plusieurs sortes de plantes	Lolas et COBLE (1982), cité par THOMPSON (1985)	19
johansongrass	soja tomate orge millet	KOVACS (1972), cité par Thompson (1985)	20

étude n°	test biologique mis en oeuvre	dispositif de récolte d'exsudats utilisé	nature des effets observés
1	test de croissance	Viikki apparatus	réduction du poids sec.
2	test de croissance	pas d'information	croissance réduite des feuilles et racines
3	test de croissance	CRETS	inhibition de la croissance racinaire et du coléoptile
4	test de croissance	circuit fermé	réduction du poids frais
5	test de croissance	pas d'information	stimulation de la photosynthèse et du prélèvement de P
6	test de croissance test de germination	dispositif en marche d'escalier	diminution de la quantité de MS des racines et parties aériennes, du nbre de tiges du piquant pas d'effet sur la germination
7	test de croissance	dispositif en marche d'escalier	aucun
8	test de germination	continuous root exudate trapping sytème (CRETS)	inhibition de la germination
9	test de croissance	tubes en U	stimulation de la croissance des pousses et des racines de radis inhibition de la croissance des pousses et racines du downy brome
10	test de croissance test de germination	transfert du milieu de culture de la plante donneuse à la plante receveuse CRETS	inhibition de la croissance des jeunes plants inhibition de la croissance des pousses et radicelles
11	test de germination	pas d'information	réduction de la germination
12	test de croissance	dispositif en marche d'escalier	réduction de la biomasse totale
13	test de germination test de croissance	non précisé	réduction de la germination inhibition de la croissance
14	test de croissance	dispositif en marche d'escalier	réduction de la biomasse et de la croissance en hauteur
15	pas d'information	pas d'information	toxique
16	test de croissance	système de Pope et al	ralentissement de la croissance en hauteur
17	test de germination	système des joints en T	ralentissement de la croissance des radicelles
18	test de germination	système des joints en T	retard de la germination
19	pas d'information	pas d'information	inhibition
20	test de germination	pas d'information	inhibition de la germination

jonhsongrass	blé	KOVACS (1972), cité par THOMPSON (1985)	21
soja	coton (<i>Gossypium bardadense</i>) radis tomate	idem Pope et al (1984), cité par THOMPSON (1985) idem	
soja	carotte	Pope et al (1984), cité par THOMPSON (1985)	22
lantana Cogongrass	betterave radis	POPE et al (1984), cité par THOMPSON (1985)	23
bermudagrass (<i>Cynodon dactylon</i> L.)	soja	POPE et al (1984), cité par THOMPSON (1985)	24
<i>Cassia obtusifolia</i> L.	soja	POPE et al (1984), cité par Thompson (1985)	25
<i>Xanthium pennsylvanicum</i> <i>sesbania exaltat</i>	soja	POPE et al (1984)	26
jonhsongrass	plusieurs espèces	RICE (1984)	27
lambquarter (<i>Chenopodium album</i>)	maïs	KOSSANEL et al (1977), cité par RICE (1984)	28
<i>Celosia argentea</i>	soja (<i>Pennisetum americanum</i>)	Pandya (1975, 1976), cité par RICE (1984)	29
prostrate knotweed (<i>Polygonum aviculare</i>)	sorgho <i>Chenopodium album</i> bermudagrass	ALSAADAWI et RICE (1982), cité par RICE (1984)	30
érable (<i>Acer pseudoplatanus</i> L.)	bouleau (<i>Betula alleghaniensis</i>)	MENSAH (1972), cité par RICE (1984)	31
jonhsongrass	<i>Amaranthus retroflexus</i> <i>Setaria viridis</i>	ABDUL-WAHAB et RICE (1967), cités par RICE (1984)	32
jonhsongrass	<i>Bromus japonicus</i>	ABDUL-WAHAB et RICE (1967), CITES par RICE (1984)	33
tournesol (<i>Helianthus annuus</i>)	tournesol <i>Erigeron canadensis</i> <i>Rudbeckia serotina</i> cabgrass (<i>Digitaria sanguinalis</i>) <i>Amaranthus retroflexus</i>	WILSON et RICE (1968), cité par RICE (1984)	34
eggplant (<i>Lolanum melongena</i>) foxtail millet (<i>Setaria italica</i>)	eggplant foxtail millet	LEE et al (1967), cité par RICE (1984)	35
cabgrass	<i>Amaranthus retroflexus</i> <i>Aristida oligantha</i> <i>Bromus japonicus</i> tournesol	PARENTI et RICE (1969), cité par RICE (1984)	36
<i>Euphorbia supina</i> ragweed (<i>Ambrosia artemisiifolia</i>)	<i>Bromus japonicus</i> tournesol ragweed	BROWN (1968), cité par RICE (1984) JACKSON et WILLEMSSEN (1976)	37
<i>Euphorbia supina</i>	<i>Erigeron canadensis</i> <i>Aristida oligantha</i>	BROWN (1968), cité par RICE (1984)	38
orge	adventices, dont <i>Stellaria media</i> L., <i>Capsella bursa-pastoris</i> , tabac (<i>Nicotiana tabacum</i>)	OVERLAND (1966), cité par RICE (1984)	39
lupin (<i>Lupinus</i>) moutarde (<i>Brassica</i>)	buckwheat (<i>Fagopyrum</i>)	ZABYALYENDZIK (1973), cité par RICE (1979)	40
avoine	buckwheat	ZABYALYENDZIK (1973), cité par RICE (1979)	41
buckwheat	avoine	ZABYALYENDZIK (1973), cité par RICE (1979)	42
buckwheat	lupin	ZABYALYENDZIK (1973), cité par RICE (1979)	43
lupin	<i>Picea excelsa</i>	LAKHTANOVA (1977), cité par Rice (1979)	44

21	test de germination	système des joints en T	inhibition de la germination
22	test de germination	idem	pas d'effet
23	test de germination	idem	réduction de la germination
24	test de germination	idem	stimulation de la germination
25	test de germination	idem	inhibition de la germination
26	test de croissance	idem	réduction du poids sec
27	test de croissance	pas d'information	réduction de la croissance
28	test de germination	pas d'information	retard de la pousse des racelles
29	test de croissance	pas d'information	inhibition de la croissance des pousses et des racelles
30	test de croissance	dispositif en marche d'escalier	retard de la pousse des racines, de l'apex ou des deux
31	test de croissance	pas d'information	effet allélopathique
32	test de croissance	système d'Abdul-Wahab et Rice	réduction de la croissance
33	test de croissance	système d'Abdul-Wahab et Rice	pas d'effet
34	test de germination	pas d'information	inhibition de la germination
35	pas d'information	pas d'information	inhibition de la croissance
36	pas d'information	pas d'information	inhibition de la croissance
37	test de croissance	stairstep apparatus	inhibition de la croissance
38	pas d'information	pas d'information	inhibition de la croissance
39	test de germination	pas d'information	inhibition de la germination
40	pas d'information	pas d'information	stimulation de la pousse et du développement
41	test de croissance	pas d'information	inhibition de la croissance
42	test de croissance	pas d'information	stimulation de la croissance
43	test de croissance	pas d'information	inhibition de la croissance
44	test de croissance	pas d'information	stimulation de la croissance

weedgrass (<i>Stipa pulehra</i> Hitchc.)	avoine sauvage	HULL ET MULLER (1977), CITE PAR RICE (1984)	45
Bigalla Limpograss (<i>Hemarthria alissima</i>)	laitue	TANG ET YOUNG (1982)	46
<i>Senecio vulgaris</i> L.	tomate	QASEM ET HILL (1989)	47
blé	blé	KALBURTZI et al (1989)	48
fababeau	fababeau (<i>Vicia faba</i>)		
	blé fababeau		
tournesol	tournesol	IRONS et BURNSIDE (1982)	49
tournesol	sorgo soja (<i>Glycine max</i>)	IRONS et BURNSIDE (1982)	50
<i>Setaria faberii</i> Herrm	<i>Zea mays</i>	BELL et KOEPE (1972)	51
prostrate knotweed	coton <i>Sporobolus pyramidatus</i>	ALSAADAWI et RICE (1982), cité par RICE (1984)	52
<i>Festuca arundinacea</i> Scrib.	<i>Liquidambar styraciflua</i>	WALTERS et GILMORE (1976)	
<i>Crotalaria argentea</i>	<i>Rhizobium meliloti</i>	PANDYA et POTA (1978), cité par RICE (1984)	53
kikuyu	ray-gras anglais Madera haricot Pompadour géranium rosat	FONTAR et THOMAS (1987)	54
kikuyu	maïs Sirwan 8331	FONTAR et THOMAS (1987)	55
kikuyu	grox trèfle (<i>Oxalis lanifolia</i>)	FONTAR et THOMAS (1987)	56
kikuyu	ray-gras anglais Madera	FONTAR et THOMAS (1987)	57
kikuyu	tomate Rome	FONTAR et THOMAS (1987)	58

45	pas d'information	pas d'information	toxique
46	test de germination	CRETS	réduction de la longueur de la radicelle
47	test de croissance	système en circuit fermé	pas d'effet
48	test de germination	système des deux réservoirs l'un dans l'autre	réduction du taux de germination
49	test de germination et de croissance	transfert du milieu de culture de la plante donneuse à la plante receveuse - culture hydroponique	réduction du taux de germination et du poids frais et sec
50	test de germination et de croissance	idem	réduction des poids frais et secs
51	test de croissance	dispositif en marche d'escalier	réduction de la taille, des poids frais et secs
52	test de croissance	dispositif en marche d'escalier	réduction du poids sec
53	test de croissance	pas d'information	réduction de la croissance
54	test de croissance	système en circuit fermé	aucun effet
55	test de croissance	système en circuit fermé	réduction de la taille, du poids de la matière sèche aérienne et totale
56	test de croissance	système en circuit fermé	réduction du poids de la matière sèche aérienne
57	test de germination	système en circuit fermé	pas d'effet
58	test de germination	système en circuit fermé	retard de germination

tableau 2 : études menées sur l'allélopathie des exsudats racinaires

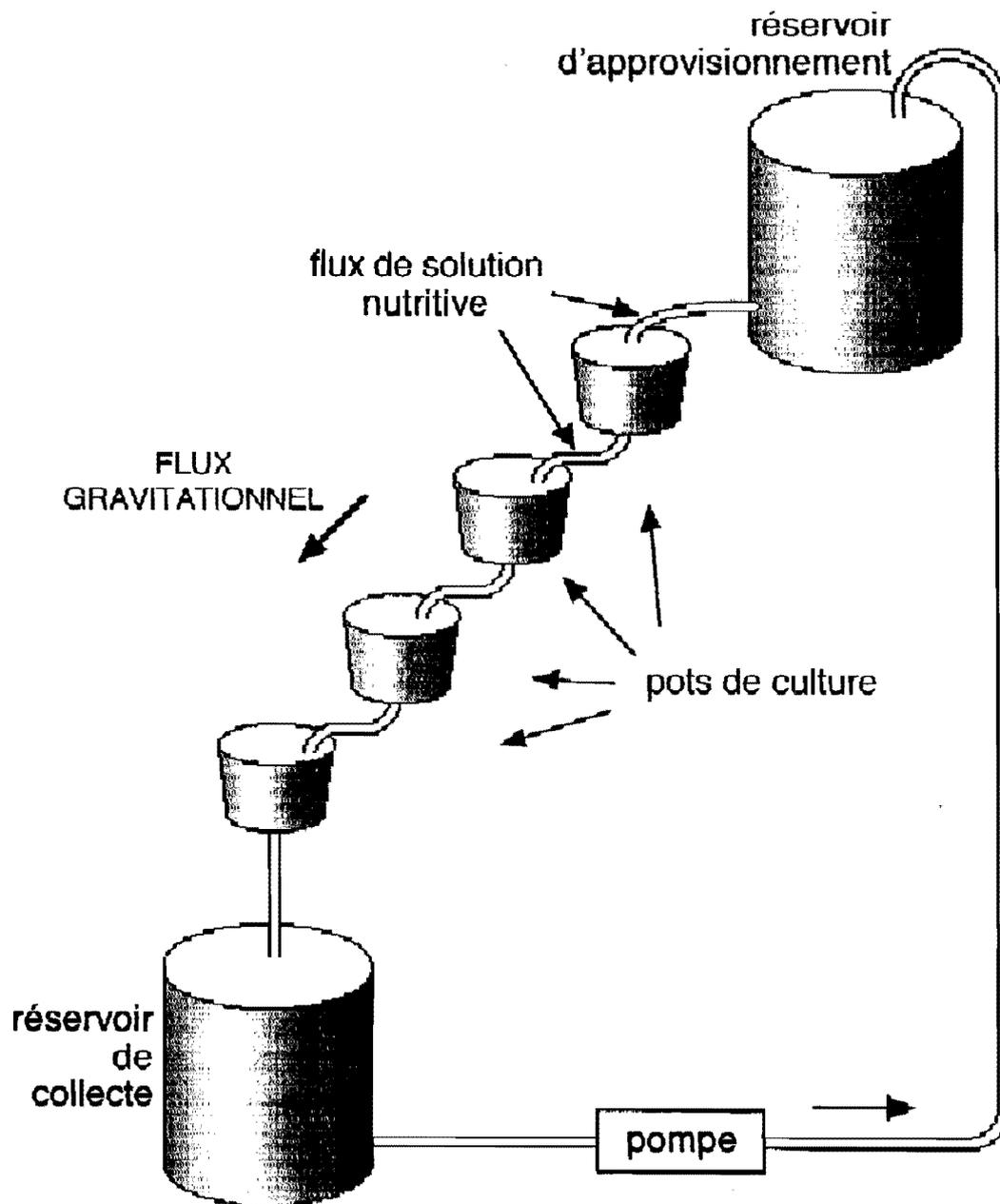


Figure 11 : dispositif en marche d'escalier (d'après Bell et Koeppel, 1972)

2. Techniques et méthodes utilisées dans la mise en évidence de phénomènes allélopathiques provoqués par des exsudats racinaires

La première étape dans l'étude de phénomènes allélopathiques provoqués par des exsudats racinaires est la récolte de ces exsudats.

a) les différents dispositifs de récolte d'exsudats

TANG (1986) fait remarquer qu'il faut examiner avec soin les nombreux articles indiquant que des "exsudats racinaires" sont collectés pour tester leurs effets allélopathiques, étant donné qu'il n'existe pas de méthode standardisée de récolte.

En effet, les exsudats racinaires désignent uniquement les substances chimiques (sauf l'eau et le CO₂) libérées par les racines en conditions naturelles. Or, dans un procédé expérimental, toutes les perturbations physiques qui pourraient endommager la fragile structure des racines provoqueraient la libération des contenus intracellulaires (AYERS et THORNTON, 1968, cité par RUSSEL, 1977). Les résultats obtenus sans l'assurance préalable de cette condition (qu'aucun trouble ne se produise) sont donc difficiles à attribuer à une action stricte d'exsudats racinaires.

Dans la bibliographie, on recense un certain nombre de dispositifs de récolte de ces exsudats.

ABDUL-WAHAB et RICE, en 1967, (cités par RICE, 1984) imaginent le dispositif suivant : les plantes test sont placées dans des fioles en verre dans lesquelles circule, par gravitation, une solution provenant d'un bac auquel elles sont connectées. Dans ce bac sont plantées les plantes donneuses. Les plantes témoins, quant à elles, sont alimentées par une solution provenant d'un 2^e bac, exempt de toute plantation.

Les deux bacs sont arrosés par un système de goutte à goutte délivrant une solution nutritive provenant de deux réservoirs d'approvisionnement. Les solutions en excès, après circulation dans les fioles (la solution sortant du bac contenant les plantes donneuses entraîne les substances exsudées par ces plantes), sont repompées à la sortie dans leur réservoir d'approvisionnement respectif.

En 1972, BELL et KOEPPE mettent au point un dispositif "en marche d'escalier" qui sera très utilisé par la suite dans les études sur l'allélopathie (figure 11).

Ce dispositif se compose de quatre étagères (ou marches) supportant chacune 6 pots. Les pots de l'étage supérieur sont alimentés par une solution nutritive provenant d'un réservoir d'approvisionnement. La solution de drainage d'un pot passe à la surface du pot inférieur par un

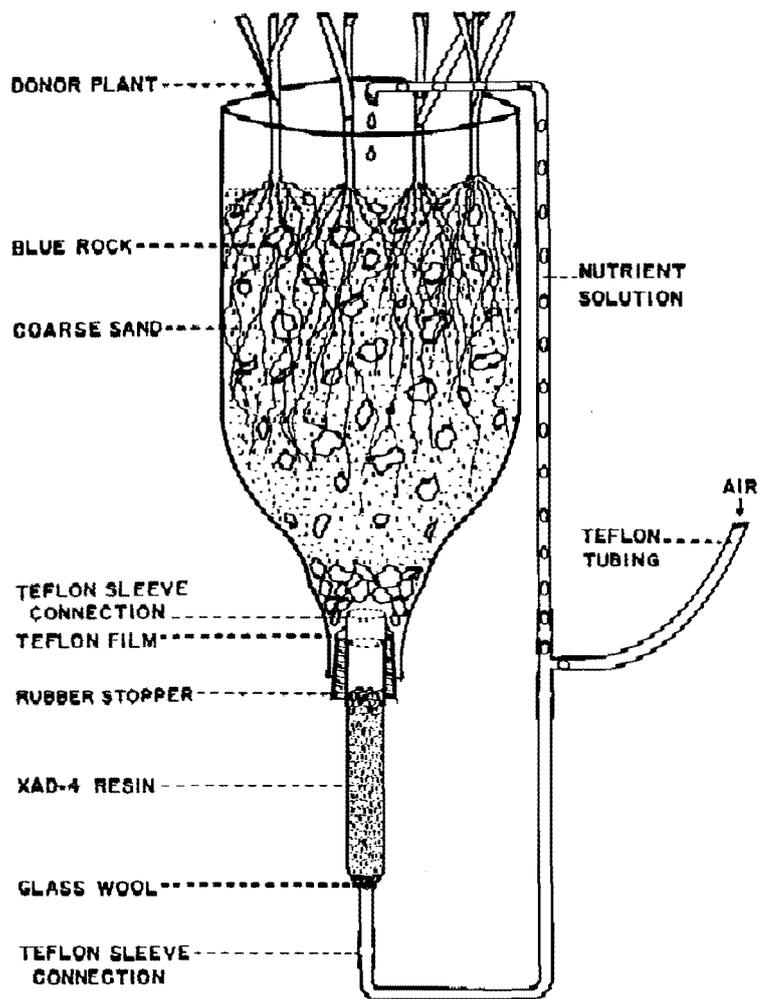


Figure 12 : "the Continuous Root Exudates Trapping System" (CRETS) (Tang et Young, 1982)

système de coude en plastique. Le pot sur l'étage le plus bas est connecté à un récipient de collecte. Le contenu de ce récipient est récupéré pour arroser le pot de l'étage le plus haut. Ainsi, la solution est recyclée.

Pour les quatre premières séries verticales, on alterne les pots contenant les plantes tests et témoins. Les deux dernières séries verticales ne sont composées que de pots contenant les plantes témoins.

En 1982, TANG et YOUNG utilisent pour collecter les exsudats racinaires de *Bigalita Limpogross* un dispositif nouveau : le "continuous root exudate trapping system" (CRETS), qui sera repris ensuite dans de nombreuses études sur l'allélopathie (figure 12).

Ce dispositif se compose d'une bouteille teintée sans fond retournée, remplie de cailloux et de sable grossier, dans laquelle sont plantées les plantes donneuses, alimentées par une solution nutritive.

On fixe au fond de la bouteille une colonne contenant de la résine XAD-4, copolymère hydrophobique qui piège les composés hydrophobes exsudés par les racines dans la solution nutritive (la plupart des composés allélopathiques connus : acides phénols, flavonoïdes, terpenoïdes, stéroïdes, alcaloïdes sont suffisamment hydrophobes pour être piégés).

Toujours en 1982, ALSAADAWI et RICE, (cités par RICE, 1984), imaginent un système de tube en U rempli de solution nutritive dans lequel les plantules tests sont placées à une extrémité et la plante donneuse à l'autre.

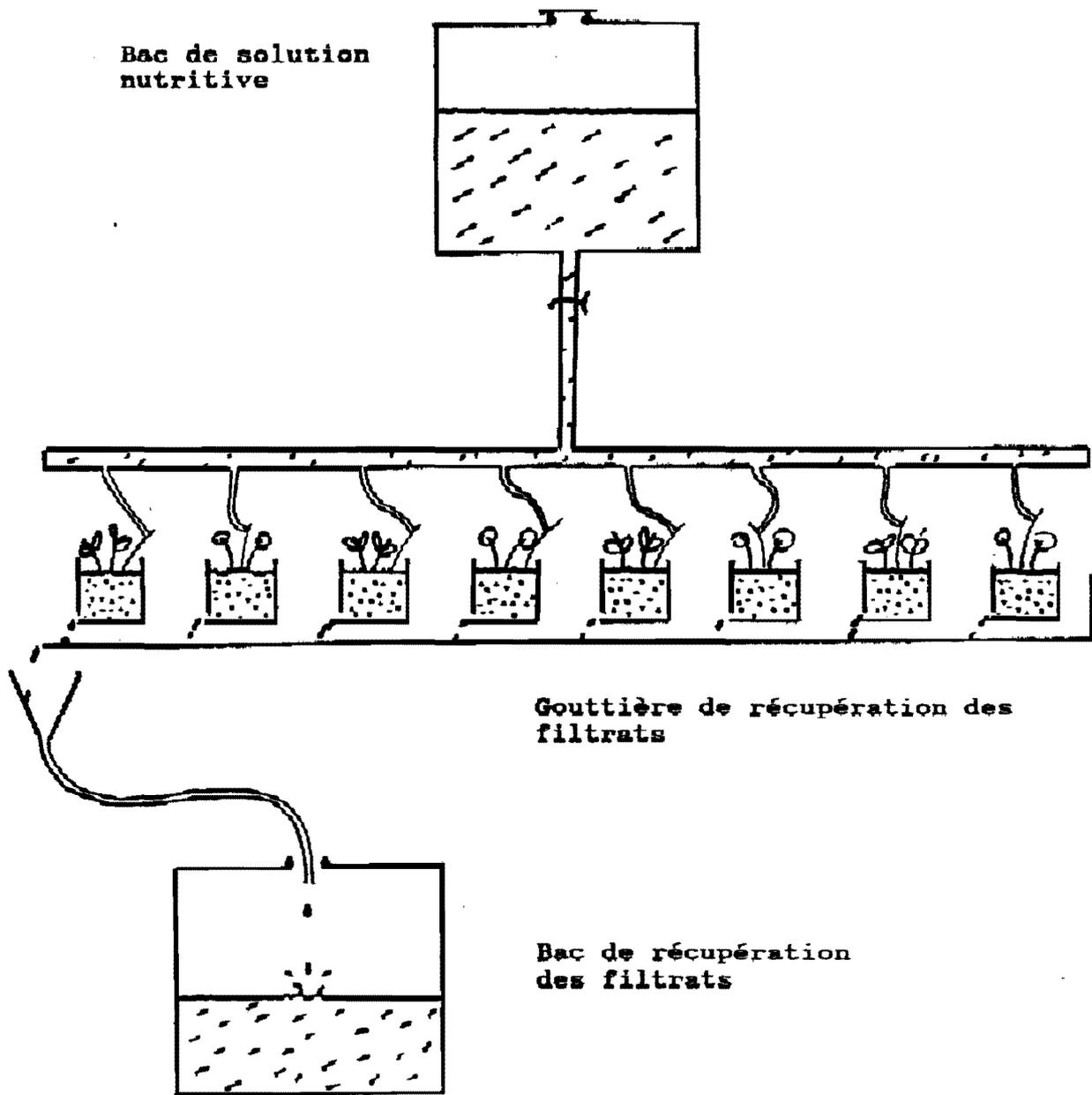
On rajoute de la solution nutritive chaque jour. Les plantes sont laissées 15 jours.

En 1984, LOVETT et JOKINEN mettent au point le dispositif Viikki, une modification du dispositif en marche d'escalier. Les différences avec celui-ci sont de deux ordres :

- le dispositif Viikki comprend 5 marches (au lieu de 4),
- les exsudats racinaires proviennent d'un plateau contenant les plantes donneuses (et non de pots contenant les plantes donneuses alternés avec ceux contenant les plantes receveuses) (un plateau contenant uniquement le substrat de culture est relié aux pots contenant les plantes témoins).

Egalement en 1984, POPE et al (cités par THOMPSON, 1985), conçoivent un autre dispositif : un système de canalisation entrecoupée de joints en T, dans lequel on place les plantes donneuses. Celles-ci exsudent dans la canalisation où circule une solution nutritive.

Le mélange de solution nutritive et d'exsudats est récupéré au bout d'une semaine.



Légende :

-  Solution nutritive
-  Sable
-  Donneurs (kikuyu)
-  Receveurs (plantes à tester)

Figure 13 : dispositif en circuit fermé (Fontar et Thomas, 1987)

Un autre type de dispositif très utilisé dans les études sur l'allélopathie est celui dit "en circuit fermé" (QASEM et HILL, 1988) (figure 13).

Celui-ci se compose de deux rigoles. Sur l'une sont placées des pots contenant les plantes donneuses en alternance avec des pots contenant des plantes receveuses. Sur l'autre rigole ne sont placés que des "pots donneurs" (cette rigole constituant le témoin).

Au dessus de ces rigoles est suspendu un système d'irrigation par goutte à goutte (chaque pot est alimenté individuellement), alimenté par un réservoir de solution nutritive. Le fait que chaque pot soit irrigué séparément élimine toute compétition possible pour les éléments nutritifs.

L'excès de solution qui percole des pots entraîne les substances excrétées par les racines, est récupéré dans des récipients en plastique situés en contrebas, et réutilisé après ajustement de la conductivité électrique et du pH (pour éviter l'épuisement éventuel de la solution nutritive).

Beaucoup d'auteurs dans leurs études sur l'allélopathie récupèrent les exsudats racinaires en les extrayant du milieu de culture dans lequel ils font pousser les plantes donneuses:

Par exemple BONNER et BASTON en 1944 isolent l'acide t-cinnamique dans des exsudats racinaires de gayules en concentrant l'eau distillée dans laquelle ces plantes sont restées une journée.

En 1977, FAY et DUKE déterminent la présence de scopoletin dans les exsudats racinaires de gayules en lavant le sable dans lequel elles poussaient (lavage tous les 7 jours).

Enfin KALBURTZI et al (1989) se servent dans leur étude d'un système décrit avant eux par PAPADAKIS (1977) (cité dans KALBURTZI, 1989) : ils utilisent deux réservoirs cubiques, de taille différente. Le petit réservoir, percé de trous, contient de la perlite sur laquelle ils font germer des graines. Ce petit réservoir est placé dans le grand rempli de solution nutritive; celle-ci peut donc mouiller la perlite, et les exsudats racinaires provenant des plantules du petit réservoir peuvent diffuser dans la solution nutritive.

Les graines sont laissées en place 7 jours.

Lorsque l'analyse biochimique des exsudats racinaires n'est pas envisagée, il existe une méthode simple pour l'étude des effets allélopathiques de ces exsudats racinaires : faire pousser les plantes tests dans un milieu de culture dans lequel ont poussé auparavant les plantes donneuses pendant plusieurs jours.

IRONS et BURNSIDE procèdent de cette manière en 1982 : ils font pousser leur plante donneuse en milieu hydroponique (avec solution nutritive), après plusieurs jours, ils retirent la plante donneuse de ce milieu de culture et y placent leurs plantes receveuses.

Si nous avons décrit ces différents dispositifs en détail, c'est pour analyser les avantages et inconvénients de chacun afin de mettre au point notre propre dispositif, que nous présentons dans la partie "mise en évidence des phénomènes allélopathiques d'exsudats racinaires du *calopogonium*".

b) les tests biologiques

Les tests biologiques sont des outils utiles pour détecter une activité physiologique de composés allélopathiques sur les plantes (LEATHER et EINHELLIG, 1985).

Il n'y a pas de test parfait qui répondra à toutes les conditions pour détecter la bioactivité de composés allélopathiques et il serait prudent d'en utiliser plusieurs pour chaque cas d'interaction allélopathique suspecté. Le test sélectionné peut dépendre du mode d'action présumé du composé allélopathique. Par exemple, un test de germination ne serait pas le test à choisir pour un inhibiteur de la photosynthèse. Il dépend également de la sensibilité requise pour la détection (LEATHER et EINHELLIG, 1986).

Pour tester l'action d'exsudats racinaires, les tests biologiques couramment utilisés, d'après la bibliographie, sont les suivants :

- test de germination

Le test biologique le plus utilisé dans les études sur l'allélopathie est l'inhibition (ou parfois la stimulation) de la germination de graines (LEATHER et EINHELLIG, 1986).

Il existe peu de standardisation en ce qui concerne les tests de germination. Même les rapports provenant d'un même laboratoire diffèrent dans la conduite des essais.

En général, un test de germination est conduit en boîte de Pétri en plaçant les espèces de graines sélectionnées sur des papier filtre ou du sable saturés avec la solution test.

Les graines sont placées dans une chambre de culture avec un cycle jour/nuit et un régime de température optimum pour la germination des graines sélectionnées.

La germination est habituellement définie comme l'émergence de la radicule de 2mm au-delà de la capsule et est notée pendant une période de temps, généralement 1-7 jours selon les espèces (PUTNAM et TANG, 1986).

Le plus souvent, les résultats des tests de germination sont exprimés en pourcentage de germination.

LEATHER et EINHELLIG en 1986 trouvent que de nombreux facteurs altèrent la germination lors des tests : la température, l'alternance jour/nuit, la disponibilité d'oxygène, le potentiel osmotique et d'autres interférences.

Le taux d'inhibition est également affecté par les propriétés de la solution, la température et lumière.

Une autre précaution qui doit être observée est le volume de solution par boîte de Pétri. Il varie bien entendu avec la taille de la boîte et le substrat utilisé.

Enfin, un nombre abondant de graines et de répétitions doit être utilisé pour l'analyse statistique. PUTNAM et TANG (1986) conseillent un minimum de 6 répétitions de 50 graines chacune, bien que le nombre de graines par boîte dépende de la taille de ces dernières.

- test d'élongation de la radicule et/ou du coléoptile

Des graines prégermées sont placées sur un papier filtre Whatman n°3 saturé avec 1 ml de la solution test.

La longueur des radicules et/ou du coléoptile est mesurée 24 h plus tard. Ces mesures sont souvent compliquées par la torsion et les autres altérations de la morphologie (PUTNAM et TANG, 1986).

- test de croissance des parties aériennes

Les plantes receveuses sont arrosées quotidiennement avec un mélange de solution nutritive et d'exsudats racinaires.

Au bout d'une période qui varie selon les auteurs, on procède à une série de mesures. La hauteur de la plante, les poids frais et secs sont classiquement mesurés, mais d'autres paramètres peuvent être pris en compte.

Les plantes peuvent être divisées en partie aérienne et partie racinaire, permettant la comparaison des effets sur ces deux aspects de la croissance.

Bien que ce test soit relativement sensible, son inconvénient est le travail et le temps requis ainsi que la quantité de composés allélopathiques nécessaire.

Bien que nous discutons des tests de croissance séparément des essais de germination, beaucoup d'auteurs utilisent les deux.

IV- CONCLUSION

Cette partie bibliographie nous a permis, non seulement d'avoir une idée de la nature des composés allélopathiques et des effets qu'ils pouvaient provoquer sur les plantes, mais également de savoir quelles étaient les principales techniques utilisées pour mettre en évidence ces effets.

Grâce à l'étude des travaux déjà réalisés, nous avons pu élaborer une méthode de récolte d'exsudats racinaires et mettre en place des tests, en étant averti des difficultés rencontrées par nos prédécesseurs.

deuxième partie :

**Mise en évidence
des phénomènes allélopathiques
d'exsudats racinaires du calopogonium**

2° partie Mise en évidence des phénomènes allélopathiques d'exsudats racinaires du calopogonium

Afin de déterminer si les exsudats racinaires du calopogonium pouvaient affecter le développement de plantes, il convenait de mettre au point une méthode expérimentale qui permettrait de mettre en évidence des effets éventuels allélopathiques, méthode inspirée de celles rencontrées dans la bibliographie.

I- MATERIEL ET METHODES

La première étape de notre travail fut de choisir les plantes sur lesquelles nous testerions les exsudats racinaires du calopogonium.

1. Matériel végétal

Le choix des plantes utilisées résulte des observations effectuées par les agronomes travaillant sur le terrain et qui ont été à l'origine de cette étude.

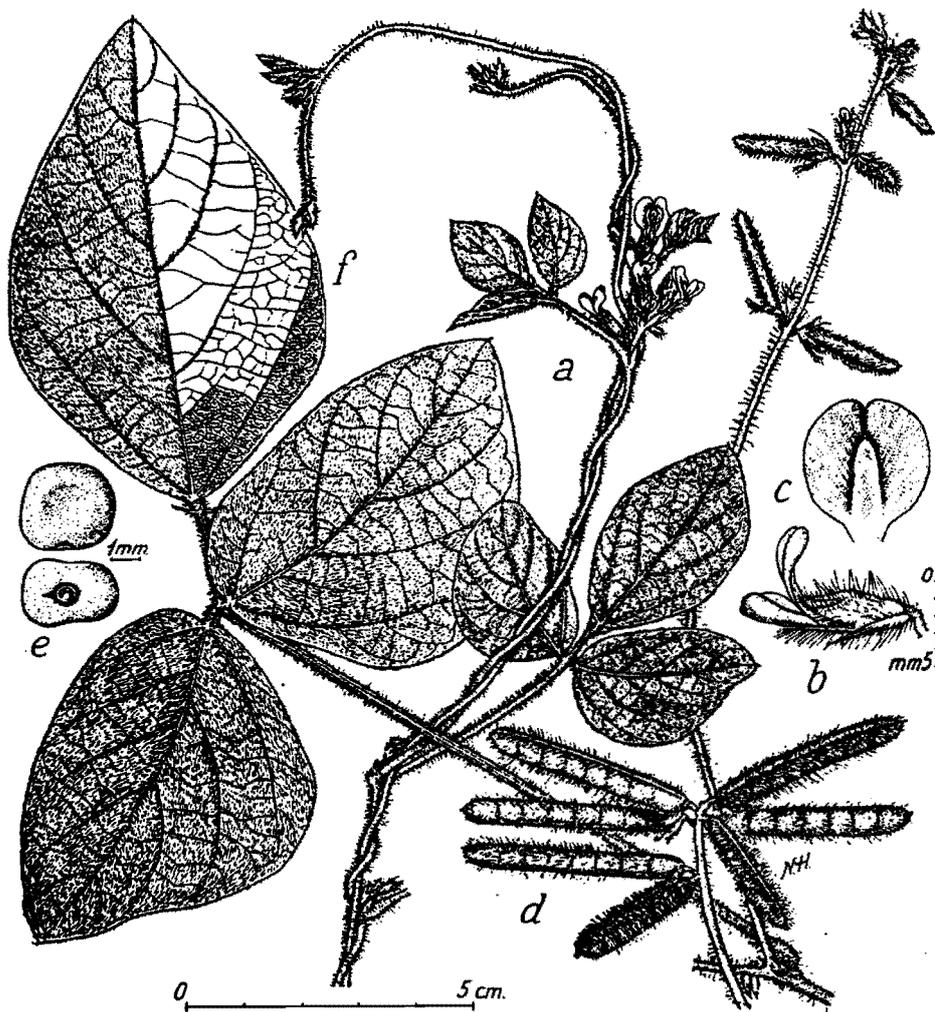
Calopogonium mucunoides, la plante productrice d'exsudats, est une plante de couverture qui a été introduite dans les systèmes de culture au Brésil, à la Réunion et en Côte d'Ivoire par ces agronomes.

Le but de cette étude était de tester l'action des exsudats racinaires du Calopogonium à la fois sur des plantes de culture et sur des adventices.

Pour ce faire, nous avons choisi 25 espèces africaines comme adventices, auxquelles nous avons fait subir des tests de germination afin de sélectionner les graines ayant le meilleur pourcentage de germination. Après cette présélection, 5 espèces ont été retenues :

- *Euphorbia heterophylla* (Côte d'Ivoire), *Tridax procumbens* (Cameroun), *Chromolaena odorata* (Côte d'Ivoire), pour leur très bon pourcentage de germination,
- *Digitaria horizontalis* (Cameroun) et *Rottboellia exalta* (Cameroun) pour leur large utilisation en Afrique.

Cependant, lors des tests, beaucoup de ces plantes n'ont pas bien germé. D'autres, lors de la mise en pot, ne se sont pas développées, ou de façon trop hétérogène au sein d'un même pot pour être utilisables dans les essais biologiques. Tous ces aléas nous ont conduit à éliminer certaines espèces dont le nombre de pots n'était pas assez important pour que l'on ait suffisamment de répétitions. Seule *Euphorbia heterophylla* fut donc retenue comme adventice.



— *Calopogonium mucunoides* Desv. a : rameau grimpant fleuri; b : fleur de profil; c : étendard de face; d : fruits mûrs; e : graines, face et profil.

Figure 14 : *Calopogonium mucunoides* Desv. (Botton, 1958)

Comme plante de culture, nous avons voulu tester des plantes répandues en Afrique tropicale, telles que le riz, le maïs, l'arachide, le coton. Mais le coton ne s'est jamais développé de façon harmonieuse en serre et fut donc éliminé.

Dans les deux paragraphes ci-dessous, nous présentons les caractéristiques principales de *Calopogonium mucunoides*, la plante productrice d'exsudats racinaires, et celles d'*Euphorbia heterophylla*, plante adventice receveuse.

a) *Calopogonium mucunoides* Desv.

Calopogonium mucunoides est une dicotylédone de la famille des Fabacées, utilisée comme plante de couverture (BOTTON, 1958 ; SKERMAN, 1982) (figure 14).

Description morphologique : Plante vigoureuse, rampante et volubile, touffue, formant un enchevêtrement de feuillage de 30 à 40 cm d'épaisseur. Tiges succulentes, couvertes de longs poils bruns, avec partie inférieure rampante ; racines adventives aux noeuds en contact avec le sol. La partie supérieure des tiges est volubile. Feuilles à trois folioles velues sur les deux faces. Foliole terminale largement ovale à ovale losangée ; les folioles latérales sont obliques et largement ovales, de 4 à 5 cm de long et un peu moins de large. Stipules petites et triangulaires. Petites fleurs, bleues, tachées de jaune-vert, de 4 à 12 sur des racèmes axillaires courts à pédoncules velues. Gousses linéaires, aplaties, de 2,5 à 4 cm de long, jaune-brun, densément couvertes de longs poils raides, à 4-8 graines. Graines larges, allongées ou carrées à angles arrondis, aplaties, brun clair ou foncé, unies, d'environ 3,5 * 2,5 mm (BARNARD, 1969, cité par SKERMAN, 1982).

Répartition : Indigène en Amérique du Sud tropicale, largement répandue comme plante de couverture ou mauvaise herbe dans l'ensemble des tropiques.

Saison de croissance : Plante pérenne en conditions humides ; autrement annuelle à ressemis naturel.

Température optimale de croissance : Adaptée aux zones tropicales chaudes et humides.

Régime pluviométrique : en général, au moins 1125 mm et de préférence davantage.

Tolérance à la sécheresse : Peut mourir en saison sèche et repartir en saison des pluies, à partir des graines, comme une plante annuelle, ou simplement perdre des feuilles. Selon la rigueur de la saison sèche.

Tolérance à l'excès d'eau : Excellente.

Aptitude à la propagation naturelle : Excellente en milieu humide et fertile, où elle tend à devenir une mauvaise herbe. Les graines sont également disséminées par les oiseaux.

Réaction à l'éclairement : Peut pousser avec peu d'éclairement, à l'ombre de graminées de haute taille et en couverture sous les plantations.

Aptitude à rivaliser avec les adventices : Excellente. Supprime rapidement les mauvaises herbes et, dans certains cas, devient elle-même adventice.

Vigueur et rythme de croissance : Plante très vigoureuse, donnant un couvert fermé en 4 à 5 mois (CROWDER, 1960, cité par SKERMAN, 1982).

Qualités principales : Croissance rapide et vigoureuse, bonne couverture du sol en tant que légumineuse pionnière sur les brûlis de brousse. S'établit facilement. Nodulation efficace et tolérance à l'humidité. Les feuilles donnent une litière abondante. Adapté à des sols pauvres, c'est un bon reconstituant humique de ceux-ci. Particulièrement recommandé dans les terrains nouvellement défrichés ou dans de jeunes plantations. Intéressant sur défrichage pour contrôler la végétation adventice.

Défauts principaux : Inappétibilité relative, vie courte, sensibilité à la sécheresse. En saison sèche, la plante meurt et peut constituer un danger d'incendie. En culture, elle demande à être surveillée pour ne pas envahir la culture principale.

b) *Euphorbia heterophylla* L.

Euphorbia heterophylla est une dicotylédone de la famille des Euphorbiacées (MERLIER et MONTEGUT, 1982 ; LEBOURGEOIS, GRARD, MERLIER, à paraître).

Description morphologique : La plante a un port dressé. La tige est creuse, exsudant un latex blanc. Des stipules glandulaires très réduites sont présentes à la base des pétioles. Les feuilles sont de forme variable, opposées à la base et paraissent opposées au niveau des inflorescences. Les inflorescences sont groupées en cymes terminales, dans des cupules ne portant qu'une seule glande.

Répartition : Espèce originaire d'Amérique tropicale et subtropicale, maintenant répandue dans les pays tropicaux.

Biologie : *Euphorbia heterophylla* est une espèce annuelle. Elle se reproduit par graines.

Ecologie : Espèce rudérale, très nitrophile. Elle se développe dans les régions dont la pluviométrie est supérieure à 1100 mm, dans les sols bien structurés et fertiles.

Après avoir choisi le matériel végétal, notre deuxième préoccupation fut de mettre au point un dispositif de récolte d'exsudats racinaires.

2. La production d'exsudats racinaires

Si l'on regarde la bibliographie (cf tableau 2) concernant les dispositifs d'exsudats racinaires, on se rend compte qu'il en existe de nombreux, mais aucun ne nous satisfaisait véritablement.

En effet, en ce qui concerne les dispositifs suivants : marche d'escalier, Vikkii, circuit fermé, et tubes en U, ceux-ci présentaient à nos yeux deux inconvénients fondamentaux.

Tout d'abord, les exsudats des plantes donneuses et receveuses sont mélangés. Chaque plante est à la fois donneuse et receveuse. Ainsi, au cours des arrosages successifs du dispositif test, chaque plante receveuse reçoit une solution contenant ses exsudats racinaires et ceux de la plante donneuse. C'est l'action d'un mélange d'exsudats qui est testée. Or, c'est l'action exclusive des exsudats racinaires du calopogonium qui nous intéressait.

De plus, dans ces dispositifs, les exsudats sont concentrés (recyclage dans le dispositif en marche d'escalier et dans le Vikkii, accumulation dans le circuit fermé et les tubes en U). Or, notre objectif était de tester des plantes par arrosage avec des solutions contenant des exsudats racinaires en concentration naturelle.

Dans le "continuous root exudate trapping system" (CRETS), on ne récupère que les exsudats des plantes donneuses mais ceux-ci, encore une fois, sont concentrés : le mélange exsudats racinaire + solution nutritive passe à travers une résine XAD-4 qui piège les composés allélopathiques hydrophobes, tandis que le reste du mélange est recyclé pour irriguer à nouveau la plante donneuse. La résine, qui reste en place plusieurs jours, accumule donc les composés allélopathiques au cours des différentes irrigations.

Les résines sont ensuite éluées et la solution récupérée sert de produit d'arrosage pour les tests. Le produit d'éluion étant le méthanol, il est impossible de se servir du produit d'éluion tel quel pour les arrosages ; il faut au préalable évaporer le méthanol et reprendre les substances restantes dans l'eau. Cette technique présente deux principaux inconvénients :

- elle est longue et complexe
- les différentes étapes de préparation de la solution d'arrosage peuvent conduire à la modification des composés présents dans les exsudats et à la pollution de cette solution.

Dans le dispositif des joints en T, les exsudats s'accumulent pendant une semaine avant d'être récoltés. Ils ne sont donc pas non plus en concentration naturelle.

Le système des cultures hydroponiques dans lequel les plantes poussent dans l'eau ne reproduit pas quant à lui des conditions normales de développement. Enfin, dans ce dispositif également, les composés allélopathiques s'accumulent.

Nous avons donc adopté un dispositif de récolte d'exsudats différent de tous ceux rencontrés dans la bibliographie.

Nous avons mis au point un système permettant de récupérer les exsudats d'une plante donneuse, ceux-ci contenant des composés allélopathiques en concentration naturelle.

Notre dispositif se compose de 4 bacs de 28 litres, contenant chacun 25 kg de sable dans lequel sont plantés (le 20 juillet) une vingtaine de pieds de calopogonium. (figure 15). Chaque bac est légèrement incliné de façon à permettre à la solution nutritive apportée en léger excès d'entraîner les substances excrétées par les racines (par un phénomène de lavage) vers une évacuation située dans la partie inférieure de chaque bac, pour permettre la récupération des solutions de lavage dans des bouteilles en verre teinté.

Au mois d'août, une toile d'ombrage est installée au-dessus des bacs.

Début octobre, l'éclairement journalier est allongé grâce à des lampes que l'on allume de 7 à 9 heures le matin et de 18 à 20 heures le soir.

L'irrigation est assurée par un système de goutteurs, au nombre de 10 par bac.

Une pompe permet d'acheminer la solution nutritive (composition en annexe 3) contenue dans un réservoir de 20 litres vers les goutteurs. Cette pompe assure un débit de 0,9 litres par goutteur et par heure. La quantité de solution nutritive distribuée varie de 1 à 2 litres par bac et par jour (selon l'évaporation observée), répartis en 6 irrigations de 1 à 2 mn dans la journée.

Selon la température et l'éclairement, on récupère plus ou moins de solution dans les bouteilles.

Ces solutions sont récupérées quotidiennement pour servir de base d'arrosage dans les tests de croissance présentés dans le paragraphe suivant.

3. Les test de croissance

Les tests de croissance sont très utilisés dans les études sur l'allélopathie (cf tableau 2).

Dans ces tests, le choix des critères à mesurer varie selon la plante, le degré de précision que l'on souhaite obtenir et selon les moyens techniques mis à disposition.

Nous disposons d'un logiciel de mesure de la surface foliaire, ce qui nous a permis de mesurer facilement ce critère. La surface foliaire correspond à la capacité de photosynthèse et de croissance de la plante.

L'autre critère que nous avons pris en compte à chaque fois est le poids sec. Cette mesure est classiquement admise dans la bibliographie. Il rend compte du résultat de la photosynthèse nette, c'est à dire de la capacité qu'a la plante de traduire l'absorption du CO₂ en biomasse.

Lors d'une deuxième série de tests, nous avons compté le nombre de feuilles en distinguant parfois le nombre de feuilles total (caractéristique du développement de la plante) et le nombre

de feuilles sèches (caractéristique de la sénescence), ou le nombre de feuilles sur la tige principale et sur les rameaux.

Le principe des tests est le suivant :

Les plantes sont divisées en deux groupes qui sont arrosés quotidiennement (en fonction de l'évapotranspiration journalière, mesurée en pesant tous les pots chaque jour) chacun avec une solution différente:

- un groupe est arrosé avec une solution nutritive "neuve" (SN), issue du réservoir dans lequel puise la pompe alimentant les goutteurs. Ces plantes sont considérées comme des plantes témoins.

- un groupe est arrosé avec la solution collectée quotidiennement dans les bouteilles de récupération, solution contenant les exsudats racinaires et que nous désignons par la suite par les initiales SE (pour solution d'exsudats). Nous qualifions par la suite ces plantes de "plantes traitées".

Les plantes traitées et les plantes témoins sont placées sur une table différente de celle sur laquelle se trouvent les calopogonium, dans des pots séparés, selon une disposition en randomisation complète.

Ce dispositif permet d'éviter les facteurs de concurrence entre les plantes donneuses et receveuses.

De plus, les pots sont remplis de sable (sable siliceux de granulométrie 1), ce qui limite les interférences que pourrait causer le substrat en ce qui concerne la quantité des composés allélopathiques disponibles, leur nature et leur activité.

On plante de trois à quatre graines prégermées par pot, pour pouvoir démarier les plantes par la suite (environ 7 jours après) et ne garder que les deux plus belles et les plus homogènes.

Trois à quatre jours après la mise en pot, on commence à arroser avec une solution nutritive diluée deux fois (auparavant, on n'utilisait que de l'eau), et trois à quatre jours plus tard, on passe à une solution nutritive non diluée.

Une fois que le traitement a commencé, on récupère et on mélange tous les jours les solutions percolées dans les 4 bouteilles. Ces solutions d'exsudats servent de jus d'arrosage pour les plantes traitées. On ajuste ensuite les pots à 15 % d'humidité en arrosant avec la solution d'exsudats ou la solution nutritive, selon la nature du traitement envisagé.

Avant chaque arrosage, le pH est contrôlé à l'aide d'un pH-mètre et ajusté entre 6 et 6,5 par addition d'acide nitrique ou de soude, si nécessaire..

L'observation d'une différence de comportement entre les plantes traitées et les plantes témoins a donc de grandes chances d'être le résultat de l'action des composés allélopathiques exsudés par les racines du calopogonium.

Pour étudier les effets sur la croissance, nous avons procédé à deux série de tests. En effet, la première série avait pour but de vérifier un éventuel effet des exsudats. Cet effet observé, nous avons mis en place une deuxième série de tests en mesurant des paramètres supplémentaires afin de confirmer les résultats du premier test et d'affiner nos conclusions.

a) 1° série de tests

Cette première série de tests s'est déroulée du 4 août au 7 septembre ; les températures de la serre étaient de l'ordre de 27 °C (température moyenne durant cette période).

Parmi les plantes adventices et de culture choisies au départ (cf choix du matériel végétal), seules les suivantes ont été retenues :

- le riz et l'arachide comme plantes de culture
- *Euphorbia hétérophylla* comme adventice
- le calopogonium pour tester un éventuel effet d'auto-toxicité

Les graines prégermées sont mises en pot et portées en serre le 4 août. On utilise un pot blanc fermé de 17 g, qu'on remplit avec 483 g de sable. On ajuste à 15 % d'humidité pour atteindre un poids de 575 g (poids du pot + sable + eau).

On commence les traitements quand les plantes ont 15 jours. A cette date (19 août), les calopogonium sont âgés d'un mois.

Chaque jour, on pèse les pots avant l'arrosage et on note le poids exact auquel on ajuste, ceci pour pouvoir mesurer l'évapotranspiration journalière de chaque plante (l'utilisation de pots fermés permet cette manipulation).

Quand les plantes ont 19 jours, on baisse l'ajustement d'humidité à 7 % (poids du pot + sable + eau = 545 g), car les arachides semblent souffrir d'un excès d'eau.

Le 26 août, quand les plantes ont 3 semaines, on installe une toile d'ombrage au-dessus de ces dernières, pour les protéger d'un excès d'éclairement.

Pour le calopogonium et l'arachide, les différents arrosages sont arrêtés quand ces deux plantes sont âgées de 29 jours et ont donc subi 13 jours de traitement. On mesure alors leur surface foliaire et le poids de leur matière sèche produite.

On attend que l'euphorbe et le riz soient âgés de 34 jours et aient donc subi 19 jours de traitement pour procéder aux mêmes mesures (le 7 août). En effet, sur ces deux espèces, on pouvait observer visuellement des différences physiologiques entre les pots traités et témoins. Il

nous a donc semblé opportun d'attendre que ces différences soient plus marquées pour arrêter les différents d'arrosages.

Les résultats de cette 1^o série de test, présentés dans la partie "résultats", nous ont conduit à mettre en place une deuxième série de tests.

b) 2^o série de tests

Cette dernière série de tests biologiques s'est déroulée du 6 octobre au 17 novembre. Pendant cette période, les températures étaient de l'ordre de 17°C (température moyenne durant cette période).

Le 6 octobre, les graines des plantes choisies sont mises à prégermer et en pot ; après cette première étape, on ne retient que les plantes suivantes :

- riz (6 répétitions), maïs (6 répétitions) et arachide (4 répétitions)
- *Euphorbia heterophylla* (5 répétitions)
- *Calopogonium mucunoides* (5 répétitions)

Les pots utilisés sont des pots noirs, troués (on place un filtre dans le fond du pot pour éviter que le sable ne s'échappe) et permettant donc le drainage, pesant environ 15 g. Le poids du pot + filtre + sable = 1200 g. On ajuste à 12,5 % d'humidité en ajoutant de l'eau jusqu'à 1350g.

Les pots sont d'abord placés en chambre de culture. Dans celle-ci, les conditions de température, hygrométrie et éclairage sont beaucoup plus propices (cf annexe 4) au bon développement des jeunes plantules que dans la serre, dans laquelle les températures nocturnes du mois de septembre peuvent descendre relativement bas et où l'éclairage est loin d'être optimal.

On transporte en serre le maïs, le riz, le calopogonium et l'euphorbe 6 jours après la mise en pot. Ce jour-là, on commence également les différents traitements.

En ce qui concerne l'arachide, dont le développement est plus lent, on attend 5 jours de plus pour la transporter en serre et commencer les différents traitements.

Les exsudats racinaires utilisés pour arroser les plantes sont issus de calopogonium plantés le 16 septembre dans trois bacs. Quand les arrosages du maïs, riz, calopogonium et euphorbe commencent, les plantes donneuses ont donc 26 jours ; elles sont âgées de 31 jours quand on débute les arrosages de l'arachide.

Début novembre, toutes les plantes (hormis les bacs de calopogonium) sont ramenées dans la chambre de culture, car l'éclairage et la température en serre sont insuffisants pour leur assurer un bon développement.

On arrête les traitements quand les plantes ont 40 jours, ce qui représente 29 jours de traitement pour les arachides, 34 jours pour le riz et maïs et 35 pour l'euphorbe et le calopogonium.

Parmi les plantes de cette série se trouvent des euphorbes mises en pot le 8 septembre. Ce n'est que le 12 octobre, alors qu'elles sont âgées de 34 jours, qu'on les transporte en serre et qu'on débute les traitements, en même temps que les plantes de la deuxième série de tests. On arrête de les traiter alors qu'elles ont un peu plus de 2 mois de traitement. Nous les appellerons par la suite les euphorbes'.

Nous avons procédé à une analyse minérale pour toutes les plantes excepté le calopogonium, qui ne réagit pas aux arrosages de SE. Pour une même espèce, deux échantillons étaient constitués : un premier composé des quatrième et cinquième feuilles de toutes les plantes traitées, le deuxième des quatrième et cinquième feuilles des plantes témoins. Cette analyse portait sur la mesure de la teneur en azote, en phosphore, en potassium, en calcium, en fer, en cuivre, en manganèse, en zinc et en silice.

Après ces tests de croissance nous avons procédé à des tests de germination, présentés dans la partie suivante.

4. Les tests de germination

Les tests de germination sont les tests les plus utilisés dans toutes les études sur l'allélopathie.

Il n'existe pas de méthode standardisée pour évaluer les effets de l'allélopathie sur la germination. Nous nous sommes donc inspiré de toutes les techniques adoptées par les différents auteurs pour mettre au point la notre, en essayant de reprendre les pratiques les plus usuelles ou celles qui nous paraissaient les meilleures.

Nous avons procédé à deux séries de tests de germination, la deuxième étant mise en place pour confirmer les résultats de la première. La première série s'étalant du 19 au 26 octobre, la deuxième du 23 au 30 novembre.

Lors de la première série, nous avons testé les espèces suivantes :

- riz (IRAT 110)
- *Euphorbia heterophylla*
- *Calopogonium mucunoïdes*

En ce qui concerne la deuxième série de tests, seule l'euphorbe a été testée, celle-ci étant la plante réagissant le mieux aux différents traitements (cf résultats).

Les conditions expérimentales se résument comme suit :

- nombre de répétitions : 5 dans la première série de tests, 8 dans la deuxième,
- nombre de graines par boîte : 25 pour le riz, 30 pour le calopogonium et 35 pour l'euphorbe,
- 2 substrats (dans boîte de Pétri) : papier filtre (Whatman, 110 mm) et sable (sable siliceux de granulométrie 1 ; 50 g de sable par boîte),
- 3 traitements : eau distillée, solution nutritive (celle utilisée pour irriguer les calopogonium) et solution d'exsudats racinaires.

Les boîtes de Pétri sont placées en salle de culture.

Lors de la première série de test, elles se trouvent sur un compartiment dont on n'allume pas les lampes mais qui est éclairé par les compartiments voisins. Lors de la deuxième série de tests, les boîtes sont placées sous un compartiment (l'éclairage étant à peu près équivalent à celui régnant lors du premier test).

Le premier jour, on apporte 10 ml de solution d'irrigation (eau distillée, solution nutritive ou d'exsudats racinaires selon les boîtes) dans chaque boîte remplie de sable, et 3 ml dans les boîtes avec papier filtre. Les solutions d'exsudats servant de jus d'arrosage sont récoltés dans les bouteilles teintées juste avant d'être utilisés.

Par la suite, on apporte tous les jours de 0,5 à 1 ml de solution, selon l'évaporation qui s'est produite dans chaque boîte. On fait en sorte que les graines soient dans un milieu optimal pour leur germination.

Tous les jours, on compte le nombre de graines germées : la germination est appréciée lorsque la longueur de sa radicule est d'environ 2 mm.

Les graines germées et/ou pourries sont enlevées quotidiennement afin qu'elles ne gênent pas la germination des graines suivantes.

On comptabilise le nombre de graines germées pendant 7 jours.

Pour s'assurer que la baisse du pourcentage de germination dans les boîtes arrosées avec les exsudats n'est pas due à des phénomènes de pression osmotique, cette dernière a été mesurée dans toutes les boîtes avec papier filtre, à partir du jus d'arrosage restant en excès le huitième jour.

Les résultats de ces différents tests sont présentés dans la partie suivante.

II- PRESENTATION DES RESULTATS

1. Résultats des tests de croissance

Les résultats des mesures effectuées sur les plantes tests et témoins sont comparés à l'aide d'un test statistique de comparaison de moyenne : le test de Student. Pour analyser les résultats des mesures nous avons utilisé le logiciel statistique STATITCF.

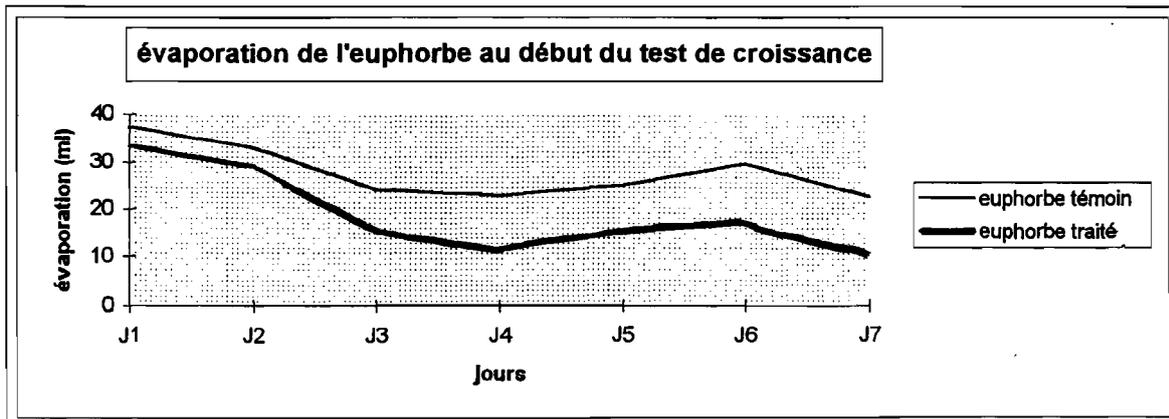
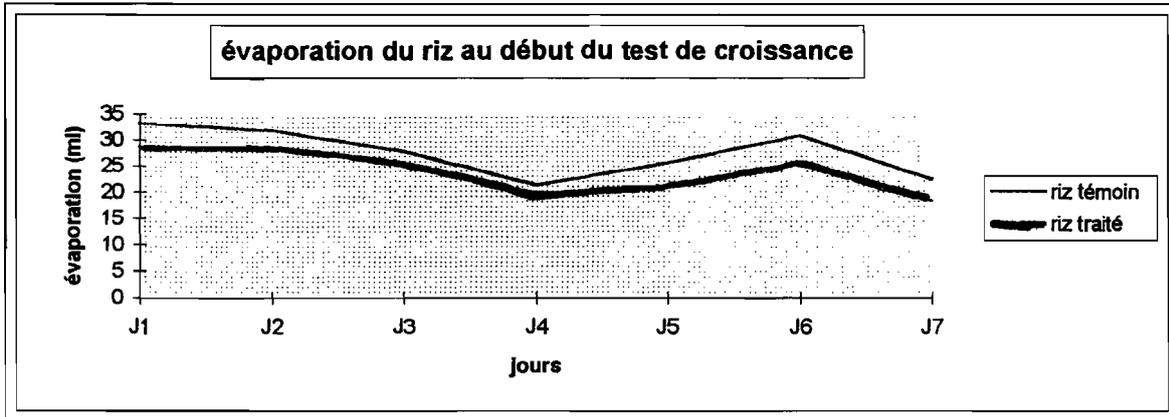
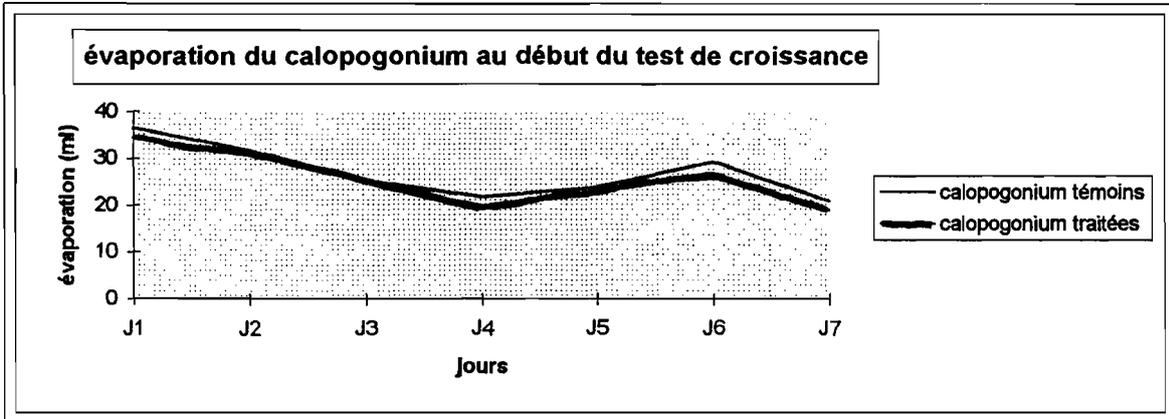
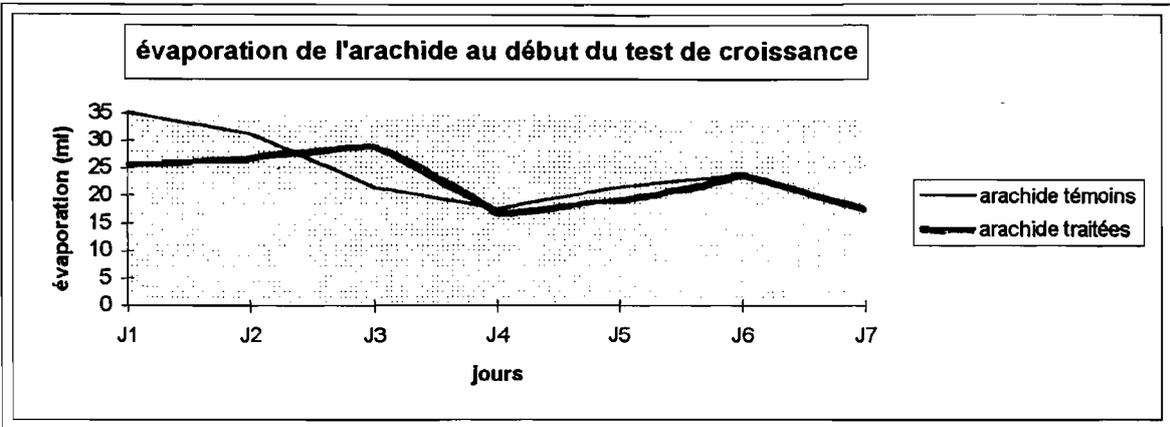
a) 1° série de tests

Les matières sèches et les surfaces foliaires sont les deux seuls paramètres mesurés (tableau 3) :

espèces	plantes	poids moyen de la matière sèche (g)	surface foliaire moyenne (cm ²)
<i>arachide</i>	témoins	0.88	92.78
	traitées	0.64	60.24
<i>calopogonium</i>	témoins	0.43	64.26
	traitées	0.39	48.81*
<i>riz</i>	témoins	0.75	80.52
	traitées	0.51*	62.55*
<i>euphorbe</i>	témoins	0.56	77.23
	traitées	0.23*	27.81*

* moyennes significativement différentes au seuil $\alpha = 0.05$ (test de Student)

tableau 3 : résultats de la 1° série de tests de croissance



valeurs d'évaporation des plantes de la 1^o série de tests

En ce qui concerne l'arachide, aucune différence significative entre les plantes traitées (arrosées par la solution d'exsudats) et les plantes témoins n'est observée.

Chez le calopogonium, les surfaces foliaires des plantes traitées sont inférieures à celles des plantes témoins.

Chez le riz, la différence entre les plantes traitées et témoins est significative aussi bien au niveau de la matière sèche que de la surface foliaire.

Enfin chez l'euphorbe, seule plante sur laquelle les différences entre les pots traités et les témoins sont visibles à l'oeil nu (les plantes arrosées avec les exsudats racinaires dépérissent de jour en jour), le test de Student est significatif à la fois pour les matières sèches et les surfaces foliaires. Les différences sont supérieures à 50 % entre les plantes témoins et traitées.

Dans le tableau ci-dessous sont reportées les valeurs d'évapotranspiration mesurées chaque jour pour les plantes de cette première série de test (tableau 4) :

espèces	plantes	J1 (ml)	J2 (ml)	J3 (ml)	J4 (ml)	J5 (ml)	J6 (ml)	J7 (ml)
<i>arachide</i>	témoins	35	31.25	21.5	17.5	21.5	23.75	17.5
	traitées	25.5	26.5	28.75	16.5	19	23.5	17
<i>calopogonium</i>	témoins	36.5	31.75	25.25	21.75	23.75	29.25	20.75
	traitées	34.5	30.75	24.75	19.75	22.75	26.5	18.75
<i>riz</i>	témoins	33.25	31.75	27.75	21.25	25.5	30.75	22.25
	traitées	28.75	28.25	25.25	19.25	21	25.5	18.25
<i>euphorbe</i>	témoins	37.25	33	24	22.75	25	29.5	22.5
	traitées	33.25	29	15.25	11.5	15	16.75	10.75

tableau 4 : valeurs d'évaporation des plantes de la 1^o série de tests

Nous n'avons reporté dans ce tableau que les valeurs d'évapotranspiration des 7 premiers jours car la particularité intéressante de cette évapotranspiration se situe le premier jour : dès le premier jour d'arrosage avec les solutions différenciées, on observe une nette différence d'évapotranspiration entre les plantes témoins et traitées, notamment pour l'arachide, le riz et l'euphorbe alors que les plantes sont au même stade végétatif, que leur pot ont la même taille et que l'évaporation de l'eau dans ces pots est identique. Cependant, tandis que cette différence se maintient pour le riz et l'euphorbe, les valeurs s'inversent pour l'arachide, la différence n'étant pas constante (figure 16).

c) 2° série de tests

- calopogonium

Les mesures effectuées et reportées dans le tableau 5 sont les suivantes : le nombre de feuilles sur la tige principale, le nombre de feuilles sur les rameaux, le nombre de rameaux, la surface foliaire et la matière sèche des parties aériennes et souterraines.

calopogonium	nb feuilles sur tige	nb feuilles rameaux	nombre rameaux	surface foliaire (cm ²)	ms parties aériennes (g)	ms parties souter. (g)
témoins	14.60	13.60	6.80	379	0.27	0.25
traitées	13.60	11.40	6.80	440	0.17	0.28

tableau 5 : résultats de la 2° série de tests de croissance du calopogonium

Aucun de ces paramètres ne traduit une différence significative entre les plantes traitées et les plantes témoins.

- riz

Nous avons pris en compte les critères suivants : le nombre de feuilles, le nombre de feuilles sèches, le nombre de talles, la surface foliaire, le poids de la matière sèche des parties aériennes et le poids de la matière sèche des parties racinaires (tableau 6) :

riz	nombre de feuilles	nb feuilles sèches	nombre de talles	surf. foliaire (cm ²)	MS parties aériennes(g)	MS parties souter. (g)
témoins	14.83	3.33	4.33	209	1.14	0.45
traitées	14.40	3.60	4.00	208	1.23	0.32*

* moyennes significativement différentes au seuil $\alpha = 0.05$ (test de Student)

tableau 6 : résultats de la 2° série de tests de croissance du riz

Seul le poids de la matière sèche des parties souterraines est significativement différent.

Au niveau de l'analyse minérale, on remarque des différences entre les plantes traitées et témoins (tableau 7 page suivante) :

plantes	N (ppm)	P (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Mg (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)	SiO ₂ (%)
témoins	4.733	0.474	3.288	0.61	0.465	268.1	22.4	47.7	39.3	0.173
traitées	4.902	0.431*	3.381	0.53	0.495	225.7	19	49.7	46.1	0.355

* une différence supérieure à 0.015 ppm pour le phosphore est considérée significative (Mr Oliver, CIRAD)

* une différence supérieure à 5 % est considérée significative pour la silice

tableau 7 : résultats de l'analyse minérale du riz

Les différences les plus remarquables sont les teneurs en phosphore : 0.474 ppm dans les plantes témoins contre seulement 0.431 ppm dans les plantes traitées et en silice : seulement 0.173 % dans les plantes témoins contre 0.355 % dans les plantes test.

- *arachide*

Le nombre de feuilles, le numéro de la première feuille non ramifiée (en partant de la base), la surface foliaire, le poids de la matière sèche des parties aériennes et celui des parties souterraines sont mesurés (tableau 8) :

arachide	nombre de feuilles	1° feuille non ramifiée	surface foliaire (cm ²)	MS parties aériennes (g)	MS parties souter. (g)
témoins	17	6.25	537	3.25	0.74
traitées	17.25	4.25*	511	3.37	0.36*

* moyenne significativement différente au seuil $\alpha = 0.05$ (test de Student)

tableau 8 : résultats de la 2° série de tests de croissance de l'arachide

Le poids de la matière sèche des parties souterraines et le numéro de la 1° feuille non ramifiée sont les deux seuls critères pour lesquels le test de Student est significatif. En ce qui concerne la dernière observation, ceci signifierait que les plantes arrosées avec les exsudats sont moins ramifiées que les plantes témoins.

Les résultats de l'analyse minérale sont reportés dans le tableau 9 :

plantes	N (ppm)	P (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Mg (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)	SiO ₂ (%)
témoins	4.47	0.427	3.103	2.001	0.545	170.2	9.1	28.3	40.5	0
traitées	4.826	0.414	2.599*	1.747	0.462	218	9.1	18.2	40.5	0

* une différence supérieure à 0.10 ppm est considérée significative pour le potassium

tableau 9 : résultats de l'analyse minérale de l'arachide

Les plantes traitées contiennent beaucoup moins de potassium (2.599 ppm) que les plantes témoins (3.103 ppm).

- maïs

Les critères mesurés sont les suivants : le nombre de feuilles, le nombre de feuilles sèches, la surface foliaire, le poids de la matière sèche des parties aériennes et celui des parties souterraines (tableau 10) :

maïs	nombre de feuilles	nb de feuilles sèches	surface foliaire (cm ²)	MS parties aériennes (g)	MS parties souter. (g)
témoins	16.50	6	926	4.99*	2.54
traitées	15.50*	7*	760*	5.69	2.32

* moyennes significativement différentes au seuil $\alpha = 0.05$ (test de Student)

tableau 10 : résultats de la 2^e série de tests de croissance du maïs

Le test de Student est significatif pour le nombre de feuilles, le nombre de feuilles sèches et la surface foliaire.

En ce qui concerne le poids de la matière sèche des parties aériennes, celui des plantes témoins est moins important que celui des plantes traitées (alors qu'on aurait pu s'attendre à un phénomène inverse), cette différence étant significative au seuil de 5 %.

L'analyse minérale nous donne les résultats suivants (tableau 11) :

plantes	N (ppm)	P (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Mg (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)	SiO ₂ (%)
témoins	2.398	0.321	2.536	0.377	0.228	122	7.7	18.7	13.6	0
traitées	2.222	0.201*	2.17*	0.556	0.268	95.8	12.6	15.3	13.5	0

* une différence de 0.10 ppm est considérée significative pour le potassium

* une différence de 0.015 ppm est considérée significative pour le phosphore

tableau 11 : résultats de l'analyse minérale du maïs

Les valeurs en phosphore des plantes traitées sont significativement inférieures à celles des plantes (0.321 ppm pour les plantes témoins contre 0.201 ppm) pour les plantes traitées ainsi que les teneurs en potassium (2.536 ppm pour les plantes témoins ; 2.170 ppm pour les plantes tests).

- *euphorbe*

Le nombre de feuilles, le nombre de feuilles sèches, le nombre de rameaux, la surface foliaire, le poids de la matière sèche des parties aériennes et celui des parties souterraines sont les mesures effectuées (tableau 12) :

euphorbe	nombre de feuilles	nb feuilles sèches	nombre de rameaux	surf. foliaire (cm ²)	MS parties aér. (g)	MS parties souter. (g)
témoins	22.60	7.40*	3.60	242	1.66	0.39
traitées	21	2.25	2.25	287	2.23	0.40

* moyenne significativement différente au seuil $\alpha = 0.05$ (test de Student)

tableau 12 : résultats de la 2^o série de tests de croissance de l'euphorbe

Le nombre de feuilles sèches est significativement moins important pour les plantes traitées que pour les plantes témoins, alors qu'encore une fois, on aurait pu s'attendre à observer le phénomène inverse.

L'analyse minérale présente peu de différences significatives entre les plantes traitées et témoins (tableau 13) :

euphorbe	teneur en N (ppm)	teneur en P (ppm)	teneur en K (ppm)	teneur en Fe (ppm)	teneur SiO ₂ (ppm)
témoins	5.811	0.680*	3.331*	305.4	0.3
traitées	4.531*	0.377	2.575	733	1.010*

* une différence supérieure à 0.08 ppm en azote est considérée significative

* une différence supérieure à 5 % en silice est considérée significative

* une différence supérieure à 0,015 ppm en phosphore est considérée significative

* une différence supérieure à 0,10 ppm en potassium est considérée significative

tableau 13 : résultats de l'analyse minérale de l'euphorbe

On remarque dans ce tableau que la teneur en azote des plantes traitées est significativement inférieure à celle des plantes témoins. Par contre, la teneur en silice est supérieure pour les plantes traitées.

- *euphorbe*'

Les paramètres mesurés sont les suivants : la surface foliaire, le poids de la matière sèche des inflorescences, le poids de la matière sèche des parties aériennes et celui des parties souterraines (tableau 14 page suivante) :

euphorbe'	surface foliaire (cm ²)	Matière sèche inflorescence (g)	MS parties aériennes (g)	MS parties souterraines (g)
témoins	908	0.60	7.32	1.43
traitées	949	0.11*	7.39	1.32

* moyenne significativement différente au seuil $\alpha=0.05$ (test de Student)

tableau 14 : résultats de la 2^o série de tests de croissance de l'euphorbe'

Le test de Student est significatif uniquement pour le poids de la matière sèche des inflorescences.

Ce phénomène peut être dû au fait que les plantes témoins sont plus avancées physiologiquement, et donc que leurs graines sont plus lourdes que celles des plantes traitées. On peut également avancer l'hypothèse suivante : le poids supérieur de matière sèche est dû à un nombre supérieur de graines. Ces phénomènes peuvent être dus soit à une initiation florale des plantes traitées limitée soit à un retard à la floraison de ces mêmes plantes.

Pour vérifier ces hypothèses, il serait intéressant de relever la date de floraison des euphorbes dans les pots traités et témoins.

d) synthèse des résultats de croissance

La remarque la plus importante qui peut être faite au terme de ces expériences est que l'on observe une réponse nette des plantes traitées vis à vis des exsudats, ces exsudats étant utilisés en concentration naturelle. Ceci démontre qu'en conditions naturelles le calopogonium peut avoir une action dépressive sur les plantes avec lesquelles il est en association, aussi bien plantes de culture qu'adventices.

De plus, les résultats des deux tests de croissance nous permettent de tirer d'autres conclusions :

La plante qui réagit le plus aux arrosages d'exsudats se trouve être l'euphorbe, l'effet dépressif étant vérifié aussi bien au niveau des tests de croissance qu'au niveau des analyses minérales.

Le riz et le maïs réagissent de façon moindre.

La réaction du calopogonium et de l'arachide aux exsudats est encore moins nette (le premier réagit lors de la 1ère série de tests mais pas lors de la 2ème ; c'est l'inverse pour l'arachide).

Les exsudats semblent avoir une action sur la croissance des plantes, en provoquant un retard du développement. Ce phénomène se traduit dans nos tests par :

- un retard de floraison de l'euphorbe (2° série),
- une baisse du nombre de ramification sur l'arachide (2° série),
- un nombre de feuilles émises moins important sur le maïs (2° série).

Les analyses minérales nous montrent que la teneur en phosphore et potassium de plantes traitées est généralement inférieure à celle des plantes témoins. Cette différence est la plus marquée chez l'euphorbe.

Lors de la première série de test, sur l'euphorbe, les différences physiologiques entre les plantes témoins et traitées étaient observables à l'oeil nu. Dans la série suivante, ce ne fut plus le cas pour aucune des plantes testées.

Or, les températures de la serre lors du premier test étaient beaucoup plus élevées que lors du dernier test.

Enfin, la mesure des valeurs d'évapotranspiration dans la première série de tests a mis en évidence une différence d'évapotranspiration entre les pots traités et témoins dès le premier jour de traitement.

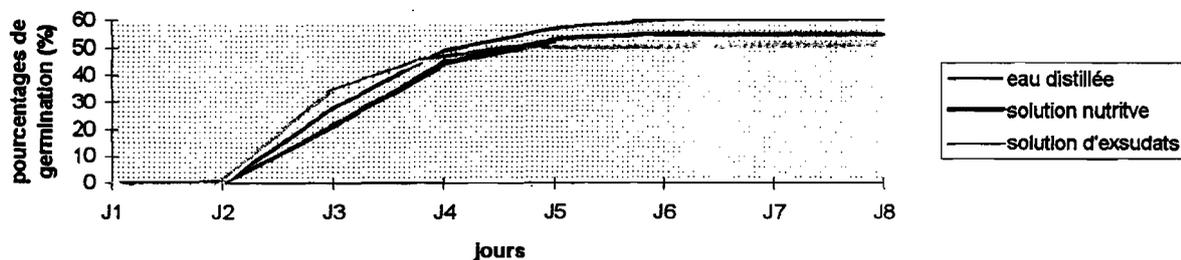
Ces trois observations sont reprises et discutées dans la partie "conclusion-discussion". Dans la partie suivante nous rapportons les résultats des tests de germination, auxquels nous avons procédé après les tests de croissance.

2. Résultats des tests de germination

Les valeurs contenues dans les tableaux suivants rassemblent les résultats de germination exprimés en pourcentage. Pour les comparer, nous avons utilisé le test statistique de Newman et Keuls grâce au logiciel statistique STATICF. Cependant, l'analyse de variance a été effectuée après transformation de ces pourcentages en $\text{Arc sin } \sqrt{(x\%)}$.

Le comptage débute dès que la racine atteint 2 mm : le troisième jour pour le calopogonium et l'euphorbe (le 1er jour étant celui de la mise en place des boîtes dans la salle de culture), le quatrième pour le riz

cinétique de germination du calopogonium sur papier filtre



cinétique de germination du calopogonium sur sable

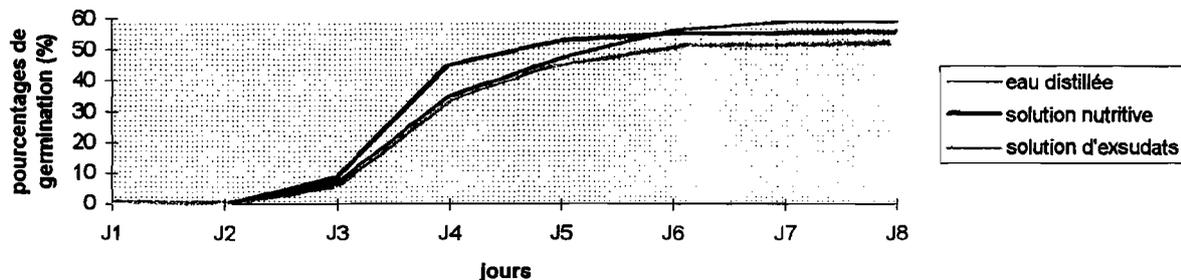


Figure 17 : cinétique de germination du calopogonium

a) 1° série de test

- *calopogonium*

Les résultats de ces tests de germination sont reportés dans les tableaux 15 et 16 :

substrat	1° jour	2° jour	3° jour	4° jour	5° jour	6° jour	7° jour	8° jour
papier filtre								
eau distillée	0 %	0 %	28 %	49 %	57 %	60 %	60 %	60 %
solut° nutrit	0 %	0 %	21 %	45 %	53 %	55 %	55 %	55 %
exsudats	0 %	0 %	33 %	48 %	51 %	51 %	51 %	51 %

tableau 15 : résultats des tests de germination du calopogonium sur papier filtre

substrat	1° jour	2° jour	3° jour	4° jour	5° jour	6° jour	7° jour	8° jour
sableux								
eau distillée	0 %	0 %	7 %	35 %	47 %	56 %	59 %	59 %
solut° nutrit	0 %	0 %	9 %	45 %	53 %	55 %	55 %	56 %
exsudats	0 %	0 %	6 %	34 %	45 %	50 %	51 %	52 %

tableau 16 : résultats des tests de germination du calopogonium sur sable

Le taux de germination est sensiblement le même (pas de différence significative) dans toutes les boîtes, quelle que soit la nature de la solution d'arrosage. On observe ce phénomène aussi bien le 3° que le 7° jour, ce qui montre que le facteur arrosage n'affecte pas non plus la cinétique de germination (figure 17).

Ces constatations sont les mêmes, quelle que soit la nature du substrat utilisé.

- riz

Les tableaux 17 et 18 reprennent les pourcentages de germination observés pour le riz :

substrat	1° jour	2° jour	3° jour	4° jour	5° jour	6° jour	7° jour	8° jour
papier filtre								
eau distillée	0 %	0 %	0 %	79% A	92 %	94 %	95 %	95 %
solut° nutrit	0 %	0 %	0 %	57% B	93 %	97 %	98 %	98 %
exsudats	0 %	0 %	0 %	66% B	94 %	97 %	98 %	98 %

les moyennes possédant les mêmes lettres ne sont pas différentes significativement au seuil $\alpha = 5\%$ (test de Newman et Keuls)

tableau 17 : résultats des tests de germination du riz sur papier filtre

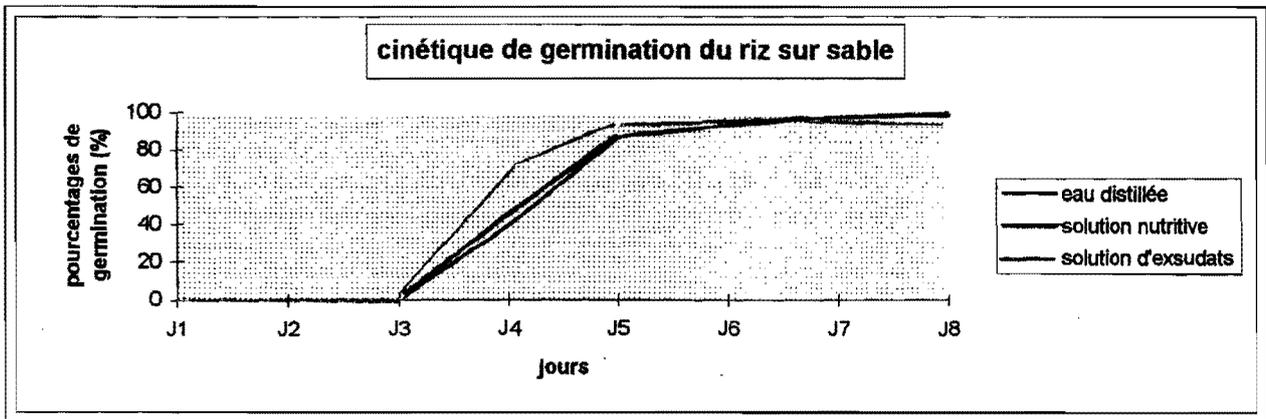
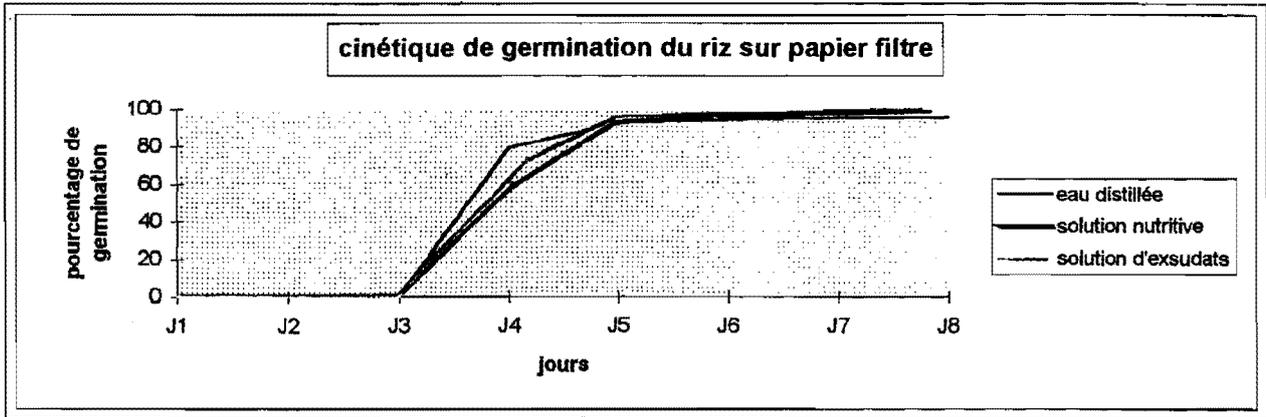


Figure 18 : cinétique de germination du riz

substrat sableux	1° jour	2° jour	3° jour	4° jour	5° jour	6° jour	7° jour	8° jour
eau distillée	0 %	0 %	0 %	39% B	86 %	93 %	97 %	98 %
solut° nutrit.	0 %	0 %	0 %	46% B	86 %	93 %	97 %	98 %
exsudats	0 %	0 %	0 %	70% A	94 %	96 %	96 %	96 %

tableau 18 : résultats des tests de germination du riz sur sable

Le test est significatif uniquement le 4° jour.

Ce jour-là, sur sable, on remarque que les graines arrosées avec la solution d'exsudats germent mieux que les autres. Cet effet positif de la solution d'exsudats sur le pourcentage de germination disparaît les jours suivants.

Toujours le quatrième jour, sur papier filtre, le pourcentage de germination est inférieur dans les boîtes arrosées avec la solution nutritive et la solution d'exsudats par rapport à celles arrosées avec l'eau distillée. Cette différence n'existe plus le lendemain ni le jour suivant. On peut peut-être l'attribuer à une diminution de la vitesse d'imbibition des graines arrosées avec la solution d'exsudats et la solution nutritive par rapport à celle des graines arrosées avec de l'eau distillée.

La figure 18 représente la cinétique de germination du riz.

- *euphorbe*

Les tableaux 19 et 20 présentent les résultats des tests de germination de l'euphorbe :

substrat papier filtre	1° jour	2° jour	3° jour	4° jour	5° jour	6° jour	7° jour	8° jour
solut° nutrit	0 %	0 %	83%	87%A	87%A	87%A	87%A	87%A
eau distillée	0 %	0 %	74 %	81%AB	82%AB	82%AB	82%AB	82%AB
exsudats	0 %	0 %	71 %	75% B	76% B	76% B	76% B	76% B

tableau 19 : résultats des tests de germination de l'euphorbe sur papier filtre

substrat sableux	1° jour	2° jour	3° jour	4° jour	5° jour	6° jour	7° jour	8° jour
eau distillée	0 %	0 %	48 %	62% B	80% B	82% B	83% B	83% B
solut° nutrit	0 %	0 %	61 %	83% B	8 % B	85% B	87%AB	87%AB
exsudats	0 %	0 %	63 %	90%A	91%A	93%A	93%A	9 % A

tableau 20 : résultats des tests de germination de l'euphorbe sur sable

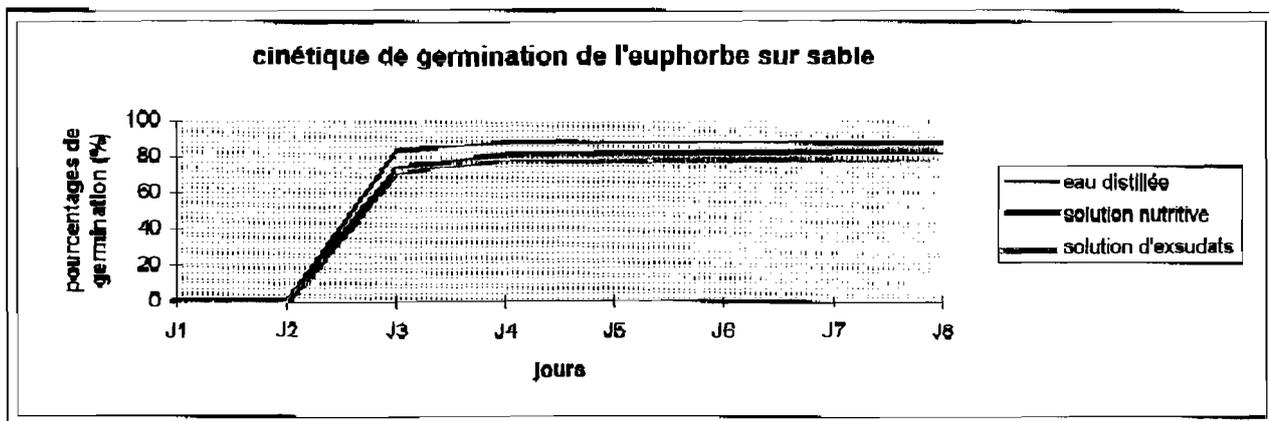
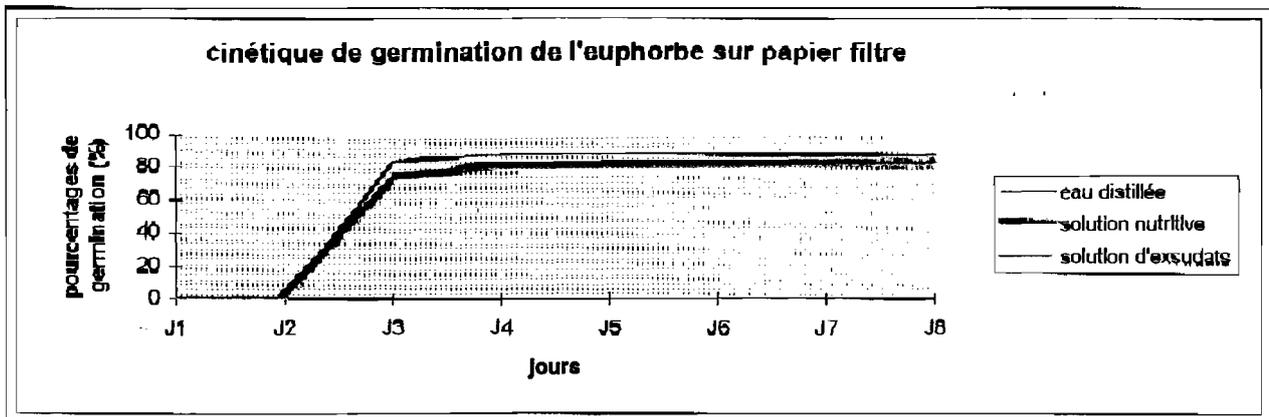


Figure 19 : cinétique de germination de l'euphorbe

Le troisième jour, le test de Newman et Keuls n'est significatif ni pour les graines sur sable, ni pour celles sur papier filtre. Mais dès le quatrième jour des différences apparaissent. Sur sable, les boîtes arrosées avec la solution d'exsudats présentent un taux de germination supérieur aux autres boîtes. Cet effet positif de la solution avec exsudats se confirme le cinquième et sixième jour, s'atténue le septième et disparaît le huitième (figure 19). Sur papier filtre, la solution avec exsudats agit de façon inverse, c'est à dire que les graines arrosées avec cette solution ont un taux de germination inférieur à celles arrosées avec l'eau distillée ou la solution nutritive. Cette différence s'observe jusqu'au huitième jour (à partir du 5^e jour, le taux de germination n'évolue plus dans aucune des boîtes).

Afin de savoir si les pressions osmotiques pouvaient influencer les pourcentages de germination, nous les avons mesurées à la fin de chaque expérience. Les moyennes des valeurs mesurées sont présentées dans le tableau 21.

espèces	arrosages	p. osmotique (milliosmoles)
<i>calopogonium</i>	eau distillée	16.2
	solution nutritive	26.2
	exsudats	26.3
<i>riz</i>	eau distillée	15.5
	solution nutritive	25
	exsudats	37
<i>euphorbe</i>	eau distillée	7.4
	solution nutritive	17.6
	exsudats	18

tableau 21 : valeur des pressions osmotiques des différentes solutions d'arrosage

La pression osmotique des solutions recueillies dans les boîtes en fin d'expérience est plus importante pour chaque espèce dans les boîtes arrosées avec la solution nutritive et les exsudats que dans les boîtes arrosées avec l'eau distillée, mais aucune valeur n'est assez importante pour être responsable d'un ralentissement de la germination ou être la cause d'un taux de germination inférieur.

En effet ; BELL (1974) (cité par PUTNAM, 1986) démontre que des potentiels osmotiques supérieurs à 75 milliosmoles inhibent la pousse de la radicule ; mais toutes les valeurs que nous avons mesurées sont inférieures à ce chiffre.

Les valeurs qui nous intéressent particulièrement sont celles concernant l'euphorbe, puisque c'est la plante sur laquelle la solution d'exsudats avait une action dépressive dans les tests de croissance. D'après les valeurs de la pression osmotique calculées, la baisse du taux de

germination observée dans les boîtes avec exsudats ne peut être attribuée à une trop forte pression osmotique.

b) 2° série de test

Cette deuxième série de test a été effectuée avec l'euphorbe, pour confirmer les résultats observés lors de la 1° série de test (le riz et le calopogonium n'ayant pas donné de résultats significatif, nous ne les avons pas repris).

Le nombre de répétitions a été élevé à 8 par solution d'arrosage.

Les résultats de ce deuxième test sont répartis dans les tableau 22 et 23 :

substrat	1° jour	2° jour	3° jour	4° jour	5° jour	6° jour	7° jour	8° jour
papier filtre								
eau distillée	0 %	0 %	52% B	64% B	69 %	69 %	69 %	70 %
solut° nutritif	0 %	0 %	66%A	77%A	78 %	78 %	80 %	80 %
exsudats	0 %	0 μ	68%A	75%A	7 %	76 %	76 %	77 %

tableau 22 : résultats de la 2° série de tests de germination de l'euphorbe sur papier filtre

substrat	1° jour	2° jour	3° jour	4° jour	5° jour	6° jour	7° jour	8° jour
sableux								
eau distillée	0 %	0 %	48 %	61 %	62 %	63 %	63 %	63 %
solut° nutritif	0 %	0 %	56 %	67 %	68 %	68 %	68 %	68 %
exsudats	0 %	0 %	57 %	66 %	68 %	70 %	70 %	70 %

tableau 23 : résultats de la 2° série de tests de germination de l'euphorbe sur sable

La solution avec exsudats ne provoque aucun effet significatif dans les boîtes avec substrat sableux (lors de la première série de test, on avait remarqué un effet positif de cette solution).

Dans les boîtes avec substrat papier filtre, la solution exsudats et la solution nutritive sont rangées dans le même groupe (d'après Newman et Keuls), et provoquent des taux de germination supérieurs à ceux observés dans les boîtes arrosées avec de l'eau distillée (lors de la première série, c'était l'inverse), surtout les troisième et quatrième jours. Cet effet s'estompe les jours suivants (le test n'est plus significatif).

c) synthèse des résultats de germination

Ces tests de germination mettent à nouveau en évidence le fait que l'euphorbe est la plante la plus sensible à l'action des exsudats, le calopogonium étant la plante la moins sensible.

Mais les résultats observés ne permettent pas de tirer de conclusions claires.

En effet, les résultats concernant le riz ne nous apprennent rien de particulier (le test de Newman et Keuls n'est significatif qu'un seul jour), et ceux concernant l'euphorbe ne sont pas vraiment interprétables : les résultats de la 2^o série ne confirment pas du tout ceux de la 1^o série.

On peut simplement dire que les facteurs liés aux conditions d'expérimentation ont à priori plus d'influence sur les résultats que le facteur "nature de la solution d'arrosage".

Cependant, le fait que l'analyse de variance ne soit pas significative ne veut pas dire que les exsudats n'ont aucun effet sur la germination des graines. Cela peut être simplement dû au fait que les conditions ne sont pas réunies pour que cet effet soit observable.

On n'a pu mettre en évidence une action des exsudats utilisés comme jus d'arrosage en concentration naturelle. Les graines germent vite, le temps pendant lequel elles sont en contact avec les exsudats est insuffisant pour que ceux-ci puissent avoir une action quelconque sur la germination. En conclusion, le taux de germination est élevé et non affecté par les arrosages.

Par la suite, on pourrait imaginer une expérience dans laquelle on accumulerait des exsudats dans des boîtes de Pétri (en arrosant tous les jours et en laissant la boîte ouverte pour permettre l'évaporation) pendant plusieurs jours avant de placer dans ces mêmes boîtes les graines à germer. Ce dispositif reproduirait la réalité puisque en condition naturelle, le sol dans lequel les graines tombent a accumulé une certaine quantité d'exsudats.

Cependant, il faudrait opérer en milieu stérile, par exemple sur de l'Agar-agar. En effet, nous avons commencé cette expérience mais n'avons pu la mener à terme à cause de la présence de moisissures (leur développement est favorisé par le fait que les boîtes de Pétri restent ouvertes plusieurs jours).

III- CONCLUSION-DISCUSSION

Les tests biologiques effectués nous ont permis de mettre en évidence l'action des exsudats racinaires du Calopogonium en concentration naturelle sur certaines plantes en croissance, l'euphorbe en particulier.

Ce résultat est conforme à ceux trouvés dans la bibliographie. En effet, la réduction du poids sec est un des effets allélopathique courant des exsudats racinaires (cf tableau 2), ainsi que la croissance réduite des feuilles (traduite par une surface foliaire des plantes tests inférieure à celle des plantes témoins).

Cependant, certains auteurs ont observé des effets tout à fait contraires à ceux que nous avons obtenus : RICE (1986) (cité par PUTNAM et TANG, 1986), ZABYALYENDZIK (1973) (cité par RICE, 1979) et LAKHTANOVA (1977) (cité par RICE, 1984) observent que les exsudats racinaires de leur plante donneuse stimulent la croissance des plantes testées (cf tableau 2). HUMEAU (1993), ABDUL-WAHAB et RICE (1967) (cités par RICE, 1984) et QASEM et HILL (1989) ne purent mettre en évidence un quelconque effet allélopathique des exsudats racinaires de leur plante donneuse.

Dans nos essais, nous n'avons pu observer une quelconque action des exsudats racinaires sur le calopogonium lui-même. Nous pouvons donc dire que dans nos conditions d'expérimentation, le calopogonium n'a pas d'effet d'autotoxicité.

En ce qui concerne les tests de germination, les exsudats racinaires de calopogonium n'ont pas d'effet flagrant sur la germination des graines testées.

Dans la bibliographie, la plupart des auteurs observent que les exsudats racinaires des plantes donneuses inhibent ou retardent la germination des plantes qu'ils testent (cf tableau 2).

Mais les exsudats racinaires de certaines plantes, plus rares, stimulent la germination de certaines graines : POPE et al (1984) (cités par THOMPSON, 1985) observèrent que les exsudats racinaires de Lantana et Cogongrass stimulent la germination de betterave et de radis. Enfin on trouve quelques exemples d'exsudats racinaires qui n'ont aucun effet sur les graines testées : c'est le cas du kikuyu sur les graines de Ray-grass (FONTAR et THOMAS, 1987), ainsi que sur les graines de tomate et de piquant (*Bidens pilosa*) (HUMEAU, 1993) et celui des exsudats racinaires de soja sur la carotte (POPE et al, 1984, cités par THOMPSON, 1985).

Cependant, dans tous ces tests de germination, la solution d'exsudats avec laquelle les graines sont imbibées est concentrée, d'une manière ou d'une autre : que ce soit dans le système en circuit fermé ou dans le CRETS, dans lesquels les solutions récoltées sont recyclées, ou dans le dispositif avec les joints en T et le système de culture hydroponique, dans lesquels les solutions récupérées le sont après plusieurs jours (les exsudats racinaires se sont donc accumulés).

Dans nos essais, les graines sont arrosées le premier jour avec une solution contenant les exsudats d'une seule journée, en concentration naturelle. Il n'est donc pas très étonnant que le pourcentage de germination des graines test ne diffère pas de celui des graines témoins : plus de 50 % des graines de riz et d'euphorbe ont déjà germé le 4^o jour d'arrosage ; les exsudats, en concentration infime, n'ont pas le temps de s'accumuler avant la germination de ces graines.

Il est d'ailleurs remarquable que nous ayons observé une action des exsudats au niveau des tests de croissance car, là aussi, la solution d'irrigation que nous apportions n'était pas préconcentrée. Cependant, le traitement étant effectué durant plusieurs semaines, on peut penser que les exsudats s'accumulaient dans les pots des plantes receveuses.

Ces tests ne nous permettent pas de mettre en évidence les mécanismes selon lesquels les composés allélopathiques agissent sur la plante receveuse. Ceci dit, d'après nos recherches bibliographiques, aucun auteur n'a réussi à mettre en évidence de façon certaine et précise le mécanisme d'action d'un composé allélopathique.

Cependant, nous avons fait une observation qui a pu nous permettre d'avancer une hypothèse quant au mode d'action du ou des composés actifs de nos exsudats : lors de notre première série de test, nous avons procédé chaque jour à la pesée des pots avant et après l'arrosage, afin de suivre l'évolution de l'évaporation journalière de chaque plante (cf tableau 4).

Or, ces pesées journalières de chaque pot nous ont permis de constater une baisse de l'évapotranspiration dans les pots tests d'euphorbe et de riz le lendemain du jour où les arrosages avec la solution d'exsudats débutent (cf figure 16).

L'évaporation dans les pots étant constante quelle que soit la solution avec laquelle on arrose, c'est uniquement une baisse de la transpiration qui permettrait d'expliquer la baisse de l'évapotranspiration. Les plantes étant au même stade végétatif, elles devraient transpirer des quantités d'eau identiques.

Face à cette constatation, on peut émettre les deux hypothèses suivantes : les exsudats pourraient provoquer une baisse de l'absorption d'eau de la plante ou la fermeture des stomates de la plante, empêchant la transpiration de cette dernière.

Afin de vérifier tout d'abord le phénomène de baisse de l'évaporation observée, nous avons mis en place une expérience, celle-ci n'étant pas du tout prévue au départ. Le but de cette expérimentation était de contrôler l'évaporation journalière de chaque plante, ceci avant et après les arrosages avec la solution d'exsudats.

Cette démarche n'a jamais été faite, dans aucune des études sur l'allélopathie. En effet, aucun auteur n'a jamais mesuré l'évapotranspiration des plantes tests durant une expérience allélopathique.

Le 25 novembre, nous avons mis en pot des graines d'euphorbe prégermées, pots qui ont été placés en chambre de culture.

Ces pots sont les mêmes que ceux utilisés lors de la première série de tests de croissance, à savoir des pots blancs fermés, de 10 cm de côté, pesant 17,3 g, dans lesquels on ajoute 460 g de sable sec et ajustés à 16 % d'humidité (poids pot + sable + eau = 550 g).

Le nombre de répétitions est de 11 pots.

Ceux-ci sont arrosés (ajustage à 16 % d'humidité tous les jours) pendant 3 semaines avec la solution nutritive.

Le 21 décembre, le poids de chaque pot après ajustement a été noté précisément (tous les pots sont arrosés avec de la solution nutritive) et le lendemain, la même mesure a été reconduite, ceci afin de déterminer l'évapotranspiration.

Ce même jour, le lot traité est arrosé avec la solution d'exsudats, en notant le poids après ajustement. Le lendemain, en relevant le poids de chaque pot et en comparant avec celui de la veille (après ajustement), l'évapotranspiration a été estimée.

On procède à deux analyses de variance comparant les évapotranspirations des plantes traitées et celles des plantes témoins : une avec les valeurs d'évapotranspiration relevées le 22 décembre (la veille, toutes les plantes sont arrosées avec de la solution nutritive), et une avec les valeurs relevées le 23 décembre (la veille, les plantes traitées sont arrosées avec des exsudats). Les valeurs d'évaporation moyenne relevées sont présentées dans le tableau 24 :

euphorbe	évapotranspiration (moyenne en ml) du 21-22 décembre (arrosage avec la solution nutritive le 21)	évapotranspiration (moyenne en ml) du 22-23 décembre (arrosage des plantes traitées avec la solution d'exsudats le 22)
plantes témoins	33.18	34.82
plantes tests	33.09	31.91*

* moyenne significativement différentes au seuil $\alpha = 0.05$ (test de Student)

tableau 24 : valeurs d'évaporation moyennes, avant et après traitement

Ces résultats confirment le phénomène observé lors de la première série de tests de croissance : les exsudats provoquent bien une baisse d'évapotranspiration.

En effet, dans cette expérience, on n'observe aucune différence d'évapotranspiration entre les plantes tests et témoins le lendemain du jour où l'on arrose avec la solution nutritive ; par contre, un arrosage des plantes traitées avec la solution d'exsudats provoque dès le lendemain une évapotranspiration inférieure à celle des plantes témoins.

L'évaporation étant constante dans les pots témoins comme dans les pots traités (même taille, même condition évaporative), la différence d'évapotranspiration observée entre les pots témoins et traités est uniquement due à une différence de transpiration.

En considérant que l'évaporation directe du sol représente environ 20 ml, la transpiration de la plante peut être évaluée à 15 ml pour les plantes témoins, et à 12 ml pour les plantes traitées

entre le 22 et 23 décembre. On observe donc une baisse de 20 % de la transpiration pour les plantes traitées.

Au vu de ces résultats, les deux hypothèses avancées après la première série de tests de croissance semblent toujours pertinentes : les exsudats pourraient agir en diminuant l'absorption d'eau dans la plante ou en provoquant la fermeture des stomates.

Une deuxième constatation nous permet d'être plus précis dans la tentative d'explication des mécanismes d'action des exsudats : nous avons observé des effets allélopathiques beaucoup plus prononcés durant l'essai du mois d'août que pendant celui du mois d'octobre. Si le phénomène provoqué par les exsudats était la fermeture des stomates, le développement des plantes serait stoppé, mais ces dernières ne seraient pas en état de stress hydrique, même au mois d'août ; or, les plantes traitées de la première série de tests étaient flétries, desséchées... alors qu'au mois de novembre (lors de la 2^e série de test), les plantes traitées ne présentaient pas de signes apparents de manque d'eau.. Cette observation va donc dans le sens de l'hypothèse selon laquelle les exsudats réduiraient l'absorption d'eau.

En effet, dans ce cas, il semble normal que les plantes traitées en août, soumises à une demande évaporative élevée, soient plus sensibles à l'action des exsudats que celles traitées au mois de novembre. La réduction de l'absorption est plus préjudiciable pour la plante en août qu'en novembre.

Cette explication est cohérente avec ce que EINHELLIG (1984) écrit : "les effets que les composés allélopathiques ont sur les membranes peuvent perturber l'équilibre hydrique des plantes". De même, OWENS, en 1969, déclare que la plupart du temps, le premier signe de dégât causé par des phytotoxines produites par des pathogènes sur des cellules est une altération de la perméabilité pour l'eau et les sels minéraux de la membrane cytoplasmique.

Afin d'approfondir cette hypothèse, on peut envisager de mesurer le potentiel hydrique des plantes traitées, par exemple au niveau des feuilles. En effet, lorsqu'ils testèrent l'effet des acides férulique et p-coumarique sur des plantules de soja, SWAIN (1981) et STILLE (1979) (cités par EINHELLIG, 1984) remarquèrent une dépression du potentiel hydrique de ces dernières.

On peut envisager également une analyse du fonctionnement physiologique d'une plante test, par exemple *Euphorbia heterophylla*, très réactive, en la soumettant, en cellule isolée, à des solutions chargées en exsudats racinaires : mesure des bilans de CO₂ et H₂O (photosynthèse et transpiration).

Au vu des résultats de cette dernière expérience, on peut souligner l'importance des conditions dans lesquelles se déroulent les tests. En effet, il semble indispensable de conduire ces tests dans des conditions climatiques contrôlées, étant donné les conséquences qu'entraîne une évapotranspiration plus ou moins forte. Si l'on veut procéder à plusieurs séries de tests, il faut absolument que ceux-ci se déroulent sous des conditions climatiques similaires.

Beaucoup d'auteurs ont mis en évidence des effets allélopathiques dus aux exsudats racinaires de telle ou telle plante, mais peu ont déterminé le ou les composés présents dans ces exsudats et susceptibles d'être responsables des effets observés.

Dans la troisième partie, nous avons essayé de savoir si les exsudats racinaires du *Calopogonium* contenaient certains des composés allélopathiques les plus courants dans les exsudats racinaires de plantes, composés qui seraient susceptibles d'être responsables des effets observés dans cette deuxième partie.

troisième partie :

Recherche
dans les exsudats du calopogonium
de quelques familles allélopathiques

3ème partie : Recherche dans les exsudats du calopogonium de quelques familles allélopathiques

Nous ne nous intéressons dans cette partie qu'à certaines familles allélopathiques, celles considérées d'après la bibliographie comme les plus couramment rencontrées dans les exsudats racinaires de plantes.

En effet, notre but n'était pas de découvrir le ou les composés responsables des effets observés. Non seulement cette recherche constituerait à elle seule un sujet de mémoire, mais de plus, il existe une grande différence entre le fait de prouver la présence de certains composés dans nos exsudats et affirmer que ces composés sont responsables des effets observés sur les plantes tests.

D'ailleurs, dans la bibliographie, parmi les auteurs qui ont déterminé la présence de composés "allélopathiques" d'exsudats racinaires, aucun n'a ensuite réellement testé l'action des molécules standards correspondantes sur les plantes tests. Une comparaison des symptômes des plantes traitées avec ces molécules standards et de celles traitées avec les exsudats racinaires permettrait de montrer si le composé découvert dans les exsudats est responsable ou non des effets allélopathiques.

Par contre, un certain nombre d'auteurs ont testé des composés standards aux propriétés allélopathiques connues.

On trouve donc, d'un côté, les auteurs ayant réussi à montrer la présence de tel et tel composé dans des exsudats, et de l'autre, des auteurs qui testent des composés connus comme allélopathiques. Mais le lien entre les deux n'est jamais fait au sein d'une même étude.

Cette première approche biochimique devait également nous permettre de nous pencher sur les différents problèmes liés à cette détection biochimique, notamment la concentration des exsudats, opération préalable nécessaire à toute identification, étant donné la très faible concentration des exsudats dans la solution récoltée. Cette concentration, en conditionnant l'identification, semblait donc importante à mettre au point, surtout dans l'optique d'une poursuite de ces travaux biochimiques.

Cette partie débute par un tableau récapitulatif élaboré à partir de la bibliographie, tableau qui nous a permis d'orienter nos travaux. Elle se poursuit par la recherche des composés allélopathiques les plus courants et se termine par une discussion des résultats.

nom des composés	provenant d'exsudats racinaires de :	références :
<u>acides organiques</u>		
acide benzoïque	<i>Hemarthria altissima</i> (Bigalla lipogress)	TANG et YOUNG (1982)
acide t-cinnamique	plantes de Guayule <i>Hemarthria altissima</i>	BONNER et GALSTON (1944) TANG et YOUNG (1982)
acide phénylacétique et ses dérivés	<i>Hemarthria altissima</i> non précisé	TANG et YOUNG (1982) CHOU et PATRICK (1976), CHOU et LIN (1976), TANG et YOUNG (1982)
acide phénylpropionique	non précisé	AUDUS (cité par THOMPSON)
acide oxalique	<i>Chenopodium album</i>	KOSSANEL, J.P (1977) (cité par Rice, 1984)
<u>acides phénoliques</u>		
<u>de la série des benzoïques</u>		
acide hydroxybenzoïque	avoine sauvage (<i>Avena fatua</i>) non précisé	PEREZ et ORMENO-NUNEZ (1990) AUDUS (cité par THOMPSON)
acide gallique	<i>Hemarthria altissima</i>	TANG et YOUNG (1982)
acide syringique	avoine sauvage	SCHUMARER et al. (1982)
acide vanillique		PEREZ et ORMENO-NUNEZ (1990)
<u>acides phénoliques</u>		
<u>de la série des cinnamiques</u>		
acide caféique	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	JACKSON et WILLEMSSEN (1976)
acide férulique	<i>Hemarthria altissima</i>	TANG et YOUNG (1982)
acide sinapique	<i>Hemarthria altissima</i>	TANG et YOUNG (1982)
acide chlorogénique	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> tournesol Johnsongrass (<i>Sorghum alepense</i>)	JACKSON et WILLEMSSEN (1976) IRONS et al (1982)
acide (p ou o) coumarique	non précisé Johnsongrass	ABDUL-WAHAB et al (1967) (cités par THOMPSON, 1985) LOLAS et COBLE (1982) AUDUS (cité dans THOMPSON, 1985) ABDUL-WAHAB et al (1967) (cité dans THOMPSON, 1985) LOLAS et al (1982) (cité par THOMPSON, 1985)
p-hydroxybenzaldehyde	non précisé Johnsongrass	AUDUS (cité par THOMPSON 1985) ABDUL-WAHAB et al (1967) (cité par THOMPSON, 1985) LOLAS et al (1982) (THOMPSON, 1985)
<u>coumarins</u>		
scopolétine	avoine sauvage idem idem tournesol	PEREZ et ORMENO-NUNEZ (1991) idem SCHUMARER et al (1982) IRONS et al (1983) et WILSON et RICE (1968) (THOMPSON, 1985) FAY et DUKE (1977)
<u>quinoïdes</u>		
juglone	non précisé non précisé non précisé	AUDUS (cité par THOMPSON, 1985) EINHELLIG (1984) RICE (1974)
<u>isoflavonoïdes</u>	trèfle violet (<i>Trifolium pratense</i>)	CHANG et al (1969) (cité par RICE, 1984)

tableau 25 : composés allélopathiques d'exsudats racinaires

I- PREMIERS RENSEIGNEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES

Nous nous sommes intéressés dans la bibliographie plus particulièrement aux composés dits "allélopathiques" (soit parce que les exsudats racinaires dont ils sont issus ont provoqué sur des plantes test des modifications de croissance ou de germination, soit parce que les auteurs les nomment eux-mêmes "composés allélopathiques").

Ces composés sont pour la plupart des métabolites secondaires. En effet, ces derniers, bien que ne représentant habituellement qu'une petite fraction des exsudats organiques totaux, peuvent exercer un impact disproportionné sur les plantes qui les entourent, ceci étant dû à leur très importante activité biologique (WHITTAKER et FENNY, 1971, cités dans TANG et YOUNG, 1982). Ils sont connus pour leurs propriétés allélopathiques et beaucoup semblent jouer un rôle important dans l'inhibition de la croissance végétale.

Dans le tableau de la page ci-contre (tableau 25) sont indiqués les noms de composés allélopathiques découverts dans des exsudats racinaires, la plante dont ils sont issus, et les auteurs de la publication dans laquelle ils sont cités.

Les acides phénoliques étant les composés les plus courants dans les exsudats racinaires, notre première démarche a été de savoir si ceux du calopogonium en contenaient.

II- RECHERCHE DES ACIDES PHENOLIQUES

Pour ce faire, nous avons commencé par utiliser une méthode de dosage colorimétrique des composés phénoliques totaux, pour nous servir ensuite d'outils plus précis tel que l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography : Chromatographie Liquide Haute Performance). En effet, cette méthode colorimétrique, simple à mettre en oeuvre, avait pour objectif de nous renseigner sur la présence de composés phénoliques, avant que nous nous lancions dans la recherche d'acides phénoliques, à l'aide de l'HPLC, technique plus précise mais plus complexe à utiliser.

L'utilisation de l'HPLC s'est effectuée à la fois au C.I.R.A.D et à l'E.S.A.P, en utilisant deux techniques légèrement différentes.

Organic substances with a phenolic hydroxyl group

Phenol (FD, MA, B) 3-Methoxyphenol (FD)
 Catechol (FD) Thymol (FD, L, B)
 Resorcinol (FD, B) Eugenol (FD)
 Hydroquinone (FD) Carvacrol (FD)
 Pyrogallol (FD, B) Vanillic acid (E)
 Phloroglucinol (FD) Vanillin (FD, E)
 2,4,6-Tribromophenol (FD) Tyrosine (FD, FC, L, MA, H, B)
p-Aminophenol (FD) 3,4-Dihydroxyphenylalanine (MA)
 Diethyl *p*-aminophenol (FD) Syringic acid (B)
 Salicylic acid (L) 1-Naphthol (FD)
 Sulphosalicylic acid (L) Morphine (FD)
 4-Hydroxybenzoic acid (B) Adrenalin (FD)
 Gallic acid (B) EDDHA (B)
o-Cresol (FD) Tannic acid (FD, P, APHA, B)
m-Cresol (FD) Humic acid (SK, B)
p-Cresol (FD) Fulvic acid (BC, B)
 2,6-Xylenol (B) Tannins (BS, K, APHA, B)
 4-Methylcatechol (B) Lignin (BS, K, APHA)
 Orcinol (FD) Sodium lignin sulphinate (L)
 Guaiacol (FD) Aspergillin (SK)

Organic substances without a phenolic hydroxyl group

Pyridoxine (MA) Sulphanilic acid (B)
 Uric acid (FD, MA) *o*-Aminobenzoic acid (B)
 Guanine (L, MA, B) *p*-Aminobenzoic acid (B)
 Guanosine (L) Benzaldehyde (FD)
 Xanthine (L) 4-Dimethylaminobenzaldehyde (B)
 Adenine (L, B) Aniline (B)
 Adenosine (L) Dimethylaniline (B)
 Cytosine (L) Methylamine (B)
 Cytidine (L) Naphthylamine (FD)
 Uracil (L) Diphenylamine (B)
 Thymine (L) Nitrilotriacetic acid (B)
 Thymidine (L) EDTA (B)
 Creatinine (MA) Thiourea (MA, B)
 Histidine (MA, B) Phenylthiourea (MA)
 Alanine (MA, B) Ascorbic acid (B)
 Cysteine (FC, MA, B) Fructose (EM, B)
 Indole (MA) Proteins (EM, B)
 Tryptophan (FC, MA, B)

Inorganic substances

Iron(II) ammonium sulphate (B) Sodium sulphite (BS, K, B)
 Iron(III) sulphate (K, B) Sodium sulphide (B)
 Manganese(II) sulphate (B) Tin(II) chloride (B)
 Potassium nitrite (B) Hydrazine (L)
 Sodium cyanide (FC) Hydroxylammonium chloride (B)
 Sodium metabisulphite (B)

*References: APHA (APHA, 1976); B (Box, this study); BC (Black & Christman, 1963); BS (Berk & Schroeder, 1942); E (Englis *et al.*, 1953); EM (Englis & Miles, 1949); FC (Folin & Ciocalteu, 1927); FD (Folin & Denis, 1912); H (de Huan, 1973); K (Kloster, 1974); L (Lowry *et al.*, 1951); MA (McAllister, 1969); P (Pro, 1952); SK (Sharma & Krishnan, 1966).

†EDDHA—Ethylenediaminedi(*o*-hydroxyphenyl)acetic acid.

Figure 20 : substances réduisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Box, 1981)

Ethanol (L)*	<i>Organic substances</i>
Trichloroacetic acid (L)	Proline (MA)
Diethyl ether (L)	Hydroxyproline (MA)
Acetone (L)	Leucine (MA, B)
<i>o</i> -Nitrophenol (FD)	Lysine (MA, B)
<i>m</i> -Nitrophenol (FD)	Methionine (MA, B)
<i>p</i> -Nitrophenol (FD)	Ornithine (MA, B)
2,4-Dinitrophenol (B)	Phenylalanine (MA, B)
Picric acid (L)	Serine (MA)
Benzoic acid (B)	Threonine (MA)
1,4-Benzoquinone (B)	Valine (MA, B)
Glucose (MA, B)	Asparagine (B)
Xylose (MA)	Glycylglycine (B)
Urea (L, B)	2-Aminobutyric acid (MA)
Hypoxanthine (L)	Inositol (B)
Guanidine (L)	Citric acid (B)
Glycine (MA, B)	Tris(hydroxymethyl)aminomethane (B)
Arginine (MA, B)	Nicotinic acid (B)
Aspartic acid (MA)	Phenylacetaldehyde (B)
Cystine (MA, B)	EGTA† (B)
Glutamic acid (MA, B)	2,2'-Dipyridyl (B)
	Starch (B)
	<i>Inorganic substances</i>
Sodium thiosulphate (B)	Tetrasodium pyrophosphate (B)

Figure 21 : substances ne réduisant pas le réactif de Folin-Ciocalteu (Box, 1981)

1. Méthode colorimétrique de dosage des composés phénoliques (méthode de Folin-Ciocalteu)

Parmi leurs propriétés communes, le pouvoir réducteur a le plus souvent été mis à profit pour doser l'ensemble des composés phénoliques et la réaction de Folin-Ciocalteu s'est révélée la plus sensible (RIBEREAU-GAYON P., 1970) (cité par MARIGO, 1972).

Le réactif employé est un mélange de phosphomolybdate et de tungstate de sodium qui est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (MARIGO, 1973).

BOX (1981) nous apprend que la nature de la réaction chimique à l'origine de la réduction des acides phosphomolybdiques et phosphotungstique dans le réactif de Folin-Ciocalteu et la composition du bleu résultant sont inconnus.

Les figures 20 et 21 dressent un inventaire des composés réagissant et de ceux ne réagissant pas avec ce réactif.

En effet, le réactif de Folin est réduit par une large gamme de substances aromatiques, par quelques composés organiques aliphatiques et par certains composés inorganiques qui possèdent des propriétés réductrices.

Les substances organiques réactives incluent celles qui ont des groupes phénols (noyau benzène et groupement OH), les bases hétérocycliques purine et pyrimidine (et leurs nucléotides respectives), et d'autres composés cycliques avec un substituant NH dans le noyau. Les composés aromatiques avec un groupe substitué NH₂ (par exemple aniline, acide sulphanilique, acide p-aminobenzoïque) ou un groupe CHO (par exemple benzaldéhyde) sont capables de réduire le réactif de Folin. En général les composés aliphatiques ne réagissent pas : mais ceux comportant de la sulphhydryl ou des groupes sulfure réduit (par exemple cystéine) et des agents réducteurs aliphatiques (exemple acide ascorbique) produisent une bonne couleur bleue (BOX, 1981).

Nous avons appliqué le protocole couramment utilisé dans le laboratoire de physiologie végétale de Monsieur Macheix, à l'Université Scientifique et Technique du Languedoc, à Montpellier.

a) protocole de dosage

La solution étalon choisie est une solution aqueuse d'acide férulique : 20 mg d'acide férulique dans 100 ml d'eau.

On constitue cinq échantillons en prenant différentes quantités de cette solution étalon, afin d'établir une gamme étalon (tableau 26 page suivante) :

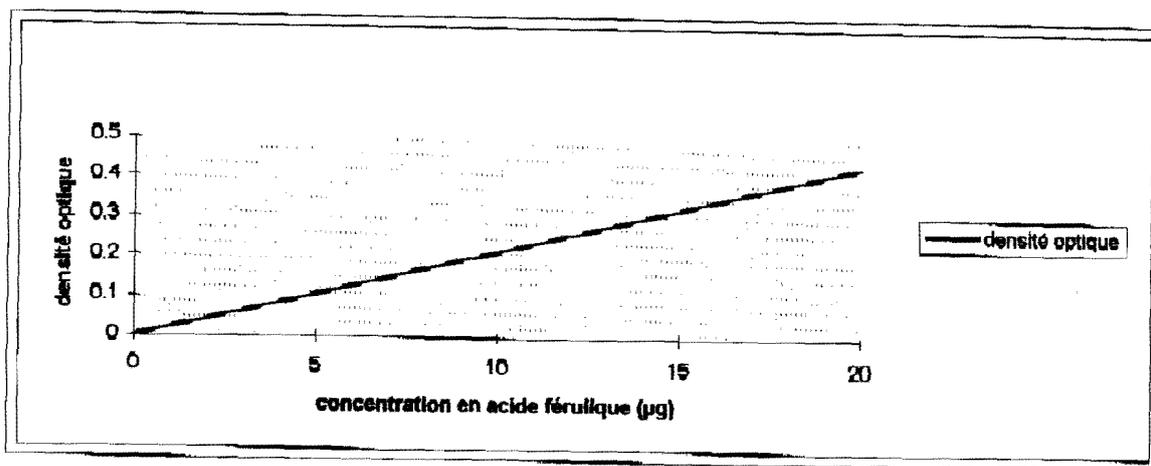


Figure 22 : courbe étalon pour le réactif de Folin-Ciocalteu

tubes	1	2	3	4	5
quantité solution étalon (μ l\tube)	0	25	50	75	100
[c] correspondante en acide férulique (μ g\tube)	0	5	10	15	20
quantité d'eau (μ l\tube)	100 + 900	75 + 900	50 + 900	25 + 900	10 + 900

tableau 26 : gamme étalon pour la méthode de dosage Folin-Ciocalteu

Après addition de 0,5 ml de réactif de Folin, on ajoute 3 mn plus tard 1 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium à 20 %.

On place les tubes au bain-marie à 40°C pendant 30 mn.

La coloration bleue produite est mesurée à 760 nm (nanomètre) à l'aide d'un spectrophotomètre et les densités optiques relevées permettent d'établir la courbe étalon reproduite sur la figure 22 ci-contre.

Une mise au point était nécessaire avant d'utiliser cette méthode avec les exsudats du calopogonium.

b) expériences préliminaires : mise au point de la méthode

Supposant que la concentration en acide phénolique dans nos exsudats était extrêmement faible, il nous fallait mettre au point une méthode de concentration de ces exsudats, en étant certain que cette concentration n'induirait pas de biais dans la méthode de Folin-Ciocalteu.

De plus, les exsudats n'étant pas à l'état pur mais en mélange avec la solution nutritive, il semblait important de vérifier la spécificité du réactif, c'est à dire de tester la réaction du réactif vis à vis de la solution nutritive.

- concentration préalable des solutions recueillies

L'évaporation sous vide nous semblait un moyen de concentration facile à mettre en oeuvre. Cependant, il ne fallait pas que l'évaporation dénature les exsudats.

Il fallait également que la concentration des ions minéraux de la solution nutritive ne masque pas celle des acides phénoliques.

Nous avons donc testé cette méthode avec une solution témoin : une solution nutritive (de même composition que celle avec laquelle les calopogonium sont arrosés) à laquelle nous avons ajouté un mélange de trois acides phénoliques : acide benzoïque, acide férulique et acide vanillique ; leur concentration est calculée pour que les densités optiques correspondent à l'optimum de la gamme étalon.

Un litre de cette solution fut évaporé à sec puis repris dans 5 ml de méthanol. Le méthanol fut le solvant choisi pour deux raisons principales :

- les anions organiques dans un milieu aqueux s'oxydent rapidement et sont détruits par des micro-organismes ; l'alcool ayant un rôle antioxydant, conservés dans l'éthanol à 20 %, les anions organiques ont toujours la même concentration 36 jours après leur mise en solution (PIOMBO, 1994),.
- les acides phénoliques sont solubles dans le méthanol, les sels minéraux le sont moins ; on peut donc espérer que cette manipulation permettra de les éliminer.

Dans un souci d'exhaustivité, on procède à trois extractions successives (5 ml de méthanol à chaque fois).

Après dosage colorimétrique des trois extraits de cette solution témoin, les conclusions sont les suivantes :

- la coloration bleue du 2^o extrait ne représente que 15 % de la coloration du 1^o extrait ; celle du 3^o extrait plus que 5 %.

On décide donc à l'avenir de ne faire plus qu'une extraction avec 10 ml de méthanol.

- on retrouve 80 % des acides phénoliques introduits dans la solution nutritive.

Pour être certain de ces conclusions, on répète l'expérience ; on retrouve les mêmes résultats.

Les premières évaporations à sec se faisaient à une température de 100°C.

Par la suite, on s'est aperçu qu'en évaporant à sec, on perdait la moitié de la coloration bleue. En effet, une solution concentrée 10 fois par évaporation, sans que celle-ci soit conduite jusqu'à la fin, donne une coloration bleue deux fois plus intense.

On peut conclure de cette observation que certains composés disparaissent par dénaturation lorsqu'on chauffe la solution d'exsudats. Après cette constatation, la température maximale à laquelle on évaporait était de 40 °C.

- spécificité

D'après la bibliographie (cf figure 20), on sait que le réactif de Folin ne réagit pas seulement avec les acides phénoliques. Il se peut donc que la coloration ne soit pas seulement due à la présence de ces derniers.

Une autre mise au point du dosage semblait donc nécessaire : vérifier la spécificité du réactif (vérifier que la coloration bleue obtenue avec ce dernier ne soit pas due aux éléments minéraux de la solution nutritive).

Pour ce faire, nous avons évaporé à sec 1 litre de solution nutritive, que nous avons repris dans 10 ml de méthanol et dosé. Nous avons fait deux fois cette pré-expérience, en évaporant des quantités différentes de solution nutritive.

A chaque fois, nous avons vu apparaître une coloration bleue en absence totale de composés phénoliques dans le milieu.

La première fois, l'évaporation se fait à 100°C, la concentration trouvée est de 0,03 mg/l d'équivalent acide phénolique.

Lors du deuxième essai, l'évaporation se fait à 40°C, la concentration trouvée est de 0,06 mg/l d'équivalent acide phénolique.

Ces deux résultats confirment l'observation faite plus haut, à savoir que l'évaporation trop poussée conduit à une perte de couleur bleue (soit par dénaturation de la solution ou par perte par volatilisation).

Malgré tout, la coloration bleue qui apparaît est beaucoup moins intense que celle qu'on observera par la suite dans les exsudats ; cette coloration n'est donc pas uniquement due aux ions minéraux.

c) dosage des exsudats

Le 10 août, on recueille des exsudats à différents moments de la journée, afin de déterminer la concentration en composés phénoliques de chaque échantillon. Sur le tableau 27 (page suivante) sont reportés les volumes récoltés, les concentrations en équivalent acides phénoliques correspondantes (d'après la courbe étalon) et les quantités exsudées :

tranches horaires	volume récolté (en ml)	concentration en équivalent acide phénolique (mg \ l)	quantités exsudées (en ml)
8H30-11H30	700	0.5	0.35
11H30-13H30	875	0.35	0.306
13H30-15H	30	4,2	0.126
15H-17H	200	0,7	0.14

tableau 27 : dosage d'échantillons recueillis à différents moments de la journée

On remarque que selon le moment de la journée, les volumes récoltés diffèrent car ils dépendent de l'heure à laquelle l'irrigation a eu lieu et des conditions climatiques dans la serre (évaporation plus ou moins importante).

On remarque également que les quantités d'exsudats dans la solution recueillie ne sont pas les mêmes selon les tranches horaires : c'est entre 13H et 17H que le calopogonium exsude le moins. Cette observation confirme le fait que la température est un des facteurs influençant l'exsudation.

Enfin, lors des dosages colorimétriques, les concentrations en équivalent acides phénoliques sont beaucoup plus importantes que celles obtenues lors des essais préliminaires avec la solution nutritive (0.03 mg/l et 0.06 mg/l). La couleur bleue n'est donc pas due uniquement à la présence de la solution nutritive.

d) conclusion

L'évaporation sous vide est une technique de concentration relativement facile à mettre en oeuvre et qui permet de retrouver 80 % des acides phénoliques présents dans la solution de départ.

Cependant, la température d'évaporation s'avère être un paramètre important qui peut entraîner une dénaturation de la solution.

D'après nos expériences, il semble donc préférable dans nos expériences futures de ne pas évaporer à une température supérieure à 40° C.

Si l'on récolte les solutions percolées à différents moments de la journée, on se rend compte que les quantités d'exsudats dans ces solutions diffèrent. Il était donc important de rassembler l'ensemble des percolats d'une journée, ce que nous avons fait lors des essais biologiques.

En ce qui concerne le réactif de Folin, on peut regretter le fait qu'il ne soit pas vraiment spécifique puisqu'il réagit avec la solution nutritive et avec des composés non phénoliques (cf figure 20).

Cependant, il est un bon indicateur de la concentration des solutions percolées qu'on récolte. De plus, la coloration bleue qu'il fait apparaître dans ces solutions étant significativement différente de celle obtenue avec la solution nutritive, on peut donc penser que les exsudats racinaires contiennent des composés phénoliques.

Cette méthode de dosage colorimétrique nous laissant supposer la présence dans les exsudats du calopogonium de composés phénoliques, nous avons utilisé la chromatographie liquide pour essayer de mettre en évidence la présence dans ces exsudats d'acides phénoliques.

2. Recherche d'acides phénoliques par HPLC

La chromatographie en phase liquide connaît aujourd'hui un renouveau remarquable en raison des récents progrès de la technologie des colonnes et du développement de meilleurs détecteurs. Elle s'impose donc avec la même vigueur et le même succès que la chromatographie en phase gazeuse il y a vingt ans (TANTAWI, 1983). Elle apparaît être une méthode de choix dans l'analyse des acides phénoliques en raison de son faible temps d'analyse, de sa haute résolution, de son excellente reproductibilité et de l'exactitude de sa quantification (TANTAWI, 1983).

La détection d'acides phénoliques se fait avec une phase inverse, ce qui signifie que la phase mobile est polaire et la phase statique est apolaire.

La phase stationnaire est constituée d'un gel de silice greffé, de motifs organiques variés, type n alkyle : $-(CH_2)_n - CH_3$

n = 2 (propyle), n=7 (cotyle), n=17 (octadécyle)

C₁₈ type nucléosyl 5 μmdiamètre

Ces molécules greffées sont apolaires.

La phase liquide, polaire, est constituée d'un mélange eau + acétonitrile.

La séparation des composés est caractérisée par des temps de rétention décroissants selon la polarité des composés.

Le solvant le moins polaire de la phase mobile s'adsorbe préférentiellement à la surface des greffons apolaires. Il y a alors partage des solutés entre la phase mobile et la phase liquide adsorbée.

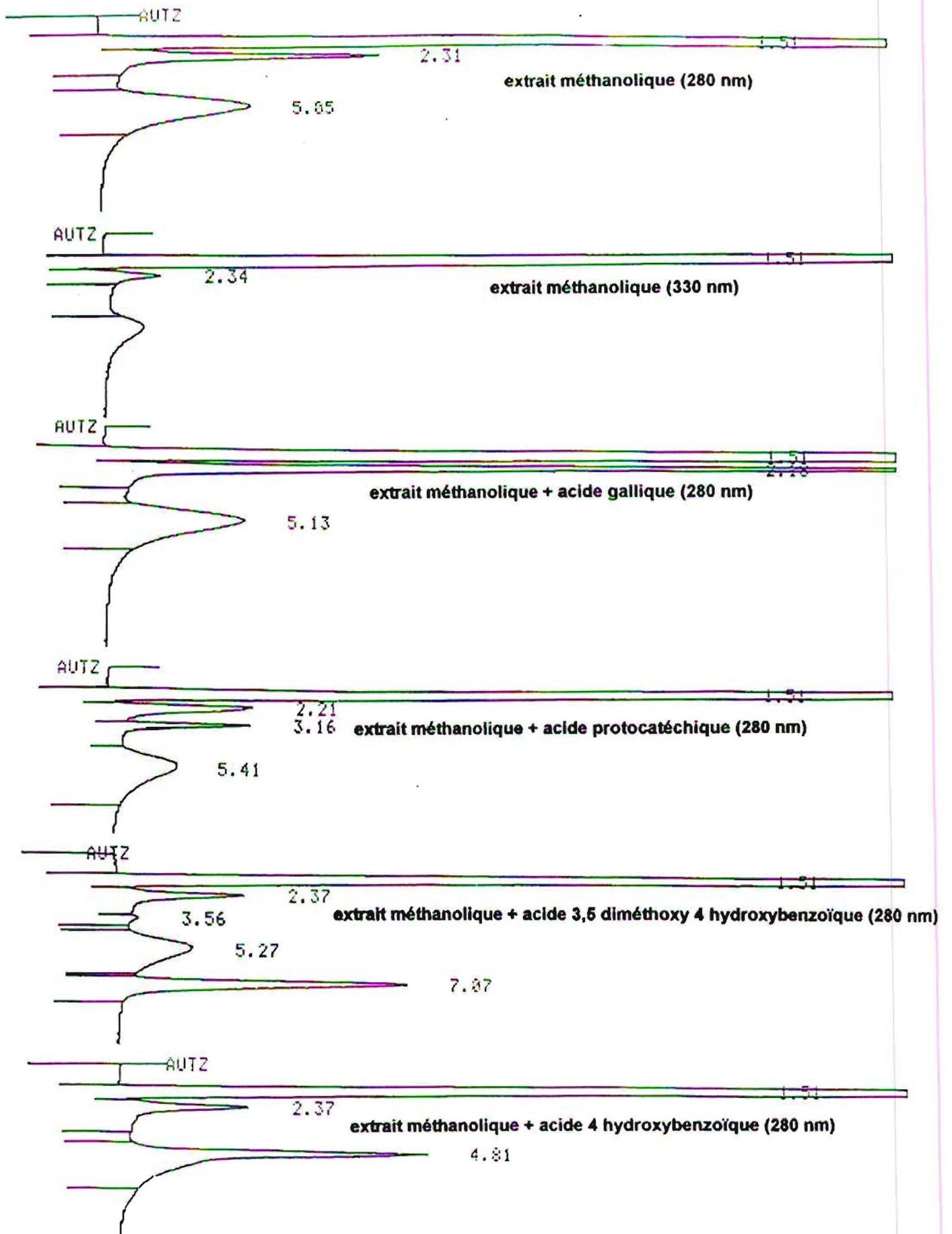


Figure 23 : chromatogrammes de l'extrait méthanolique avec différentes molécules standards

La chaîne greffée réagit avec les molécules de solutés sur toute la longueur (jusqu'à C18). Il ne semble pas cependant que l'efficacité soit liée à la longueur de la chaîne.

Les composés migrent d'autant plus lentement qu'ils ont plus d'affinité avec la phase stationnaire.

Les composés polaires sont élués avant les composés apolaires.

a) conditions expérimentales

- phase stationnaire : Lichrosorb RP-18 (silice poreuse de forme irrégulière) ; porosité 10 μm ; 250 * 4,6 mm (groupement greffé = dérivé octadécyl)

- phase mobile : eau (89) \ acide acétique (1) \ acétonitrile (10)

température ambiante

volume injecté = 20 μl

extrait du 26 octobre concentré 50 fois (500 ml \rightarrow 10 ml)

débit : 2 ml \ mn

longueur d'onde de détection : 280 nm ou 330 nm

b) démarche expérimentale

Afin de déterminer rapidement la nature des acides phénoliques présents dans les exsudats du calopogonium, nous avons adopté une démarche systématique d'injection de standards connus (quatre molécules choisies selon leur polarité) (figure 23) pour comparer leur chromatogramme avec celui de l'extrait brut.

Nous avons injecté l'extrait à deux longueurs d'onde différentes : 280 et 330 nm. En effet, tandis qu'à 280 nm on détecte toutes les formes d'acides phénoliques, à 330 nm ce sont spécifiquement les noyaux cinnamiques qui absorbent préférentiellement.

c) résultats - conclusion

Dans l'extrait brut, à 280 nm, on observe trois pics dont un majoritaire. A 330 nm, la surface de ces pics n'augmente pas (elle baisse même pour les deux derniers pics), ce qui prouve que les composés ne sont pas des acides phénoliques de la série des cinnamiques. Ils absorbent préférentiellement à 280 nm.

Parmi les quatre molécules standards testées, aucune ne correspond à l'un des trois composés de l'extrait.

Le composé dont le temps de rétention est de 1,51 est plus polaire que l'acide gallique (standard injecté). Or, l'acide gallique est l'acide phénolique le plus polaire. Un doute subsiste donc en ce qui concerne la nature phénolique de ce composé. L'importance de la polarité de ce composé laisse supposer qu'il s'agit d'un composé organique, ceux-ci absorbant également à 280 nm, ou de tout autre composé plus polaire que les acides phénoliques car, en début de chromatographie sortent tous les composés polaires.

Les acides organiques étant élués avant les acides phénoliques, et certains de ces composés étant de plus présents dans certains exsudats racinaires et considérés comme allélopathiques (cf tableau 25), on peut avancer l'hypothèse que les pics détectés sur ce chromatogramme sont dus à la présence d'acides organiques dans l'extrait.

Afin d'affiner les informations obtenues sur ces composés, nous avons procédé à une deuxième analyse chromatographique avec gradient de solvant et couplé avec la détermination des spectres d'absorption.

3. Caractérisation de l'extrait brut grâce à son spectre d'absorption

a) conditions d'expérimentation

On utilise un mélange de deux solvants : de l'acide phosphorique (H_2PO_4) et du méthanol (MeOH).

Le gradient est le suivant : la concentration du mélange en méthanol passe de 5 à 100 % en 48 mn.

colonne : RP 18 ; 4,6 *250 mm

débit : 1 ml \ mn

détecteur : barrette de diode (HP 1040)

longueur d'onde = 210 → 400 nm

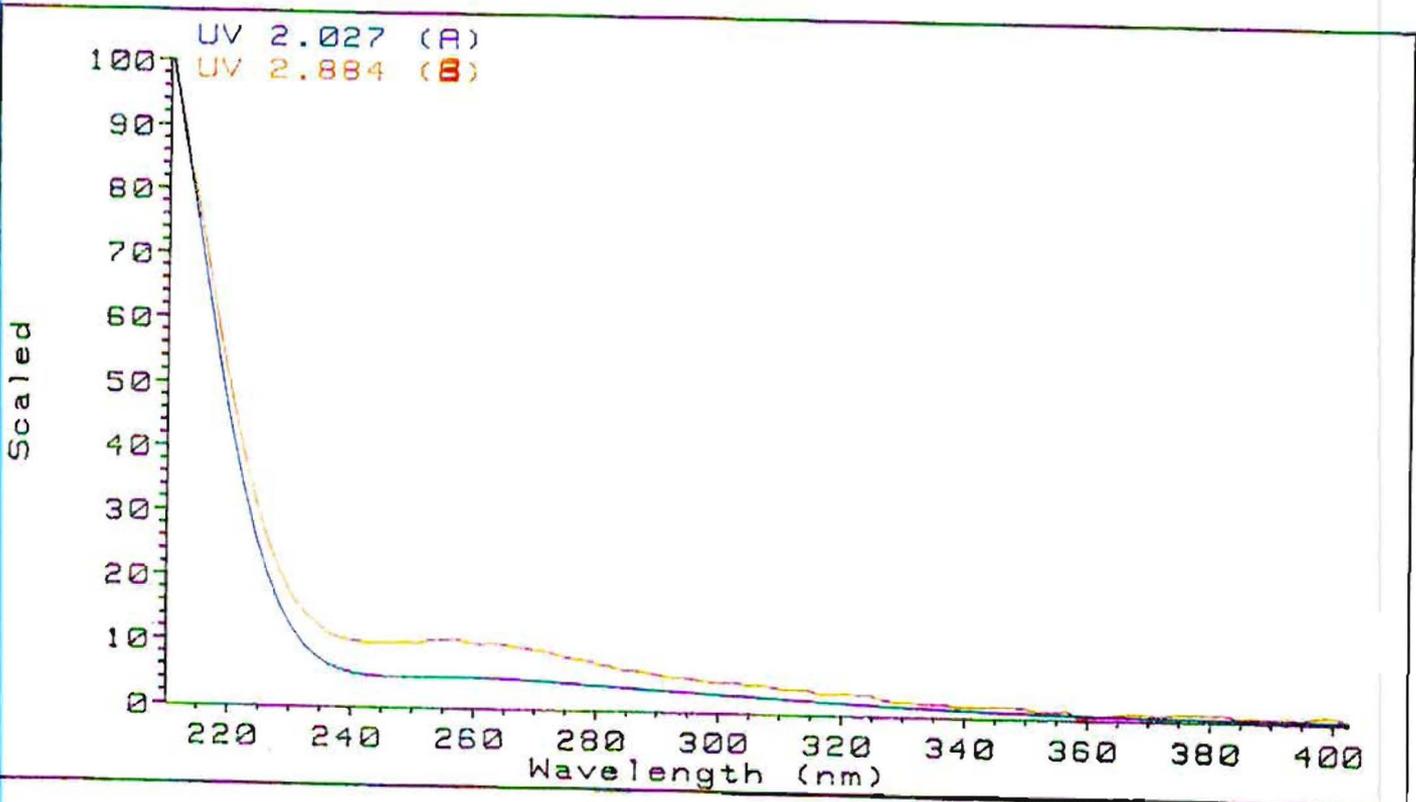
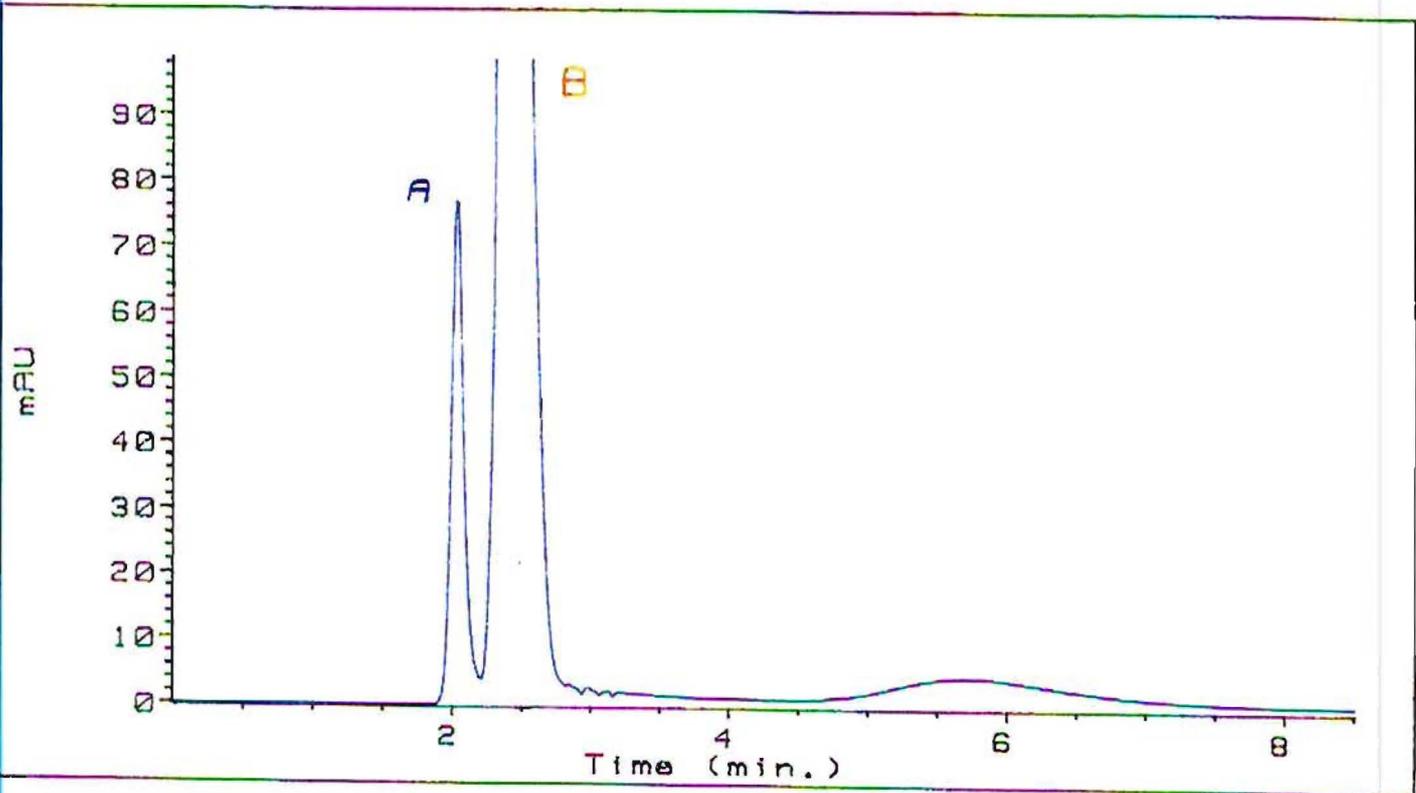


Figure 24 : chromatogramme (HPLC) avec gradient de solvant de l'extrait méthanolique et spectre d'absorption des composés présents

b) résultats

Les résultats des deux séries d'analyse vont dans le même sens : l'extrait brut méthanolique utilisé ne contient pas d'acides phénoliques.

L'extrait injecté (10 µl) est un extrait méthanolique du 23 novembre, concentré 50 fois (1 litre → 20 ml).

On observe sur le graphe deux pics. Les deux composés qui leur correspondent présentent un maximum d'absorption à 220 nm et n'absorbent plus après 230 nm (figure 24). Ce spectre d'absorption n'est pas caractéristique des acides phénoliques. En effet, ceux-ci présentent un spectre dont le maximum d'absorption se situe autour de 320 avec un épaulement plus ou moins net à 290 nm (ARMENGAUD, 1994) (cf annexe 5). Ce résultat nous laisse donc penser que l'extrait brut méthanolique ne contient pas d'acides phénoliques.

4. conclusion

Cette deuxième série d'analyses confirme la première, à savoir l'absence d'acides phénoliques dans l'extrait méthanolique.

A ce stade des analyses, on peut donc se demander quelle est la source de réaction avec le réactif de Folin.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

La première qui consiste à dire que l'extrait contient des composés phénoliques autres que les acides phénoliques (par exemple des flavonoïdes, qui constituent une très grande famille de composés phénoliques).

Dans cette hypothèse, la présence de ce type de composés ne peut être révélée que faiblement avec Folin-Ciocalteu dans l'extrait méthanolique, en raison d'une très faible solubilité de ces formes phénoliques dans le méthanol.

Dans une deuxième hypothèse, on peut envisager le fait que l'extrait contient des composés non phénoliques qui réagissent avec le réactif de Folin (puisque celui-ci n'est pas spécifique, cf figure 20). Il pourrait s'agir notamment d'acides organiques, composés polaires pouvant correspondre aux pics observés sur les chromatogrammes (certains acides organiques possédant de plus des propriétés allélopathiques, cf tableau 25), ou d'autres composés organiques.

Dans la partie suivante nous allons donc tester ces deux hypothèses.

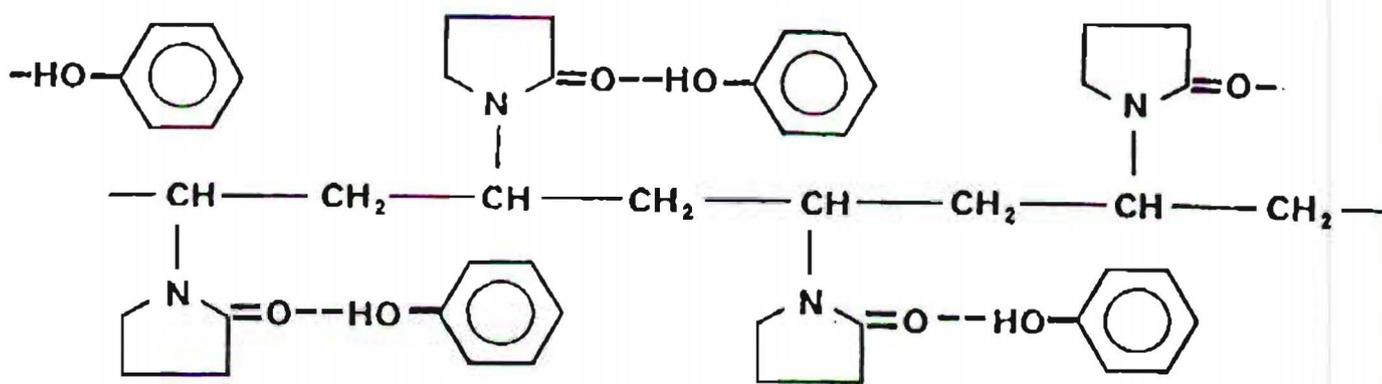


Figure 25 : liaisons hydrogènes polyvinylpyrrolidone/phénol
 (d'après Andersen et Sower, 1968, cité par Tantawy, 1983)

III- RECHERCHE DU OU DES COMPOSES PRESENTS DANS L'EXTRAIT METHANOLIQUE ET REAGISSANT AVEC LE REACTIF FOLIN-CIOCALTEU.

Nous avons commencé par explorer l'hypothèse de la présence dans l'extrait méthanolique de composés phénoliques autres que les acides phénoliques.

A- Recherche des composés phénoliques autres que les acides phénoliques

Pour cette recherche, nous avons utilisé le polyvinylpyrrolidone (PVP) (vendu comme Polyclar AT), gel de polyamide, utilisé pour séparer les phénols d'extraits végétaux.

Il retient préférentiellement la fraction phénol en formant des liaisons hydrogènes entre les groupes phénoliques OH et l'oxygène attaché au noyau pyrrolidone du PVP (figure 25).

L'adsorption sur Polyclar est donc fonction du nombre de groupements hydroxyles portés par la molécule (MARIGO, 1972).

Il s'utilise en association avec la méthode de dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu, pour déterminer la fraction de composés phénoliques totaux.

En effet, lors du dosage colorimétrique avec ce réactif, l'apparition du complexe coloré n'est pas spécifique de la présence des phénols, le réactif de Folin pouvant réagir avec d'autres constituants non phénoliques (cf figure 20).

L'utilisation d'une telle méthode de dosage implique donc l'élimination préalable des substances réductrices non aromatiques pouvant interférer.

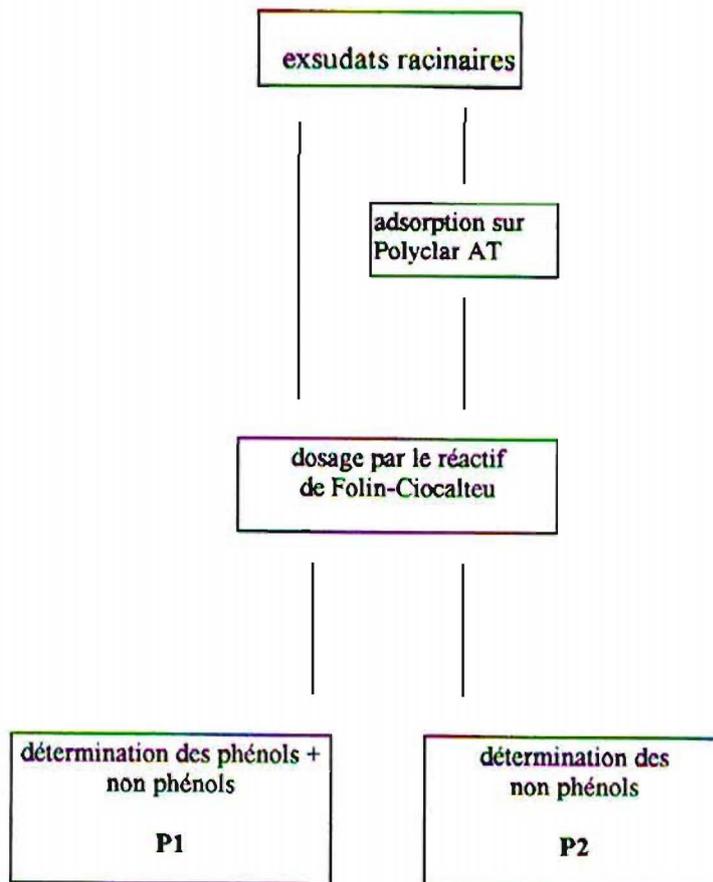
L'estimation de la fraction phénolique se fait par détermination de son pouvoir réducteur (avec Folin) par différence avant et après traitement avec le Polyclar (MARIGO, 1972) : en dosant la solution avant et après son passage sur Polyclar, on peut déterminer la quantité de composés phénoliques présents dans la solution de départ (figure 26 page suivante)

MARIGO (1972) a déterminé les conditions optimales d'adsorption des phénols sur Polyclar (cf annexe 6) en utilisant différents mélanges de composés phénoliques les plus répandus chez les végétaux.

La densité optique de notre solution d'exsudats est la même avant et après adsorption sur Polyclar.

Dans le cas de nos exsudats racinaires, aucune fraction phénolique n'a donc été retenue par le Polyclar..

Ce résultat signifie que l'extrait méthanolique ne contient pas de composés phénoliques, et que la couleur bleue n'est par conséquent pas due à des composés phénoliques.



$$\text{fraction phénolique } P = P1 - P2$$

Figure 26 : principe d'utilisation du Polyclar AT

Dans la partie suivante, nous nous sommes donc attachés à déterminer la présence dans l'extrait de composés organiques.

B- Recherche des composés organiques

Pour orienter cette recherche, nous nous sommes basés sur la bibliographie concernant la nature chimique des exsudats racinaires ainsi que sur les travaux de Box recensant les composés réagissant avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

Par ordre d'importance, les composés prédominants dans les exsudats racinaires sont les acides aminés, suivi de la famille des sucres et de celle des acides organiques (tableau 1).

Dans ces trois familles, on trouve de plus des composés susceptibles de réagir avec le réactif de Folin-Ciocalteu (cf figure 20).

Nous nous sommes donc intéressés à la présence de ces trois familles en commençant par celle des acides organiques ; en effet, certains d'entre eux sont reportés comme responsables de phénomènes allélopathiques (cf tableau 25).

1. Recherche des acides organiques

a) mise en évidence par HPLC

- injection de l'extrait (extrait évaporé à sec et repris dans l'acide métaphosphorique ; en effet, le méthanol absorbant à 215 nm, il fallait impérativement changer le solvant)
On observe un composé majoritaire dont le pic sort à 5,43 (figure 27 page suivante).

- injection d'un standard : l'acide oxalique
On observe un pic à 4,69 qu'on peut assimiler au solvant.
Le pic correspondant à l'acide oxalique sort à 5,43 (figure 27). On peut donc émettre l'hypothèse selon laquelle le composé majoritaire dans notre extrait est de l'acide oxalique. Une vérification s'impose cependant.

- injection de l'extrait purifié
L'acide oxalique complexe avec l'hydroxyde de calcium. On procède donc à une purification en ajoutant dans notre extrait de l'hydroxyde de calcium (800 µl pour 200 µl d'exsudats). Après centrifugation, on recueille la solution purifiée qu'on injecte (d'après Harborne, 1984).
La surface du pic correspondant à l'acide oxalique a diminué, mais il faut tenir compte de la dilution. En effet, l'ajout d'hydroxyde de calcium a eu comme résultat de diluer 5 fois nos exsudats. Pour comparer la surface du pic de l'extrait purifié avec celle de l'extrait non purifié, il faut donc multiplier par 5.
surface de l'extrait non purifié = 47119863
cette surface / 5 = 9423972,6
or, la surface de l'extrait purifié (3382622) est inférieure, ce qui prouve qu'une partie de l'acide oxalique a disparu.
On ne retrouve que 36 % de l'acide oxalique.

conditions expérimentales

$\lambda = 215 \text{ nm}$ (spécifique des acides organiques)

solvant : acide métaphosphorique à 0,8 % (dans bain-marie à 45 °C)

débit : 0,6 ml/min

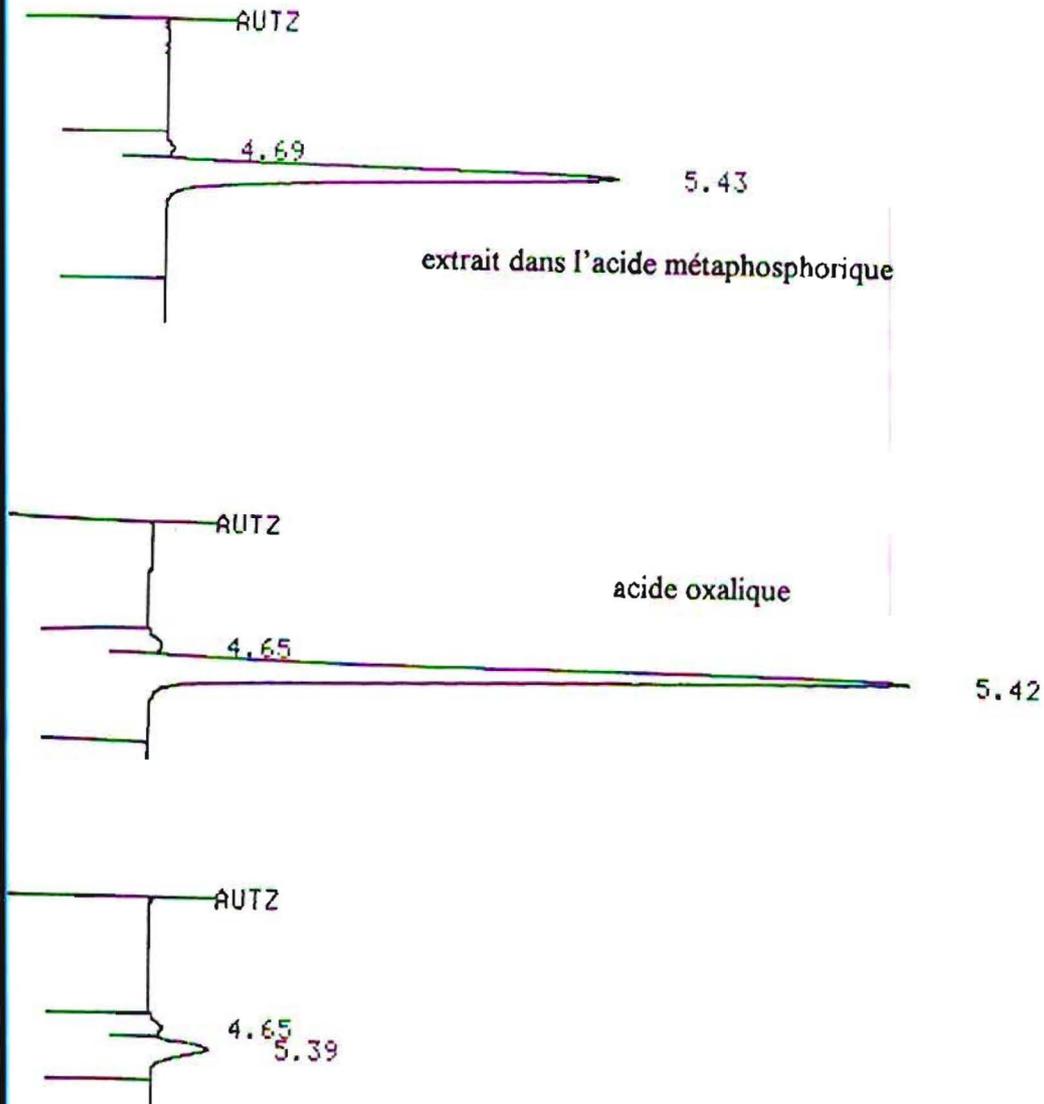


Figure 27 : chromatogramme (HPLC) de l'extrait pour la recherche d'acide organique

Cependant, tout cet acide oxalique, s'il s'agit bien de ce composé, n'a pas disparu. De plus, le pic qu'on pourrait apparenter à l'acide oxalique sortant très tôt, il peut s'agir également de tous composés n'étant pas retenus par la colonne. Une vérification de la nature de ce composé s'imposait donc.

b) vérification par chromatographie ionique

Les acides organiques obéissent à la loi générale de dissociation des acides faibles :



Ces acides peuvent passer facilement sous forme anionique, c'est pourquoi on envisage leur dosage par chromatographie ionique qui est une méthode performante et précise de dosage d'anions. En effet, l'éluant utilisé contient de la soude, or en milieu basique tous ces acides sont sous forme anionique, ils pourront donc être détectés (J.Lopez, 1994).

L'appareil de chromatographie ionique utilisé, DIONEX 4500i, utilise la technique de la chromatographie ionique haute performance (HPIC).

La particularité de cet appareil vient du fait qu'il utilise un procédé de neutralisation chimique de l'éluant par micromembrane de suppression, ce qui accroît énormément la sensibilité de détection. (cf description et mode de fonctionnement en annexe 7).

L'éluant est un mélange d'eau et de soude ; le gradient s'échelonne de 0,2 millimolaire à 2 millimolaires.

- injection d'exsudats

Quatre échantillons sont testés :

- l'échantillon 1 est un extrait de solution nutritive
- l'échantillon 2 est un extrait d'exsudats en concentration naturelle du 22 novembre
- l'échantillon 3 est un extrait d'exsudats repris dans le méthanol et concentrés 20 fois
- l'échantillon 4 est un extrait d'exsudats repris dans le méthanol et concentrés 85 fois

L'injection de la solution nutritive fait apparaître 4 pics, correspondant aux quatre ions minéraux présents dans la solution nutritive (figure 28) :

- le premier (qui sort à 7,2) correspond (d'après le standard) au chlorure
- le deuxième (11,2) correspond au nitrate
- le troisième (15,35) correspond au sulfate
- le quatrième (18,71) correspond au phosphate

L'injection des exsudats en concentration naturelle nous donne les mêmes pics que la solution nutritive, avec une petite patatoïde qui sort à 12,7.

Cependant, les pics sont plus importants alors que l'échantillon est deux fois plus dilué. On peut expliquer ce phénomène de la façon suivante : le calopogonium absorbe plus d'eau que de minéraux, la solution qui sort des bacs de calopogonium est donc plus concentrée que la solution nutritive qui y arrive.

La «patatoïde» peut être assimilée au fer EDTA.

L'injection des deux échantillons d'exsudats concentrés fait apparaître les mêmes pics, moins le sulfate qui a disparu (on peut attribuer cette disparition à la reprise de l'échantillon

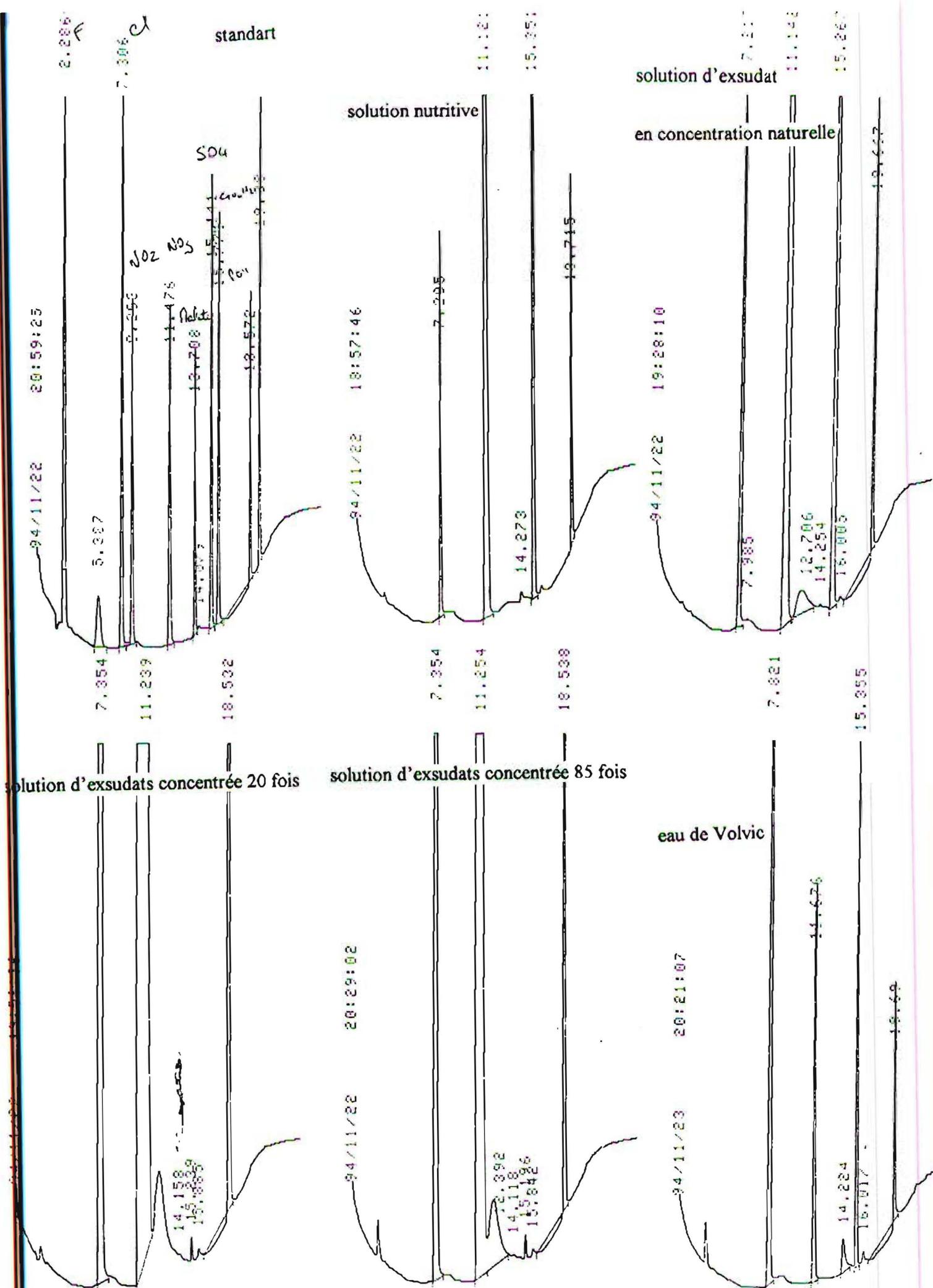


Figure 28 : chromatogramme (DEDL) de différents extraits pour la recherche d'acides

évaporer dans le méthanol ; le sulfate n'est apparemment pas soluble dans ce solvant). On observe en plus un pic large aux environs de 12,3, qui pourrait correspondre au pic sortant à 12,7 dans les exsudats en concentration naturelle, dont la surface est plus importante dans les échantillons 3 et 4 que dans l'échantillon 2 puisque dans ceux-ci, les exsudats sont concentrés.

On observe dans tous les échantillons un petit pic sortant aux environs de 14. En injectant de l'eau de Volvic, on retrouve ce pic. On peut donc l'assimiler à du carbonate.

Dans un deuxième temps, on mélange à ces quatre échantillons de l'acide chlorhydrique afin de décomplexer l'acide oxalique. En effet, dans la solution nutritive, dont le pH est basique, il a pu se chélater avec le calcium ou le fer (à pH basique, l'acide oxalique se présente sous sa forme dissociée : $C_2O_4^{--}$). De plus, l'injection dans la colonne de séparation va encore augmenter le pH (l'éluant étant de la soude). Or, sous forme de chélate de fer ou de calcium, l'acide oxalique est indétectable.

Au contraire, à pH acide, il se trouve sous sa forme non dissociée ($C_2O_4H_2$) et sera donc beaucoup plus facilement détectable.

Après avoir ajouté 1/5° d'hydroxyde de calcium, on fait passer les échantillons sur une résine échangeuse d'ion pour éliminer les cations (en l'occurrence la calcium et le fer), pour éviter que ceux-ci ne se recomplexent avec l'oxalate en repassant en pH basique (à cause de l'éluant : la soude).

On observe une forte augmentation de la surface du pic de chlorure (du à l'ajout d'HCL), on retrouve le pic de NO_3 , SO_4 et PO_4 (figure 29).

Enfin, on observe un pic qui sort aux environs de 16 (que nous appellerons pic A, et qui pourrait correspondre à un pic d'acide oxalique). Cependant, on retrouve ce pic également dans l'échantillon de solution nutritive (à concentration à peu près égale), ce qui prouve que ce composé, quand bien même il s'agirait de l'acide oxalique, n'est pas exsudé par les racines puisqu'il se trouve déjà dans la solution nutritive.

On peut penser que ce pic provient des résines (pollution), ou de la solution nutritive.

- recherche de la nature du pic A

Pour vérifier si ce pic n'est pas du à une pollution des résines, on fait passer sur ces dernière de l'eau distillée, qu'on injecte ensuite ; aucun pic aux environs de 16 n'apparaît (figure 30 page suivante). On peut donc affirmer que ce pic n'est pas du à une quelconque pollution des résines.

On injecte ensuite du fer EDTA (présent dans la solution nutritive, ce fer n'est pas un composé pur, il s'agit de ferfol sous forme de poudre soluble, contenant 13 % de fer chélaté par l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique) après l'avoir fait passer sur des résines pour éliminer le fer. On observe alors un pic à 13, qui peut s'apparenter à l'EDTA (pic qui sortait à 12 et des poussières dans les premiers chromatogrammes).

En injectant du fer EDTA après ajout d'HCL et passage sur résines, on voit apparaître un pic à 15,8, pouvant être assimilé à de l'oxalate. Comme expliqué plus haut, le fait d'ajouter de l'HCL fait baisser le pH et permet de retrouver l'acide oxalique sous sa forme acide, non dissocié (alors qu'à pH basique il a pu se complexer avec le fer), tandis que les résines ont pour but d'éliminer les cations (en l'occurrence le fer).

Cette observation peut expliquer l'origine du pic A apparu dans les quatre échantillons après ajout d'HCL et passage sur résine.

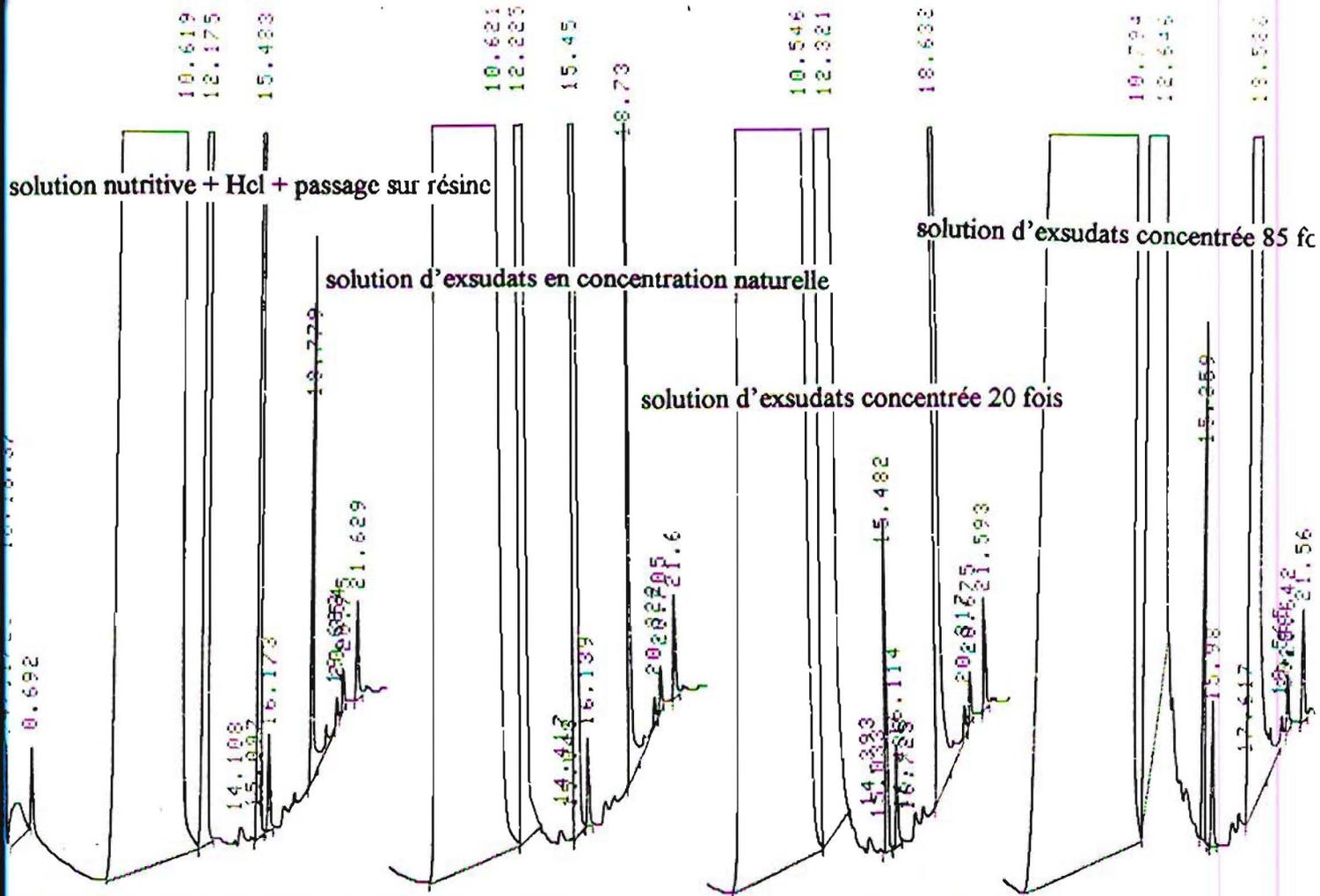


Figure 29 : chromatogramme (DEDL) de différents extraits pour la recherche d'acides organiques après ajout d'HCl et passage sur résine

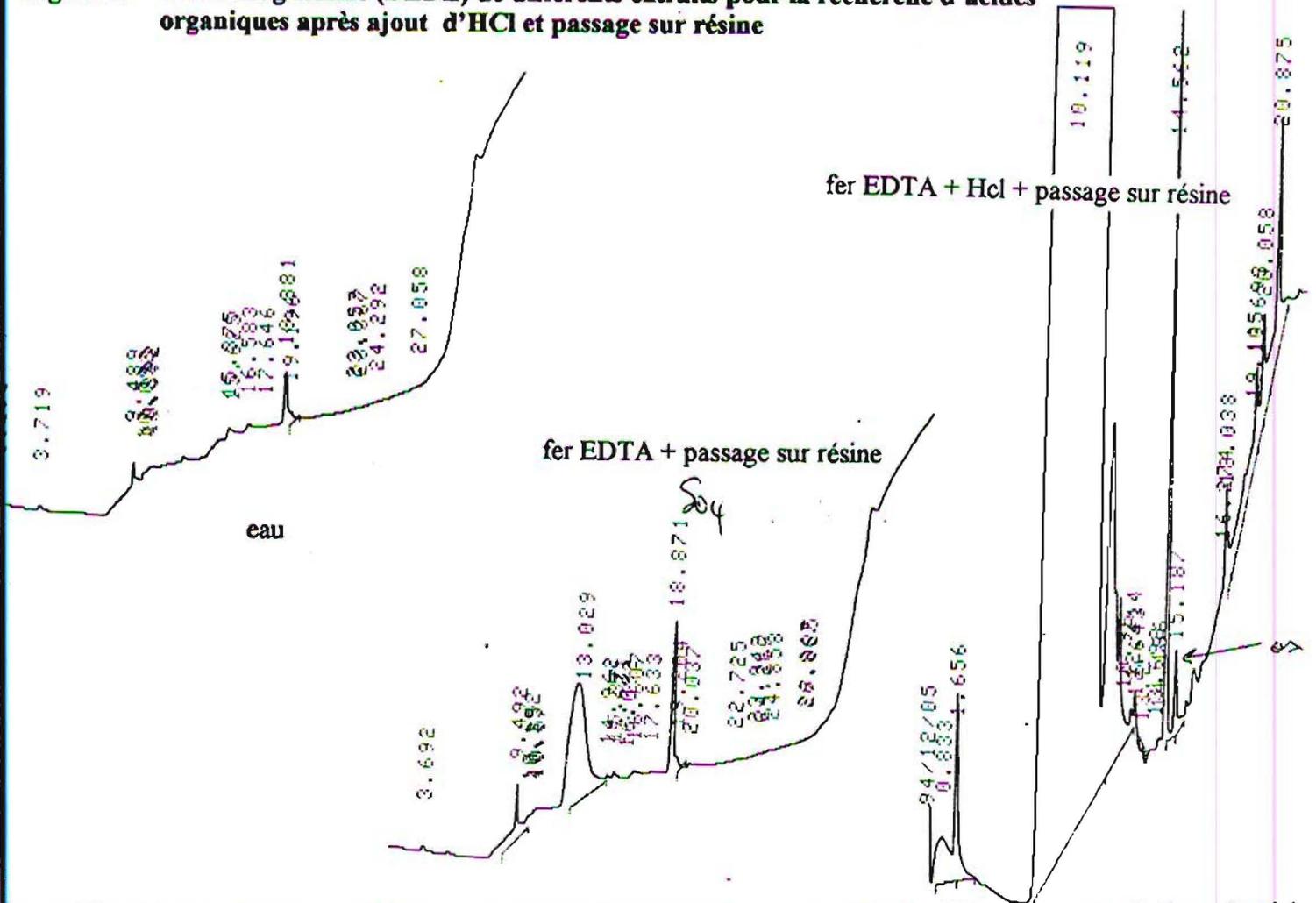


Figure 30 : chromatogramme (DEDL) de différents composés pour la recherche d'éventuelles pollutions de résin

- conclusion

Ces analyses par chromatographie ionique nous ont permis de mettre en évidence un composé qu'on peut assimiler à de l'acide oxalique. Ce composé est à priori présent aussi bien dans la solution nutritive que dans les exsudats, ce qui nous fait dire qu'il n'est pas exsudé par les racines et qu'il n'est pas non plus à l'origine des effets allélopathiques observés dans les test biologiques.

On peut penser que c'est bien ce composé qui avait été détecté par HPLC et complexé par l'hydroxyde de calcium. En effet, les extraits injectés dans l'HPLC ont un pH voisin de 3 ; le solvant utilisé pour l'HPLC étant d l'acide métaphosphorique (pH acide), l'acide oxalique reste sous forme acide, non dissociée (C₂O₄H₂).

Mais en analysant ces extraits par chromatographie ionique, le pH augmente considérablement à cause de l'éluant (soude) ; à ce pH (voisin de 12), l'acide oxalique passe sous forme dissociée, se complexe avec le fer et est indétectable. C'est la raison pour laquelle on ne trouve des traces d'acide oxalique avec la chromatographie ionique qu'après ajout d'HCL et passage sur résine.

Le composé actif dans les exsudats n'est à priori pas un acide organique, à moins qu'il soit en quantité trop infime pour être détecté, d'autant plus que la présence des ions minéraux gêne la détection.

Même si cet acide oxalique n'est pas responsable des phénomènes allélopathiques, on peut se demander s'il est à l'origine de la coloration bleue détectée avec Folin.

D'après la bibliographie, nous savons que les exsudats racinaires peuvent contenir de nombreux acides organiques (cf tableau 25).

D'après les travaux de J.D Box, nous savons que certains acides organiques réagissent avec Folin (cf figure 20).

Nous avons détecté la présence d'acide oxalique dans nos exsudats, il nous fallait donc tester une solution aqueuse d'acide oxalique avec le réactif de Folin.

Après ajout du réactif, du carbonate de sodium et passage au bain-marie pendant 30 mns, aucune coloration bleue n'est apparue.

Ce n'est donc pas l'acide oxalique qui est responsable de la couleur bleue observée avec Folin.

2. Recherche des acides aminés

Pour tester la présence d'acides aminés, nous avons utilisé une chromatographie phase inverse sur une colonne de silice greffée hypersyl 3 μ , après avoir dérivé les acides aminés à l'orthophthaldialdéhyde. Le gradient de solvant utilisé est un mélange de méthanol et d'acétate de sodium (2g/l) à 1 % en tétrahydrofurane. La détection est réalisée par un fluorimètre à deux longueurs d'onde de 360 et 455 nm (figure 31 page suivante)

Cette chromatographie nous a permis d'évaluer la quantité d'acides aminés dans notre extrait. Ces quantités sont très faibles (de l'ordre de 5-10 μ g/l, ce qui correspond pour l'anecdote à la quantité d'acides aminés présents dans l'eau du robinet).

solution d'exsudats

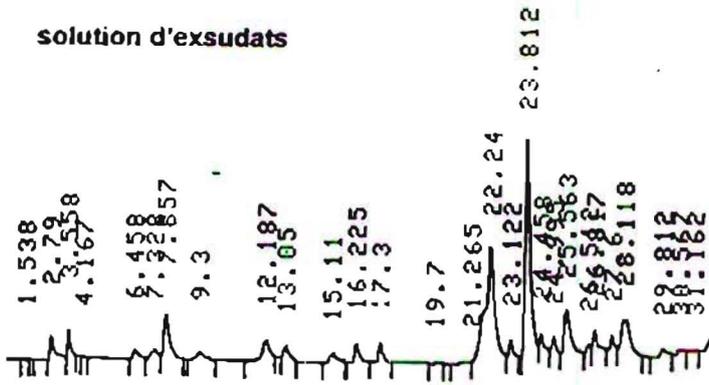


Figure 31 : chromatogramme des acides aminés

COLONNE Spherisorb NH2 5um

DEBIT: 0.9 ml/min

DETECTEUR: DEDL T=50c Gain 7

SOLVANTS:	0mn	ACETONITRILE	80%	EAU	20%
	20		68		32
	20.1		50		50
	25		50		50
	25.1		80		20
	33		STOP		

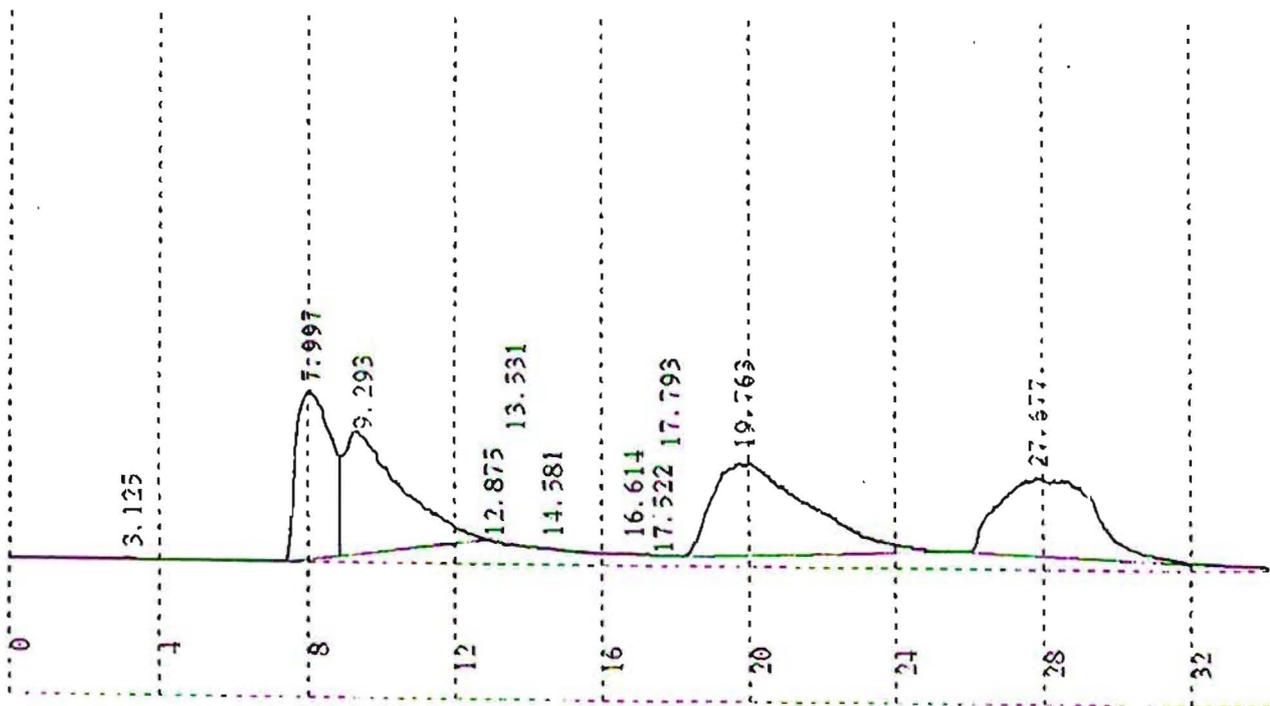


Figure 32 : chromatogramme des sucres

Seuls deux pics se détachent sur le graphe. Le pic à 23,8 peut s'apparenter à la phénylalanine, mais cet acide aminé ne réagit pas avec Folin, conformément aux travaux de Box (cf figure 20).

3. Les sucres

Nous avons cherché la présence de sucre dans nos exsudats, en utilisant une méthode chromatographique et une détection à diffusion de lumière (cf annexe 7). L'emploi de ce type de chromatographe est justifié par le fait que les sucres absorbent à 200 nm ; à cette longueur d'onde, toute la matière organique absorbe, on ne peut donc pas utiliser une chromatographie classique pour rechercher des sucres.

Sur le chromatogramme obtenu, on observe deux pics dont les temps de rétention sont 7,99 et 9,29, qui peuvent être assimilés successivement à du xylose et de l'arabinose (figure 32). Le profil chromatographique laisse apparaître deux pics très mal chromatographiés qui ont toutes les chances de ne pas être des composés purs.

La publication de Box (cf figure 20) ne nous renseignant pas sur la réactivité de l'arabinose et du xylose avec le réactif de Folin, nous avons donc réalisé nous-mêmes l'expérience.

Aucune coloration bleue n'apparaît lorsqu'on ajoute du réactif de Folin à une solution aqueuse de xylose et d'arabinose et que l'on chauffe ces solutions au bain-marie pendant 30 mn.

En raison de l'absence de réaction avec la méthode de Folin, la coloration bleue de notre extrait ne peut en aucune manière être associée à la présence de ces composés.

C- Conclusion

La coloration obtenue avec le réactif de Folin n'est due à priori ni à des composés organiques, ni à des composés phénoliques.

Les deux hypothèses que nous avons formulées s'avèrent donc fausses. La question reste donc posée : quelle est la nature du ou des composé(s) réagissant avec ce réactif ?

La deuxième question que l'on peut se poser est la suivante : quelle est la nature des composés dont nous avons détecté la présence par les pics observables sur les chromatogrammes ?

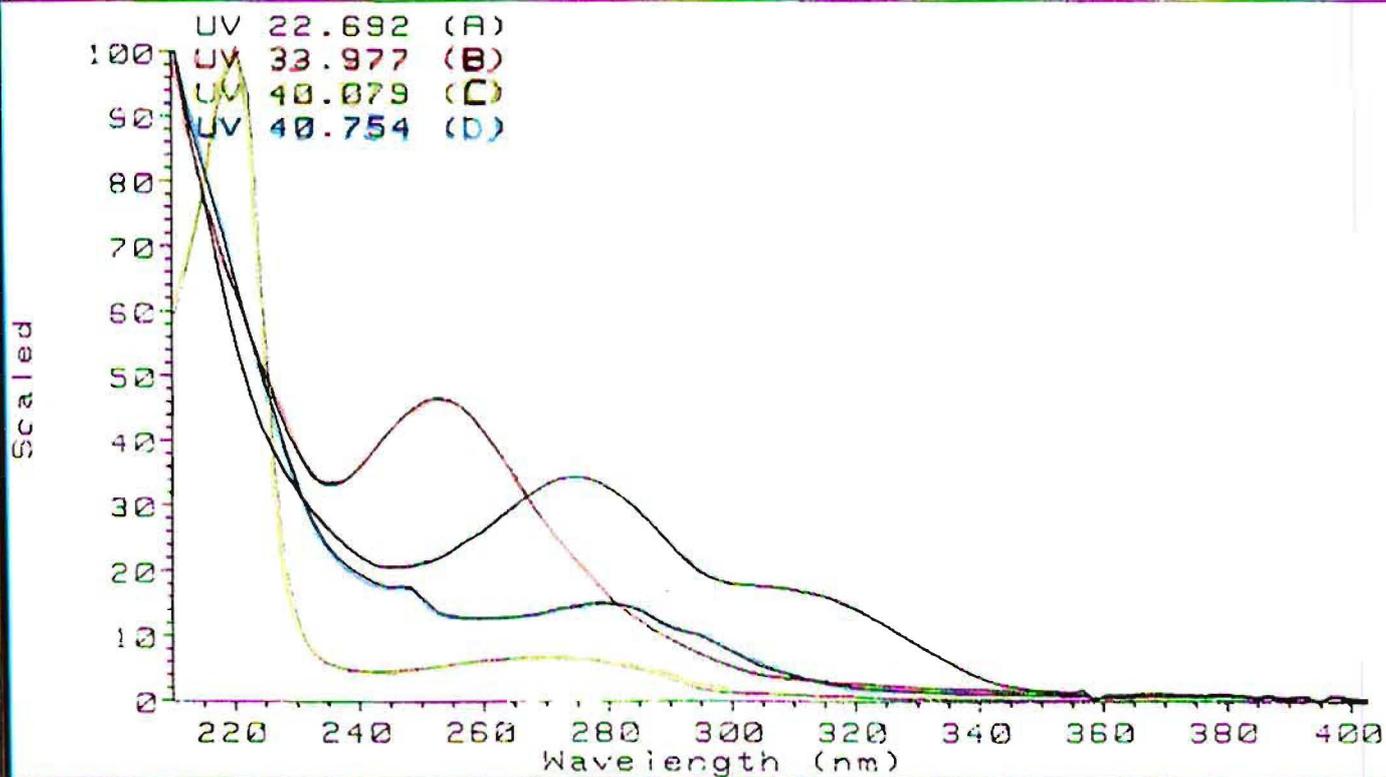
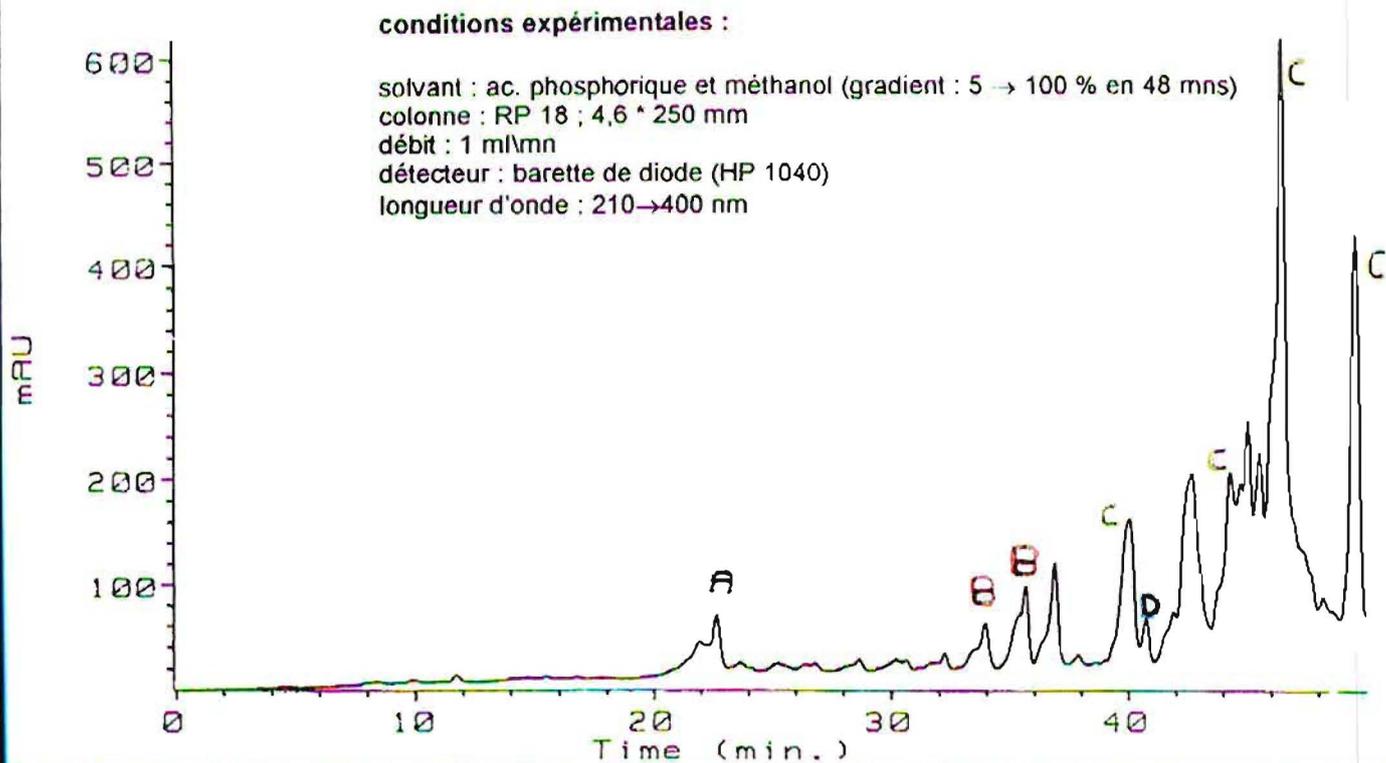


Figure 33 : chromatogramme de l'extrait à l'acétate d'éthyle et spectre d'absorption des composés présents

Ces pics ne caractérisent pas à priori la présence de composés organiques : en effet, les acides aminés et les sucres sont présents en quantité trop faible pour être à l'origine de ces pics ; quant aux acides organiques, les exsudats racinaires du calopogonium ne semblent pas en contenir.

IV- CONCLUSION - DISCUSSION

Les analyses auxquelles nous avons procédé nous ont appris que les exsudats racinaires de calopogonium ne contenaient pas d'acides phénoliques, composés allélopathiques les plus courants dans les exsudats racinaires de plantes.

Mais ces analyses nous ont conduits à poser d'autres questions. En effet, l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu, sensé détecter la présence de composés phénoliques, laisse apparaître une coloration bleue avec les extraits méthanoliques alors que ceux-ci ne contiennent pas de composés phénoliques.

On peut donc, se demander quelle est la nature du ou des composé(s) réagissant(s) avec ce réactif.

Lors des analyses chromatographiques, nous avons pu observer sur les chromatogrammes la présence de pics (deux ou trois selon les analyses), dont nous ne connaissons pas l'origine (cf figures 23 et 24).

A ces résultats s'en sont ajoutés d'autres. En effet, lors d'un essai de concentration par lyophilisation, nous avons procédé à une extraction à l'acétate d'éthyle (cf annexe 8). En dosant avec le réactif de Folin l'extrait aqueux et l'extrait à l'acétate d'éthyle, on s'aperçoit que toute la coloration bleue se retrouve dans l'extrait à l'acétate d'éthyle.

En injectant cet extrait dans une HPLC avec gradient de solvant et barrette diode, on observe 4 pics (figure 33). Le composé dont le temps de rétention est le plus faible (composé A sur la figure 33) est caractérisé par un spectre d'absorption qui s'apparente à celui des flavonoïdes. En effet, le spectre ultraviolet de la plupart des flavonoïdes comporte, en milieu acide ou neutre, deux maxima d'absorption : l'un entre 240 et 280 nm, l'autre entre 300 et 400 nm (TANTAWY, 1983).

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques peu polaires, solubles dans l'acétate d'éthyle et réagissant avec Folin. On peut donc penser que ces composés sont responsables de la coloration bleue observée dans l'extrait à l'acétate d'éthyle.

Cependant, même si l'on arrive à déterminer la présence de flavonoïdes dans les exsudats racinaires du calopogonium, cela n'explique en rien le comportement de l'extrait méthanolique avec le réactif de Folin. En effet, les spécificités d'extraction du méthanol et de l'acétate d'éthyle sont très différentes et ils n'extraient pas les mêmes composés. Les composés détectés dans l'extrait à l'acétate ne sont donc vraisemblablement pas responsables de la coloration bleue observée dans l'extrait méthanolique.

La question de savoir quels sont les composés réagissant avec Folin dans cet extrait reste donc entière.

Ces derniers résultats remettent partiellement en cause le choix de l'agent extractif, à savoir le méthanol. En effet, si celui-ci est susceptible d'extraire les acides phénoliques, il n'extraie pas les composés peu polaires. Or, maintenant que nous avons montré l'absence d'acides phénoliques, l'utilisation du méthanol est critiquable. Le fait de découvrir dans l'extrait à l'acétate d'éthyle des composés non détectés dans l'extrait méthanolique montre que ce dernier n'est pas exhaustif.

D'ailleurs, lors des expériences préliminaires que nous avons effectuées avant de doser les solutions d'exsudats avec le réactif de Folin-Ciocalteu, nous nous sommes aperçus que la coloration obtenue avec une solution d'exsudat concentrée par évaporation à vide mais non reprise dans le méthanol (l'évaporation à vide n'est pas conduite jusqu'au bout) est deux fois plus intense que celle obtenue avec l'extrait méthanolique correspondant. Cette observation conforte l'hypothèse selon laquelle tous les composés susceptibles d'être à l'origine de la coloration bleue et de provoquer les phénomènes allélopathiques observés ne sont pas repris dans le méthanol.

En extrayant la solution concentrée avec le méthanol, on limite les possibilités de détection des composés présents dans les exsudats : on ne retrouvera dans l'extrait méthanolique que les composés majoritairement solubles dans ce solvant.

Or, pour atteindre l'objectif fixé, à savoir relier les effets observés à la présence de substances dans les exsudats, il convient de déterminer avant tout l'agent extractif susceptible d'être le plus exhaustif possible.

Le procédé d'extraction que nous avons donc mis au point en vue de la détection d'acides phénoliques est donc à revoir. Ce procédé d'extraction doit répondre à un objectif d'exhaustivité.

Par la suite, avant de continuer à utiliser l'évaporation sous vide, il faudra prendre soin de tester différents réactifs avant d'en choisir un, et en respectant la température maximale d'évaporation de 40°C.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif que nous nous étions fixé lors de cette étude était de déterminer si le *Calopogonium mucunoïdes*, plante de couverture utilisée en Afrique et Amérique latine et très intéressante sur le plan agronomique, possédait des propriétés allélopathiques.

Nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement aux substances exsudées par les racines du calopogonium, en testant ces substances sur différentes plantes adventices et de culture d'Afrique.

L'originalité de notre étude réside dans le fait que nous avons utilisé des exsudats en concentration naturelle pour mettre en évidence d'éventuels effets allélopathiques, c'est à dire en conditions proches de la réalité agronomique.

En effet, les composés allélopathiques se trouvent en général en quantité infime ; les auteurs d'études sur l'allélopathie commencent donc par concentrer ces exsudats avant de les tester. Mais les résultats qu'ils obtiennent dans ces conditions ne peuvent en aucun cas préjuger de l'effet qu'auront ces exsudats en concentration naturelle. L'écart entre l'expérience et l'application est donc beaucoup plus grand dans leur cas que dans le nôtre.

Un objectif annexe était de tenter une première approche biochimique dans le cas où nous mettrions en évidence un effet allélopathique.

Nous avons donc montré l'action des exsudats racinaires de calopogonium sur des plantes en croissance, en serre, dans des pots individuels, montrant par là même l'existence d'effets allélopathiques.

Nous n'avons pu mettre en évidence l'action de ces exsudats en concentration naturelle sur la germination des graines testées.

Enfin, nous avons observé que les exsudats racinaires du calopogonium modifiaient la composition minérale des plantes

Au terme de cette étude, nous pouvons donc affirmer qu'en conditions naturelles, les exsudats racinaires de calopogonium peuvent avoir un effet, dépressif sur la croissance de certaines plantes qui l'entourent (cultures ou adventices), de façon sélective.

Même si nous n'avons pas déterminé le mode d'action précis mis en cause, nous pouvons toutefois avancer une première hypothèse.

En effet, grâce au test d'évapotranspiration et aux observations faites tout au long de l'étude (résultats obtenus comparés aux conditions climatiques de la serre), nous pouvons avancer

l'hypothèse selon laquelle le ou les composé(s) en cause réduiraient l'absorption de l'eau par la plante.

Cette hypothèse reste à vérifier, en imaginant par exemple d'étudier les plantes tests dans une cellule isolée en mesurant précisément en conditions contrôlées les évolutions de la photosynthèse et de la transpiration d'une plante sensible (Euphorbe) sous l'effet de solutions d'exsudats, ou encore en mesurant le déficit hydrique au niveau foliaire (potentiel hydrique). Ces expériences devraient permettre de mieux préciser la nature des phénomènes.

De même, on peut envisager par la suite plusieurs autres voies de recherche :

La culture du calopogonium sur un milieu de culture stérile (ex Agar), dont on se servirait pour conduire les tests de croissance et de germination.

En effet, les résultats obtenus jusqu'à présent l'ont été à partir d'exsudats racinaires et peuvent peut-être être attribués à une métabolisation des produits excrétés par la plante (due à une microflore inféodée au système racinaire des plantes).

Après avoir obtenu des résultats probants avec des exsudats racinaires, il serait intéressant de savoir si on retrouve des effets allélopathiques par lessivage des parties aériennes du calopogonium.

Cette méthode permettrait de mettre en évidence la présence de substances chimiques libérées par les parties aériennes du calopogonium et susceptibles d'avoir un effet allélopathique sur les plantes testées.

On peut aussi imaginer des tests de croissance avec incorporation des parties aériennes séchées. Celles-ci seraient déposées à la surface des pots, afin de recréer l'effet d'une couverture de calopogonium mort. De fait, l'utilisation essentielle du calopogonium avec les cultures annuelles se fait sous forme de couverture morte.

En ce qui concerne la partie biochimique, nous avons pu montrer l'absence d'acides phénoliques dans les exsudats du calopogonium.

Ce résultat a remis en cause la méthode de concentration et surtout la méthode d'extraction que nous avons mise au point.

Une des suites de ce travail serait donc de revoir la méthode de concentration des exsudats en tenant compte des conclusions auxquelles nous sommes arrivés.

On peut par exemple envisager la mise en place de capteurs contenant de la résine XAD4, chargés d'intercepter les substances allélopathiques. Ceci pourrait être fait en gardant le

dispositif de récolte d'exsudats actuels ; en plaçant le capteur sur le trajet du tuyau qui draine les exsudats jusqu'à la bouteille. Ce dispositif permettrait non seulement de concentrer les exsudats, mais aussi d'éliminer les éléments minéraux qui gênent l'analyse biochimique (en étant susceptible de masquer la présence de certains composés organiques).

Afin de poursuivre ce travail biochimique tout juste commencé (détermination de la nature chimique des composés présents dans les exsudats du calopogonium) il semble indispensable de recueillir des solutions contenant des exsudats de même nature. En effet, il importe pour la recherche biochimique de posséder comme base de travail des échantillons les plus homogènes possibles en terme chimique.

Pour ce faire, la récolte des solutions de percolation doit impérativement être réalisée dans les mêmes conditions. Il faut également que le calopogonium soit soumis tout au long de la période de récolte aux mêmes conditions extérieures, l'exsudation dépendant de nombreux facteurs qu'il convient de maîtriser. Pour répondre à cet objectif, on peut donc envisager de faire pousser le calopogonium en chambre de culture, en conditions totalement contrôlées. La standardisation du protocole est une condition nécessaire à la poursuite des travaux biochimiques commencés.

Une fois déterminés les composés allélopathiques présents dans les exsudats du calopogonium, on peut imaginer de faire le lien entre ces composés et les effets observés sur les plantes. Pour ce faire, l'élaboration d'une solution "d'exsudats racinaires synthétiques" à partir de solution nutritive et du ou des produits standards correspondants aux composés allélopathiques identifiés, est envisageable ; solution qu'on utiliserait comme jus d'arrosage.

Cependant, ce travail d'inventaire des composés présents dans les exsudats de calopogonium s'annonce long et complexe. Les composés présents dans les exsudats racinaires sont vraisemblablement nombreux et de nature très différente. De plus, les exsudats sont mélangés à la solution nutritive ce qui peut gêner la démarche d'analyse. Enfin, on peut craindre les contaminations de la solution recueillie à partir des milieux de culture, et des récipients.

Même si l'on ne s'attache qu'à déterminer la présence dans les exsudats des composés considérés comme allélopathiques par la bibliographie, ceux-ci sont très nombreux. De plus, il n'est pas dit que ce sont ces composés qui seront responsables des effets observés sur les plantes. En effet, la plupart des 10000 métabolites secondaires des plantes connus (ce sont les métabolites secondaires qui sont la plupart du temps impliqués dans les phénomènes allélopathiques), n'ont pas été testés comme composé allélopathique, et sans doute plusieurs milliers supplémentaires sont présents dans les plantes (SWAIN, 1977, cité par EINHELLIG, 1984).

Le champ d'investigation s'annonce donc très large.

BIBLIOGRAPHIE

- ARMENGAUD P. (1994) : Les composés phénoliques des feuilles et attractivité des cacaoyers aux mirides. Rapport de stage, licence de Physiologie Végétale Appliquée. USTL, Montpellier.
- BELL D.T., KOEPPE D.E. (1972) : Non competitive effects of giant foxtail on growth on corn. *Agron. J.* 64, p. 321-325.
- BOGDAN G.P. (1971) : Anatomical study of effects in the plant conducting system of allelopathic substances. *Ukrains'k. Bot. Zhurn.* 28, p. 703-707.
- BOGDAN G.P., GRODZINSKY A.M. (1974) : Role of sulfhydryl groups in protective reactions of plants during allelopathic damage. *Ukrains'k Bot. Zhurn.* 30, p. 771-778. (In Ukrainian, Russian and English summaries.)
- BONNER J., GALSTON A.W. (1944) : Toxic substances from the culture media of gayule which may inhibit growth. *Bot. Gaz.* 106, p. 185-198.
- BOTTON H. (1958) : Les plantes de couverture. *Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée.* tome 5, p. 140.
- BOX J.D. (1981) : investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Res.* Vol 17, n° 5, p. 511-525.
- CARRASCO A. (1977) : Répercussion d'une stimulation provoquée du contenu phénolique du *Lycopersicon esculentum* Mill sur la résistance à la fusariose. Thèse pour le grade de Docteur de spécialité Physiologie Végétale. Université Paul Sabatier. Toulouse.
- CAUSSANEL J.P. (1975) : phénomène de concurrence par allélopathie entre adventices et plantes cultivées Columa-EWRC. Cycle international de perfectionnement en malherbologie, Versailles, 7 p.
- CHOU C.H., LIN H.J. (1976) : Autointoxication mechanisms of oryza sativa - Phytotoxic effects of decomposing rice residues in soil. *J. Chem. Ecol.* 2, p. 353-367.
- CHOU C.H., PATRICK Z.A. (1976) : Identification and phytotoxic activity of compound produced during decomposition of corn and rye residues in soil. *J. Chem. Ecol.* 2, p. 353-367.
- DEDONDER A., VAN SUMERE C.F. (1971) : The effect of phenolics and related compounds on the growth and the respiration of *Chlorella vulgaris*. *Z. Pflanzenphysiol.* 65, p. 70-80.
- DEMOS E.K, WOOLWINE R.H and MCMILLAN. (1975) : The effects of ten phenolic compounds on hypocotyl growth and mitochondrial metabolism of mung bean. *Amer. J. Bot.* 62, p. 97-102.

- DIETERMAN L. J., LIN C.Y., ROHRBAUGH L.M., THIESFELD V. (1964) : Identification and quantitative determination of scopolin and scopoletin in tobacco plants treated with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Anal. Biochem.* 9, 139-145.
- EINHELLIG F.A. (1984) : Effects of allelopathic chemicals on crop productivity. In : Bioregulators for pest control. *American chemical society.* p. 109-130.
- EINHELLIG F.A, ECKRICH (1983) : Interaction of temperature and ferulic acid stress on grain sorghum and soybeans. *J. Chem. Ecol.* in press.
- EVENARI M. (1949) : Germination inhibitors. *Bot. Rev.* 15, p. 153-194.
- FAY P.K, DUKE W.B. (1977) : An assessment of allelopathic potential in *Avena* germplasm. *Weed Sci.* 25, p.224-228.
- FLEURIET A. MACHEIX J.J. (1972) : Séparation et dosage par chromatographie en phase gazeuse de l'acide chlorogénique et des catéchines des fruits. *J. Chromatogr.* 74, p. 339-345.
- FONTAR X. et THOMAS L. (1987) : Etude des effets allélopathiques d'une couverture de kikuyu sur *Geranium*, cultures vivrières et certaines plantes adventices. Mémoire de fin d'étude. E.S.A. 154 p.
- FRIES N., FORSMAN B. (1951) : Quantitative determination of certain nucleic acid derivatives in pea root exsudate. *Physiol. Plant.* 4, p. 410-420.
- GEISSMAN T.A. (1962) : The chemistry of flavonoid compounds. Geissman, New-York.
- GRUMMER G. (1955) : Die gegenseitige Beeinflussung höherer pflanzen allelopathic. Fischer, Jean, 162 p.
- HALL A.B., BLUM U., FITER R.C. (1982) : Stress modification of allelopathy of *Helianthus annuus* L. debris on seed germination. *Am. J. Bot.* 69, p. 776-783.
- HARBORNE J.B. (1984) : Phytochemicals Methods. 2^o édition, Chapman and Hall, London, 288 p.
- HUMEAU L. (1993) : Etude des effets allélopathiques du kikuyu (*Pennisetum clandestinum*) sur la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) et deux plantes adventices : *Cyperus rotundus* L. et *Bidens pilosa* L. Diplôme de maîtrise, spécialité : chimie et biologie végétale, Université de la Réunion, Faculté des sciences., C.I.R.A.D.
- IRONS S.M., BURNSIDE O.C. (1982) : Competitive and allelopathic effects of Sunflower (*Helianthus annuus*). *Weed Science.* 30, p. 372-377.
- JACKSON J.R. and WILLEMSSEN R.W. (1976) : Allelopathy in the first stages of secondary succession on the piedmont of New Jersey. *Amer. J. Bot.* 63, p. 1015-1023.
- KALBURTZI K.L., GERA(R)KIS P.A., VOKOU D. (1989) : Allelopathy between wheat and fababeans as expressed by inhibitory effects on seed germination and growth. *Agr. Med.* 119, p. 372-382.

- LEATHER G.R., EINHELLIG F.A. (1985) : Mechanisms of allelopathic action in bioassay. In : American chemical society. The chemistry of allelopathy, Thompson, p. 197-205.
- LEATHER G.R., EINHELLIG F.A. (1986) : Bioassays in the study of allelopathy. In : Putnam A.R., Tang, C.S. The science of allelopathy. John Wiley and Sons, Inc, New York.
- LEBOURGEOIS T., GRARD P., MERLIER H. (à paraître) : Adventrop.
- LOLA P.C. and COBLE H.D. (1982) : Noncompetitive effects of Johnsongrass (*Sorghum halepense*) on Soybeans (*Glycine max*). *Weed Science*. 30, p. 589-593.
- LOPEZ J. (1994) : Extraction et dosage des acides organiques par chromatographie ionique dans les racines de maïs en vue de l'étude de la complexation par l'aluminium. Ecole Nationale de Chimie de Montpellier. rapport de stage ingénieur. C.I.R.A.D.
- LOVETT J.V., JOKINEN K. (1984) : A modified staircase apparatus for studies of allelopathy and other phytotoxic effects. *Journal of agricultural Science* (Finland) 56, p. 1-7.
- LUNDEGARDH H., STENLID G. (1944) : On the exsudation of nucleotide and flavonone from living roots. *Ark. Bot.* 31 A, p. 1-27.
- MANDOVA N.B. (1979) : Natural products in plant growth regulation. In : Mandava, N.B. Plant growth substances. III. American Chemical Society, Washington DC., p. 135.
- MARIGO G. (1972) : Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux. *Analisis*. p. 106-110.
- MARSCHNER H. (1986) : Mineral nutrition of higher plants. Institute of plant nutrition, University Hohenheim, Federal Republic of Germany. Academic Press, New York. p. 454-457.
- MERLIER H., MONTEGUT J. (1982) : Adventices tropicales. Ministère des Relations Extérieures - Coopération et Développement. p. 302-307.
- NIBOUCHE S. (1988) : Contribution à l'étude de la recherche de modèles d'herbicides à partir d'exsudats racinaires. DAA Mention protection des cultures, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, I.R.T.C.\C.I.R.A.D.
- OWENS L.D. (1969) : Toxins in plant disease : structure and mode of action. *Science*. 165, p. 18-25.
- PEREZ F.J., ORMENO-NUNEZ J. (1991) : Root exsudate of wild oat : allelopathic effects on spring wheat. *Phytochemistry*. Vol 30, n° 7, p. 2199-2202.
- PINCHARD V. (1989) : Etude d'exsudats racinaires pour la recherche de nombreux modèles d'herbicides. DEA d'Agrochimie, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse, I.R.T.C.\C.I.R.A.D.

- PIOMBO G. (1994) : Méthodologie d'extraction et de dosage par chromatographie ionique de l'oxalate de calcium en sols calcaires et dans le microenvironnement de racines mycorhizées. Certificat d'Etude Supérieure d'Agronomie.
- Purchase B.S. (1974) The influence of phosphate deficiency on nitrification. *Plant Soil*. 41, p. 541-547.
- PUTNAM A.R., TANG C.S. (1986) : The science of allelopathy. John Wiley and sons, New-York. 470 p.
- QUASEM J.R., HILL T.A. (1989) : Possible role of allelopathy in the competition between tomato, *Senecio vulgaris* L. and *Chenopodium album* L. *Weed research*. 29, p. 349-356.
- RICE E.L. (1974) : Allelopathy. Academic Press, New York., 353 p.
- RICE E.L. (1979) : Allelopathy - an update. *Bot. Rev.* 45, p. 15-109.
- RICE E.L. (1984) : Allelopathy. 2nd ed. Academic Press, London. 420 p.
- RIZVI S.J.H., RIZVI V. (1992) : Allelopathy, basic and applied aspects. Chapman et Hall, London. 480 p.
- ROBINSON T. (1983) : The organic constituents of higher plants. 5th ed. Cordus Press, North Amherst, Massachusetts.
- ROVIRA A.D. (1965) : Plant root exudates and their influence upon soil microorganisms. In "Ecology of soil borne plant pathogens - Prelude to biological control". K.F. Baker and W.C Snyder, Univ. of California Press, Berkeley, p. 170-184.
- ROVIRA A.D., Davey C.B (1974) In "The plant roots and its environment". Carson, E.W., University of Virginia press, Charlottesville, p. 155-240..
- RUSSEL F.S (1977) : Plant root systems - Their function and interaction with the soil. England. p. 115-121.
- SCHUMARER W.J., THILL D.C., LEE G.A. (1982) : The allelopathic potential of wild oat (*Avena fatua* L.) on spring wheat (*Triticum aestivum* L.) growth. North. Am. Symp. Allelopathy, Nov., Urbana-Champaign, Illinois, p. 14-17. (Abstr.).
- SKERMAN P.J. (1982) : Les légumineuses fourragères tropicales. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, Rome, p. 261-266.
- SMITH (1976) : Character and significance of forest tree root exudates. *Ecology*. 57, p. 324-331.
- STENLID G. (1970) : Flavonoids as inhibitors of the formation of adenosine triphosphate in plant mitochondria. *Phytochemistry*. 9, p. 2251-2256.

TANG C.S. (1986) : Continuous trapping techniques for the study of allelochemicals from higher plants. In Putnam A.R, Tang C.S. The science of allelopathy. John Wiley and Sons, New-York, p.113-129.

TANG C.S., YOUNG C.C. (1982) : Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of *Bigalita* limpogress (*Hemarthria altissima*). *Plant Physiol.* 69, p. 155-160.

TANTAWY B. (1983) : Séparation et identification des composés polyphénoliques du tourteau de colza. Thèse pour l'obtention du titre de Docteur. Paris XI et ENSIA.

THOMPSON A.C. (1985) : The chemistry of Allelopathy. ACS Symp. 268. Amer. Chem. Soc. Thompson, Washington D.C. 470 p.

VAN ALFEN N.K., TURNER N.C. (1975) : Influence of a *Ceratocystis Ulmi* toxin on water relation of elm (*Ulmus americana*). *Pf. Physiol.* 55, p. 312- 316.

VANCURA V., HANZLIKOVA A. (1970) Department of Soil Microbiology, Institute of Microbiology, Czechoslovak, Academy of Science, Praha 4. p. 271-282.

VAN SUMERE C.F., COTTENIE J., DE GREEF J., KINT J. (1971) :Biochemical studies in relation to the possible germination regulatory role of naturally occuring coumarin and phenolics. *Recent Adv. Phytochem.* 4, p. 165-221.

WALTERS D.T., Gilmore A.R. (1976) : Allelopathic effects on the growth of Sweetgum. *J. Chem. Ecol.* 2, p. 469-479.

TABLE DES TABLEAUX

- tableau 1 : principaux composés présents dans les exsudats racinaires
- tableau 2 : études menées sur l'allélopathie des exsudats racinaires
- tableau 3 : résultats de la 1° série de tests de croissance
- tableau 4 : valeurs d'évaporation des plantes de la 1° série de tests
- tableau 5 : résultats de la 2° série de tests de croissance du calopogonium
- tableau 6 : résultats de la 2° série de tests de croissance du riz
- tableau 7 : résultats de l'analyse minérale du riz
- tableau 8 : résultats de la 2° série de tests de croissance de l'arachide
- tableau 9 : résultats de l'analyse minérale de l'arachide
- tableau 10 : résultats de la 2° série de tests de croissance du maïs
- tableau 11 : résultats de l'analyse minérale du maïs
- tableau 12 : résultats de la 2° série de tests de croissance de l'euphorbe
- tableau 13 : résultats de l'analyse minérale de l'euphorbe
- tableau 14 : résultats de la 2° série de tests de croissance de l'euphorbe'
- tableau 15 : résultats des tests de germination du calopogonium sur papier filtre
- tableau 16 : résultats des tests de germination du calopogonium sur sable
- tableau 17 : résultats des tests de germination du riz sur papier filtre
- tableau 18 : résultats des tests de germination du riz sur sable
- tableau 19 : résultats des tests de germination de l'euphorbe sur papier filtre
- tableau 20 : résultats des tests de germination de l'euphorbe sur sable
- tableau 21 : valeur des pressions osmotiques des différentes solutions d'arrosage
- tableau 22 : résultats de la 2° série de tests de germination de l'euphorbe sur papier filtre
- tableau 23 : résultats de la 2° serie de tests de germination de l'euphorbe sur sable
- tableau 24 : valeurs d'évaporation moyennes, avant et après traitement
- tableau 25 : composés allélopathiques d'exsudats racinaires
- tableau 26 : gamme étalon pour la méthode de dosage Folin-Ciocalteu
- tableau 27 : dosage d'échantillons recueillis à différents moments de la journée

TABLE DES FIGURES

- Figure 1 : voies probables de synthèse des différentes familles de composés allélopathiques
- Figure 2 : structure de quelques acides phénoliques
- Figure 3 : structure de quelques coumarines
- Figure 4 : structure de quelques flavonoïdes
- Figure 5 : structure de quelques composés acides de tannins hydrolysables
- Figure 6 : structure de quelques alcaloïdes
- Figure 7 : structure de quelques quinones
- Figure 8 : structure de quelques terpènes et stéroïdes
- Figure 9 : structure de quelques lactones insaturées
- Figure 10 : différents mécanismes de solubilisation de composés inorganiques par les exsudats racinaires dans la rhizosphère
- Figure 11 : dispositif en marche d'escalier
- Figure 12 : "the Continuous Root Exudates Trapping System"
- Figure 13 : dispositif en circuit fermé
- Figure 14 : *Calopogonium mucunoides* Desv.
- Figure 15 : dispositif de récolte d'exsudats racinaires mis au point au CIRAD
- Figure 20 : substances réduisant le réactif de Folin-Ciocalteu
- Figure 21 : substances ne réduisant pas le réactif de Folin-Ciocalteu
- Figure 22 : courbe étalon pour le réactif de Folin-Ciocalteu
- Figure 23 : chromatogramme de l'extrait méthanolique
- Figure 24 : chromatogramme (HPLC) avec gradient de solvant de l'extrait méthanolique et spectre d'absorption des composés présents
- Figure 25 : liaisons hydrogènes polyvinylpyrrolidone\phénol
- Figure 26 : principe d'utilisation du Polyclar AT
- Figure 27 : chromatogramme (HPLC) de l'extrait pour la recherche d'acide organique
- Figure 28 : chromatogramme (DEDL) de différents extraits pour la recherche d'acides organiques
- Figure 29 : chromatogramme (DEDL) de différents extraits pour la recherche d'acides organiques après ajout d'HCl et passage sur résine
- Figure 30 : chromatogramme (DEDL) de différents composés pour la recherche d'éventuelles pollutions de résine
- Figure 31 : chromatogramme des acides aminés
- Figure 32 : chromatogramme des sucres
- Figure 33 : chromatogramme de l'extrait à l'acétate d'éthyle et spectre d'absorption des composés présents

ANNEXES

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : présentation du CIRAD

Annexe 2 : la décomposition des matières azotées

Annexe 3 : composition de la solution nutritive

Annexe 4 : conditions environnementales en chambre de culture

Annexe 5 : propriétés spectrales de quelques acides phénoliques

Annexe 6 : conditions d'utilisation du Polyclar

Annexe 7 : principe du chromatographe à détection par diffusion de lumière

Annexe 8 : extraction à l'acétate d'éthyle

Annexe 1

LE CIRAD

Le Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement est un organisme spécialisé dans l'agriculture des régions tropicales et subtropicales. Sa mission est de contribuer au développement de ces zones, en leur apportant des moyens scientifiques et techniques.

Il comprend sept départements :

- le CIRAD-CA (cultures annuelles)
- le CIRAD-CP (cultures pérennes)
- le CIRAD-FLHOR (production fruitières et horticoles)
- le CIRAD-EMVT (élevage et médecine vétérinaires)
- le CIRAD-Forêts (forêts)
- le CIRAD-SAR (systèmes agro-alimentaires ruraux)
- le CIRAD-GERDAT (gestion, recherche, documentation et appui technique)

Le département des cultures annuelles

Il est né de la fusion des anciens instituts de l'IRTC (cotonnier), de l'IRAT (cultures vivrières annuelles), et de l'IRHO (programme des oléagineux annuels). Son organisation en programmes permet de répondre aux questions actuelles de la recherche agricole :

- la gestion de l'espace cultivé
- l'exploitation du milieu
- la rentabilisation des systèmes de production

Les différents programmes

Ils sont actuellement au nombre de trois :

- les cultures vivrières paysannes ou CVP (riz, arachide, maïs...). Son but est l'amélioration de la productivité en système de culture à faibles intrants.
- Les cultures cotonnières paysannes ou CCP. Elles abordent tous les aspects de la filière coton (amélioration, technologie, agronomie).
- les cultures intensifiées et canne à sucre ou CICAS (hybrides de riz).

Ces programmes s'appuient sur différentes unités de recherche, dont quatre en agronomie :

- les systèmes de culture (étude des successions culturales et des techniques employées).
- le fonctionnement du peuplement végétal (étude de la plante et des composantes du milieu).
- les facteurs et les conditions du milieu (fertilisation et écologie des cultures).
- la gestion de l'eau

Le fonctionnement du peuplement végétal

Cette unité de recherche élabore des « outils » de caractérisation de l'état du végétal, et travaille dans l'optique d'une optimisation des choix culturaux par une meilleure connaissance des interactions entre les cultures annuelles et leur environnement.

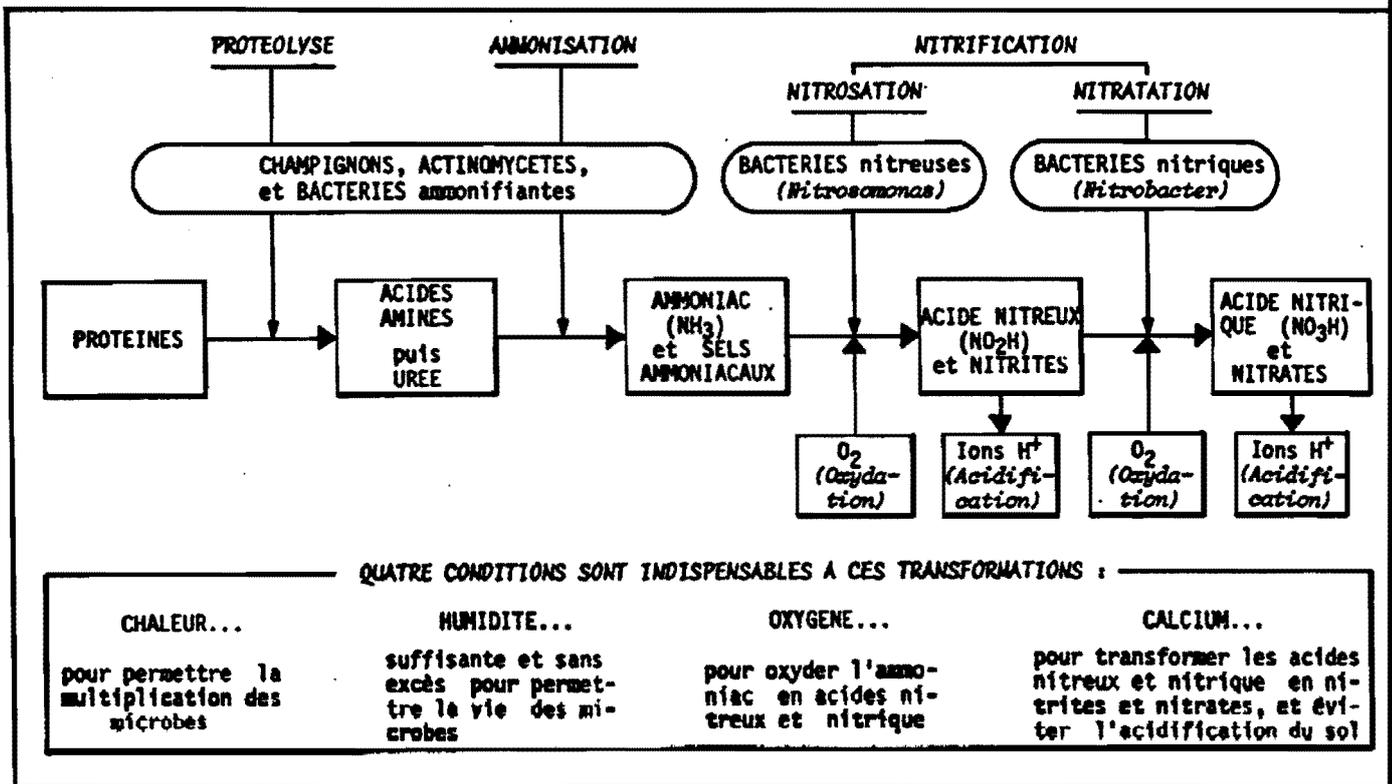
Les thèmes de recherche sont au nombre de quatre :

- acquérir une meilleure connaissance du fonctionnement de certaines cultures tropicales (organisation du cycle, composante du rendement...)
- étudier les mécanismes impliqués dans l'adaptation des plantes aux contraintes environnementales telles que la sécheresse, le froid, l'hypoxie (élaboration du rendement, modélisation mécaniste)
- développer des modèles de fonctionnement des cultures, adaptation de modèles existants aux conditions tropicales

Annexe 2

LA DECOMPOSITION DES MATIERES AZOTEES (FONTAR ET THOMAS, 1987)

Ce schéma concerne aussi bien la protéolyse des matières organiques fraîches (minéralisation primaire M1) que la protéolyse de l'humus (minéralisation secondaire M2)



Annexe 3

SOLUTION NUTRITIVE D'IRRIGATION

Produits	quantité (g/l)
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.278
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.0726
	0.01
Na Cl	
	0.345
Ca (NO ₃) 4H ₂ O	
	0.16
NH ₄ NO ₃	0.202
KNO ₃	0.148
K ₂ HPO ₄	0.15
KH ₂ PO ₄	
Fe EDTA	0.07
Oligo-éléments :	
Mn SO ₄ H ₂ O	3.08.10 ⁻⁴
Zn SO ₄ 7H ₂ O	4.41.10 ⁻⁴
H ₃ BO ₃	2.82.10 ⁻⁴
CU SO ₄ 5H ₂ O	0.98.10 ⁻⁴
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0.50.10 ⁻⁴

Annexe 4

**CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES
DE LA CHAMBRE DE CULTURE**

température de jour : 28 à 30 °C
température de nuit : 24 à 26 °C

humidité de jour : 70 %
humidité de nuit : 80 %

éclairage : 600 $\mu\text{mole}\backslash\text{m}\backslash\text{s}$ à 1m dans le spectre photosynthétique actif

Annexe 5

**PROPRIETES SPECTRALES
DE QUELQUES ACIDES PHENOLIQUES
(d'après HARBORNE, 1984)**

acides phénoliques de la série des cinnamiques

**longueur d'onde maximale
dans l'éthanol (en nm)**

acide p-coumarique

227-310

acide caféique

243-326

acide férulique

255-324

acide sinapique

239-325

acides phénoliques de la série des benzoïques

acide gallique

272

acide protocatéchuique

260-295

acide p-hydroxybenzoïque

265

acide syringique

271

acide vanillique

260-290

acide salicylique

235-305

Annexe 6

PROTOCOLE D'UTILISATION DU POLYCLAR AT **(d'après MARIGO, 1973)**

préparation :

- traiter le Polyclar AT pendant 10 mns à 100°C par HCL à 10%
- rincer successivement par l'eau distillée et l'acétone
- sécher sous vide avant emploi

utilisation :

- baisser le pH de la solution contenant les composés phénoliques jusqu'à 3,5
- ajouter du polyclar dans cette solution : 2 g pour 8 mg d'équivalent acide gallique
- laisser 10 mn en contact sous agitation lente
- filtrer
- rincer le Polyclar par 10 ml d'eau distillée

Annexe 7

DETECTEUR EVAPORATIF A DETECTION DE LUMIERE

Le SEDEX 55 est un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière fonctionnant grâce au principe de la nébulisation.

L'effluent sortant de la colonne chromatographique est nébulisé par un courant de gaz. A la sortie du nébuliseur, l'aérosol traverse une chambre où s'éliminent les grosses gouttes qui s'accumulent dans un siphon d'évacuation. C'est donc un brouillard homogène et fin qui pénètre dans le tube évaporateur.

Il pénètre ensuite dans un serpentin chauffé qui assure l'évaporation du solvant. A sa sortie il ne reste que le soluté non volatil, en fin brouillard, qui pénètre dans la tête de détection.

Le détecteur a été conçu pour pouvoir travailler avec des solvants organiques ou de l'eau pure comme éluants, sans nécessiter une température d'évaporation nuisible aux solutés thermodégradables. Il permet l'emploi, dans certains cas, de phases mobiles contenant des sels sublimables.

En sortant du tube évaporateur, le brouillard ne doit plus être constitué que de soluté à l'état de microparticules, le solvant s'étant évaporé. Une arrivée de gaz additionnel constitue une gaine concentrique au brouillard, qui, ainsi canalisé, passe devant un faisceau lumineux. La lumière diffusée par les particules est recueillie par un photomultiplicateur placé à 120° par rapport au faisceau lumineux. Le signal obtenu est proportionnel à la masse du soluté.

Annexe 8

EXTRACTION A L'ACETATE D'ETHYLE (d'après FLEURIET et MACHEIX, 1972)

La solution est reprise par :

- 20 ml d'eau,
- 20 ml d'une solution de sulfate d'ammonium à 40 %,
- 0,6 ml d'acide ortho-phosphorique (Fleuriet et Macheix 1972).

On extrait 5 fois volume à volume par l'acétate d'éthyle.

On sèche la phase organique sur du sulfate de soude anhydre (Na_2SO_4 anhydre) : on ajoute jusqu'à non hydratation du sulfate, puis on filtre.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE

	1
INTRODUCTION	2
1° PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE SUR L'ALLELOPATHIE DES EXSUDATS RACINAIRES	5
I- LES PHÉNOMÈNES ALLELOPATHIQUES	5
1. définition de l'allélopathie	5
2. Rôle de l'allélopathie dans les écosystèmes naturels et manipulés	6
a) répartition spatiale et succession	6
b) allélopathie et agriculture	7
- effet des adventices sur les cultures	7
- interactions culture-culture	7
- inhibition d'adventices par les cultures	7
3. Nature chimique des composés allélopathiques	8
a) les composés aromatiques	9
- les acides phénoliques	9
- les coumarines	9
- les flavonoïdes	10
- les tannins	10
- les alcaloïdes	10
- les quinones	10
b) les terpènes et stéroïdes	11
c) Les acides gras et polyacétylènes	11
d) Les lactones insaturées	11
e) Les composés aliphatiques	11
4. Mode d'émission des composés allélopathiques	12
5. Mécanismes d'action des composés allélopathiques	12
6. Facteurs influençant la production et l'activité des composés allélopathiques	14
II- LES EXSUDATS RACINAIRES	15
1. Généralités	15
2. Nature chimique des exsudats	15
3. Importance quantitative des exsudats racinaires	18
4. Facteurs influençant l'exsudation	18
5. Action de ces exsudats	19
III- ALLELOPATHIE ET EXSUDATS RACINAIRES : RECENSEMENT DES ETUDES MENEES	21
1. Inventaire	21
2. Techniques et méthodes utilisées dans la mise en évidence de phénomènes allélopathiques provoqués par des exsudats racinaires	25
a) les différents dispositifs de récolte d'exsudats	25
b) les tests biologiques	28
- test de germination	28
- test d'élongation de la radicule et/ou du coléoptile	29
- test de croissance des parties aériennes	29
IV- CONCLUSION	30

2° PARTIE MISE EN EVIDENCE DES PHENOMENES ALLELOPATHIQUES D'EXSUDATS RACINAIRES DU CALOPOGONIUM

32

I- MATERIEL ET METHODES	32
1. Matériel végétal	32
a) <i>Calopogonium mucunoides</i> Desv.	33
b) <i>Euphorbia heterophylla</i> L.	34
2. La production d'exsudats racinaires	35
3. Les test de croissance	36
a) 1° série de tests	38
b) ° série de tests	39
4. Les tests de germination	40
II- PRESENTATION DES RESULTATS	42
1. Résultats des tests de croissance	42
a) 1° série de tests	42
c) 2° série de tests	44
- calopogonium	44
- riz	44
- arachide	45
- maïs	46
- euphorbe	47
- euphorbe'	48
d) synthèse des résultats de croissance	48
2. Résultats des tests de germination	49
a) 1° série de test	50
- calopogonium	50
- riz	50
- euphorbe	51
b) 2° série de test	53
c) synthèse des résultats de germination	54
III- CONCLUSION-DISCUSSION	55

3EME PARTIE : RECHERCHE DANS LES EXSUDATS DE CALOPOGONIUM DE QUELQUES FAMILLES ALLELOPATHIQUES

61

I- PREMIERS RENSEIGNEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES	62
II- RECHERCHE DES ACIDES PHENOLIQUES	62
1. Méthode colorimétrique de dosage des composés phénoliques (méthode de Folin-Ciocalteu)	63
a) protocole de dosage	63
b) expériences préliminaires : mise au point de la méthode	64
- concentration préalable des solutions recueillies	64
- spécificité	66
c) dosage des exsudats	66
d) conclusion	67
2. Recherche d'acides phénoliques par HPLC	68
a) conditions expérimentales	69
b) démarche expérimentale	69
c) résultats - conclusion	69
3. Caractérisation de l'extrait brut grâce à son spectre d'absorption	70
a) conditions d'expérimentation	71
4. conclusion	71

III- RECHERCHE DU OU DES COMPOSES PRESENTS DANS L'EXTRAIT METHANOLIQUE ET REAGISSANT AVEC LE REACTIF FOLIN-CIOCALTEU.	72
A- Recherche des composés phénoliques autres que les acides phénoliques	72
B- Recherche des composés organiques	73
1. Recherche des acides organiques	73
a) mise en évidence par HPLC	73
b) vérification par chromatographie ionique	74
2. Recherche des acides aminés	76
3. Les sucres	77
C- Conclusion	77
IV- CONCLUSION - DISCUSSION	78
CONCLUSION GENERALE	80
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	83
<i>TABLE DES TABLEAUX</i>	89
<i>TABLE DES FIGURES</i>	90
<i>ANNEXES</i>	87