

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et De la Recherche Scientifique**

**وزارة التعليم العالي و البحث العلمي**

**Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie El Harrach - Alger**

**المدرسة الوطنية العليا للفلاحة – الحراش- الجزائر**

**Thèse présentée en vue de l'obtention du Diplôme de :**

**Doctorat en Sciences Agronomiques**

**Mme CHAKER-HADDADJ Assia**

**Evaluation de la tolérance à la contrainte saline chez  
quelques variétés de féverole (*Vicia faba L. minor*)  
cultivées en Algérie : Aspects morpho-  
physiologiques, biochimiques, symbiotiques et**

**Thèse soutenue publiquement devant le jury composé de :**

**Président : A. ABDELGUERFI ..... Professeur (ENSA)**

**Directeur de thèse : S.M. OUNANE .....Professeur (ENSA)**

**Examineur : S. AMRANI ..... Maître de conférences A (USTHB)**

**Examineur : N. ALKAMA ..... Maître de conférences A (UMMTO)**

**Année universitaire 2014-2015**

## Résumé

L'effet du NaCl sur la germination, la croissance, la fixation symbiotique de l'azote et les composantes du rendement, a été étudié pour évaluer la réponse de quatre variétés de féverole (*Vicia faba L minor*), Castel, Maya, Espresso et Sidi Aich vis à-vis de la salinité. L'objectif étant de contribuer à la mise au point d'un test de sélection pour l'amélioration de la féverole sous contrainte saline.

Les résultats de la germination montrent que les graines des variétés Espresso, Maya et Castel, n'ont pas été affectées par le stress salin à des concentrations inférieures et égales à 250 mM NaCl ; contrairement à la variété Sidi Aich qui présente une sensibilité à partir de 150 mM NaCl. L'effet du stress salin se traduit par un effet dépressif sur tous les paramètres de croissance (hauteur des plants, surface foliaire, nombre de feuilles et de ramifications ainsi que le poids sec total), de la nodulation (nombre de nodule/plant et poids sec de nodule) et de la fixation symbiotique d'azote (activité nitrogénase). Cet effet varie en fonction de la concentration en NaCl et de la variété. Les pigments chlorophylliens et les caroténoïdes sont également réduits. Les variétés Castel et Maya enregistrent en présence de 100 mM NaCl des baisses de poids sec de 84%, tandis que les variétés Sidi Aich et Espresso moins affectées, montrent des baisses inférieures à 60% par rapport au témoin. Une augmentation des teneurs en proline chez les 4 variétés est enregistrée, notamment à 100mM NaCl chez les variétés Sidi Aich et Espresso. Par ailleurs, les variétés Castel et Maya accumulent plus d'ions  $\text{Na}^+$  dans leurs feuilles et dans leurs racines que les autres variétés. Elles enregistrent un taux de survie de 40%, à 100 mM NaCl alors que le double (80% de survie) est notée chez les variétés Sidi Aich et Espresso. Á cette concentration, les variétés Castel et Maya affichent des baisses de poids de 100 graines de 66% et 84% respectivement, contre une baisse de 42% et 46% chez Espresso et Sidi Aich respectivement. L'analyse en composantes principales sous les différents traitements salins fait ressortir deux groupes, l'un tolérant au sel comprenant les variétés Sidi Aich et Espresso, l'autre concernant les variétés Castel et Maya sensibles au sel. En effet, les variétés Sidi Aich et Espresso présentent des teneurs en pigments chlorophylliens moins affectées par le sel, une meilleure production de matière sèche, des teneurs en  $\text{Na}^+$  plus faibles dans les feuilles, une meilleure capacité de survie, des teneurs en proline plus élevées et un meilleur rendement. De ce fait ces

caractères pourront servir de critère de sélection pour la tolérance au sel chez la féverole.

L'analyse numérique des profils phénotypiques des souches testées montre que les 4 variétés de féverole soumises à différentes concentrations en sel sélectionnent des souches diversifiées. Ceci nous permet toutefois de sélectionner avec précision les bonnes souches pour tout essai d'inoculation et ce dans le but de favoriser la fixation symbiotique de l'azote et par conséquent d'améliorer la production durable de cette culture sous contrainte saline.

**Mots clés :** Féverole, Stress salin, Germination, Croissance, Fixation de N<sub>2</sub>, Tolérance. Souches, Taxonomie numérique.

### ملخص

( NaCl)

& & ' & (*Vicia faba* L. *minor*) ! " # \$ % &)(N<sub>2</sub>

. \* +, - ) ( &

3# 4 \* / 5 /# 1 \$ #2 /0#

. 150mM NaCl \*! /0# ( !6 250mM NaCl (

= > & 3 & % + < 7 0 8 9 : \* / ( ;

" 17 @ : & % 70 @ 4 ?

. NaCl 4

( ! # 84 A ÷ % @ / 4 \*! 9 : !

. 7 C 8 % 60 A ÷ B % , : 3#

100 mM NaCl ( ! D \*! E 4 0

. 7 1 /3 # \*! Na+ # 4 ! G1 E F

A ÷ % ( ! # 40 A ÷ % H% -17

&\* 66 A 84 A ÷ % 1 100 4 \*! 9 : ! 80

. \* 46 A 42A ÷ ( 8 %

E & : I F 0 \*! @C \$

. @ = " D :# (

E , !# J \$& 3# ! 4 # 8 ( ! I

. # 4 , !# E 1 100 4 Na+ # 4 !

. I ! : " K : -17 : #

G 18 / # ! " # % : 5F ( " /0#  
 \* @ / 4 L %\$ " F I  
 .\* / J  
 : \_\_\_\_\_  
 .( & 5F &I & & & &\* / &

## Abstract

The NaCl effect on the germination, growth and nitrogen fixation has been studied to evaluate the responses of faba bean cultivars (*Vicia faba* L. *minor*), Castel, Maya, Espresso and Sidi Aich under the salt stress. The purpose of this study is to improve the faba bean under the salt stress.

The germination results showed the Espresso, Maya and Castel seeds have not been affected by salt stress under concentrations below or equal to 250 mM NaCl, contrary to Sidi Aich who demonstrate a sensibility starting from 150 mM NaCl.

The salt stress caused a reduction for all growth parameters (plant height, leaf area, number of leaves and branches and total dry weight), of the nodulation (nodule number/ plant and nodule dry weight) and the nitrogen fixation (nitrogenase activity). The responses varied with cultivars and with the salt dosage applied. Castel and Maya cultivars recorded in the presence of 100 mM NaCl a decrease in dry weight by 84%, while the cultivars Sidi Aich and Espresso less affected, show a decline above 60% compared to the control.

An increase in proline content in 4 cultivars registered, at 100 mM NaCl in cultivars Sidi Aich and Espresso. Moreover, the Castel and Maya cultivars accumulate more Na<sup>+</sup> ions in their leaves and roots in comparison to others varieties. They recorded a 40% of survival rate, at 100 mM NaCl, while the double (80% of survival rate) was noticed in Sidi Aich and Espresso cultivars. To this concentration, the Castel and Maya exhibit a decline weight of 100 seeds by 66% and 84% respectively, against a decline of 42% and 46% at Espresso and Sidi Aich,

The analysis of the main components under different salt treatments revealed two groups, the first one is salt tolerant this include Sidi Aich and Espresso cultivars, the second is salt sensitive and this include Castel and Maya cultivars. Indeed, Sidi Aich and Espresso cultivars have chlorophyll pigment content less affected by salt, better production of dry matter, the Na<sup>+</sup> lowest in the leaves, better survivability contents higher proline and better performance. Therefore these characters can be used as

selection criteria for salt tolerance in faba bean. The numerical analysis of phenotypic profiles of the strains tested showed that 4 varieties of faba bean subjected to different salt concentrations select diverse strains. However, this allows us to accurately select the right candidates for any inoculation test and with the aim of promoting the symbiotic nitrogen fixation and thus to improve the sustainable production of this crop under stress.

**Keys words:** *Faba bean, Salt stress, Germination, Growth, Nitrogen fixation, Strains, Taxonomy.*

## Remerciements

J'exprime mes vifs remerciements à mon directeur de thèse, Mr S.M. Ounane, Professeur à l'ENSA pour avoir accepté de diriger ce travail. Je lui suis reconnaissante pour son soutien, sa disponibilité et sa gentillesse. Ses généreux conseils, surtout lors des moments difficiles, ont été d'une grande qualité et d'un grand réconfort.

Ensuite je tiens à remercier Mr A. Abdelguerfi, Professeur à l'ENSA, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Il a été l'un de mes anciens professeurs, et je lui suis reconnaissante pour avoir contribué à ma formation lors de mes études à l'ENSA.

Je remercie également Mr S. Amrani, Maître de conférences A à l'USTHB pour avoir accepté d'examiner mon travail. Je n'oublie pas sa contribution à mes connaissances actuelles sur la symbiose lorsqu'il a dirigé mon mémoire de Magister.

Mes remerciements vont aussi à N. Alkama, Maître de Conférences A à l'UMMTO pour l'honneur d'avoir accepté d'examiner mon travail.

J'adresse toute ma gratitude à toutes mes amies et à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail. Je n'oublierai jamais l'aide de Hamida Sadj, patiente et disponible, elle m'a beaucoup apporté, avec ses lectures et discussions fructueuses.

Je n'oublie pas non plus Farida Taguett, pour ses précieux conseils, et son indéfectible soutien qui m'a été d'un grand secours.

Aussi je pense à Nassima Baha, pour ses encouragements et orientations pour certaines analyses, sans oublier également Souad Guemouri pour sa gentillesse.

Je remercie également toutes les personnes formidables du laboratoire de LBS de l'USTHB. Je remercie particulièrement le professeur Y. Kaci, notre responsable de laboratoire de LBS.

J'exprime tous mes remerciements à mes amies Fati Halladj, pour ses précieux conseils, et qui a depuis le début été à mes côtés, sans oublier Sassia Sami-Merah pour son soutien moral et ses encouragements ainsi qu'à Hayat Amellal. Je n'oublierai jamais nos moments passés ensemble lors de mes années d'enseignement à l'UMBB !

Que Mr T. AHMED- ZAID Professeur au département de Génie Chimique à l'ENP trouve ici toute ma gratitude pour avoir accepté d'effectuer certaines de mes analyses au sein de son laboratoire.

J'exprime également mes remerciements à Fahima Nabi, Mohamed Lazali, et Mourad Latati pour leurs orientations lors de mes analyses statistiques.

Je remercie également tout le personnel de l'ITCMI et particulièrement MIMI, qui m'ont permis de mener à bien mes essais au sein de la station expérimentale de Staoueli.

Bien entendu je ne saurai être assez reconnaissante envers ma famille, particulièrement mon mari, mes parents, mes enfants, ma sœur ainsi que mon frère qui n'ont cessé de m'encourager, de me soutenir, notamment dans les moments difficiles. Leur patience et leur soutien m'ont donné la force nécessaire à la préparation de ce travail. Merci.

## Liste des abréviations

**ABA** : Acide abscissique

**ANR** : Activité nitrate réductase

**ARA** : Activité réductrice d'acétylène

**CE** : Conductivité électrique

**DO** : Densité optique

**dS /m** : deciSiemens par mètre

**FAO**: Food and Agriculture Organisation of the United Nations

**ITGC** : Institut Technique des Grandes Cultures

**MAPK**: Mitogen-Activated-Protein Kinase

**MDA** : Malondialdéhyde

**MF** : Matière fraîche

**MS** : Matière sèche

**PS**: Poids sec

**ROS**: Espèces réactives d'oxygène

**SOS**: Salt overly sensitive

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Classification des sols salinisés (Brady, 2002).....	17
<b>Tableau 2 :</b> Quelques caractéristiques des variétés de féverole ( <i>Vicia faba L. minor</i> ) étudiées. (ITGC,2006 ; Proléa,2008) .....	30
<b>Tableau 3 :</b> Effet du traitement salin sur la hauteur de la tige (HAT), surface foliaire (SF), nombre de feuilles /plant, et le nombre de ramifications /plant des quatre variétés de féverole.....	47
<b>Tableau 4 :</b> Effet du traitement salin sur le poids sec de la partie aérienne (PA), partie racinaire (PR), poids total de la plante (PT), le rapport partie racinaire-aérienne (PR/PA) et l'indice de sensibilité relative au sel (I.S.R.S) des quatre variétés de féverole.....	49
<b>Tableau 5 :</b> Effet du traitement salin sur les teneurs foliaires en pigments chlorophylliens (Chl <i>a</i> , Chl <i>b</i> , Chlorophylle totale (Chl <i>a</i> +Chl <i>b</i> ) et caroténoïdes) en µg /g de MF, des quatre variétés de féverole.....	55
<b>Tableau 6 :</b> Effet du stress salin sur le rapport de sélectivité K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> dans les feuilles et les racines des 4 variétés de féverole. ....	76
<b>Tableau 7 :</b> Composantes du rendement des 4 variétés de féverole, soumises à différentes concentrations en NaCl (0, 50 , 75 et 100 mM NaCl) .....	87
<b>Tableau 8 :</b> Résultats du test de l'authentification des souches extraites de nodosités des 4 variétés de féverole .....	101
<b>Tableau 9 :</b> Caractéristiques culturelles et cellulaire des souches de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> sur milieu YEMA.....	104
<b>Tableau 10 :</b> Caractéristiques biochimiques des souches de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> .....	108
<b>Tableau 11 :</b> Résultats de la croissance des souches de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> après 72h d'incubation à différentes températures .....	110
<b>Tableau 12 :</b> Résultats de la croissance des souches de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> après 72 d'incubation à 28°C et à différents pH testés .....	112

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Échanges de signaux contrôlant les interactions symbiotiques précoces ( <a href="#">Lindström et al., 2010</a> ) .....	11
<b>Figure 2</b> : Les différentes étapes du processus de nodulation (Faghire, 2012) .....	13
<b>Figure 3</b> : Répartition des sols salins dans le nord de l'Algérie (Insid, 2008) .....	19
<b>Figure 4</b> : Schéma hypothétique de la réponse de la croissance aux deux phases de réponse à la salinité pour les géotypes qui diffèrent par la vitesse à laquelle le sel atteint des niveaux toxiques dans les feuilles (Munns et Tester, 2008) .....	20
<b>Figure 5</b> : Effet de différentes concentrations de NaCl (0, 50, 100, 150, 200, 250 et 300 mM) sur la cinétique de germination des graines de 4 variétés de féverole durant 7 jours. ....	40
<b>Figure 6</b> : Effet de différentes concentrations de NaCl (0, 50, 100, 150, 200, 250 et 300 mM) sur le taux de germination (7 <sup>ème</sup> jour) des graines de 4 variétés de féverole. ....	41
<b>Figure 7</b> : Effets de différentes concentrations de NaCl (0 à 250 mM) sur le temps moyen de germination (t50) des graines de 4 variétés de féverole .....	43
<b>Figure 8</b> : Variation des teneurs en sucres solubles dans les feuilles de 4 variétés de féveroles soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl) .....	57
<b>Figure 9</b> : Variation des teneurs en protéines chez les 4 variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl) .....	60
<b>Figure 10</b> : Variation des teneurs en proline foliaire chez les 4 variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl) .....	62
<b>Figure 11</b> : Variation des teneurs en malondialdéhyde chez 4 variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75, 100 mM NaCl) .....	65
<b>Figure 12</b> : Variation des teneurs relatives en eau chez les 4 variétés sous différentes concentrations salines (0, 50 75 et 100 mM NaCl) .....	67
<b>Figure 13</b> : Variation du potentiel hydrique chez les 4 variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl) .....	68
<b>Figure 14</b> : Variation de l'ANR chez quatre variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl) .....	71
<b>Figure 15</b> : Variations des teneurs en Na <sup>+</sup> dans les feuilles (A) et dans les racines (B) des 4 variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl) .....	73
<b>Figure 16</b> : Variations des teneurs en K <sup>+</sup> dans les feuilles (A) et dans les racines (B) des 4 variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl) .....	75

<b>Figure 17 :</b> Variations du nombre (A) et du poids sec des nodules (B) chez les quatre variétés soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl) .....	78
<b>Figure 18 :</b> Variations de l'ARA/plante (A) et de l'ARA/ nodule (B) chez quatre variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl) .....	81
<b>Figure 19 :</b> Variation des teneurs en leghémoglobine chez quatre variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl) .....	82
<b>Figure 20 :</b> Variation du taux de survie chez quatre variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM) .....	85
<b>Figure 21 :</b> Analyse en composantes principales représentant le cercle de corrélations entre les différents paramètres en fonction des quatre niveaux de traitement salin (0mM, 50 mM, 75mM et 100 mM NaCl) .....	90
<b>Figure 22 :</b> Représentation graphique de la distribution spatiale des quatre variétés de féverole dans les plan 1-2 d'une analyse en composantes principales sous les différents niveaux de salinité.....	91
<b>Figure 23 :</b> Photographies des plants de féverole nodulés après le test d'authentification .....	102
<b>Figure 24 :</b> Variations des densités optiques et du pH final du milieu de culture des différentes souches de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> .....	105
<b>Figure 25 :</b> Tolérance des souches de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> aux concentrations 500 mM, 700 mM, 800mM et 1000mM NaCl .....	114
<b>Figure 26 :</b> Résistance des souches de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> aux métaux lourds.....	115
<b>Figure 27 :</b> Pourcentages des souches de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> assimilatrices des substrats carbonés .....	116
<b>Figure 28:</b> Pourcentages des souches de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> assimilatrices des acides aminés.....	117
<b>Figure 29:</b> Pourcentages des souches assimilatrices de substrats azotés minérales.....	118
<b>Figure 30 :</b> Dendrogramme UPGMA montrant la distribution des souches de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> en fonction du niveau de similitude de leurs profils phénotypiques .....	119

## Sommaire

<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>CHAPITRE I : Revue bibliographique</b> .....	3
<b>1. La symbiose <i>Rhizobium</i>- légumineuse</b> .....	3
1.1. Les Fabacées ou légumineuses .....	3
1.1.1. La féverole ( <i>Vicia faba</i> L. <i>minor</i> ) .....	4
1.1.1.1. Intérêts et domaines d'utilisation de la féverole .....	6
1.1.1.2. Production de la féverole dans le monde et en Algérie .....	7
<b>1. 2. Les rhizobia: <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i></b> .....	8
1.2.1. Evolution de la classification des rhizobia.....	8
<b>1.3. La nodulation</b> .....	11
1.3.1. Les signaux moléculaires .....	11
1.3.2. La formation des nodules.....	12
1.3.3. Fonctionnement des nodosités.....	14
<b>1.4. Généralités sur la salinité</b> .....	15
1.4.1. Définition des sols salés.....	16
1.4.2. Importance de la salinité dans le monde et en Algérie.....	17
1.4.3. Le stress salin .....	19
1. 4.3.1. Effets du stress salin sur la plante .....	20
1.4.3. 2. Effets du stress salin sur la croissance et la survie des rhizobia.....	22
1.4.3.3. Effets sur la symbiose <i>Rhizobium</i> - légumineuses .....	23
1.4.3.4. Effets sur la fixation symbiotique de l'azote .....	23
<b>1.5. Stratégies d'adaptation à la salinité chez les plantes</b> .....	23
1.5.1. Homéostasie.....	24
1.5.1.1. La compartimentation vacuolaire .....	24
1.5.1.2. Exclusion des ions toxiques.....	25
1.5.1.3. Ajustement osmotique .....	26
1.5.2. Induction des enzymes antioxydantes.....	26
1.5.3. Régulation de la croissance .....	27
<b>1.6. Amélioration de la tolérance au sel chez les légumineuses</b> .....	27
<b>Chapitre II Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole.</b> 29	
<b>1.Introduction</b> .....	29
<b>2. Matériel et méthodes</b> .....	29
2.1. Matériel végétal .....	29
2.2. Milieux de germination et conduite de l'essai .....	30
2.3. Caractères mesurés pour le test de germination.....	30
2.4. Conduite des cultures.....	31
2.5. Dispositif expérimental .....	32
2.6. Caractères mesurés.....	32
2.6.1. Caractères morphologiques.....	32
2.6.2. Caractères physiologiques et biochimiques .....	33

2.6.3. Caractères liés à l'état hydrique .....	37
2.6.4. Dosage des ions minéraux .....	37
2.6.5. Mesure de la capacité de survie.....	38
2.6.6. Mesure des composantes du rendement .....	38
2.7. Analyse des données .....	38
2.8. Analyses statistiques .....	39
<b>3. Résultats</b> .....	39
3.1. Effet du stress salin sur la germination des graines de quatre variétés de féverole .....	39
3.1.1. Cinétique de germination.....	39
3.1.2. Taux de germination final.....	41
3.1.3. Vitesse de germination.....	42
3.2. Effet du stress salin sur la croissance, la symbiose et le rendement des quatre variétés de féverole.....	46
3.2.1. Caractères morphologiques.....	46
3.2.2. Caractères physiologiques et biochimiques .....	54
3.2.3. Caractères liés à l'état hydrique de la plante .....	67
3.2.4. Activité nitrate réductase (ANR) .....	70
3.2.5. Déterminations des teneurs en Na <sup>+</sup> et K <sup>+</sup> .....	73
3.2.6. Caractères symbiotiques .....	78
3.2.7. Détermination de la capacité de survie .....	85
3.2.8. Les composantes du rendement.....	86
3.3. Analyse en composantes principale .....	90
<b>Conclusion</b> .....	92

## **Chapitre III Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole..... 93**

<b>1.Introduction</b> .....	93
<b>2. Matériel et méthodes</b> .....	93
2.1. Matériel .....	93
2.1.1. Matériel végétal .....	93
2.1.2. Les souches bactériennes .....	94
2.1.3. Milieux de culture .....	94
2.2. Méthodes.....	94
2.2.1. Extraction, isolement et purification des souches .....	94
2.2.2. Conservation des souches de <i>Rhizobium</i> .....	95
2.2.3. Authentification des isolats .....	95
2.2.3.1. Stérilisation superficielle des graines .....	96
2.2.3.2. Culture et inoculation des plantules de féverole .....	96
2.2.4. Détermination des caractéristiques des souches .....	96
2.2.4.1. Caractéristiques culturales .....	97
2.2.4.2. Caractéristiques cellulaires .....	97
2.2.4.3. Caractéristiques biochimiques .....	97
2.2.4.4. Caractéristiques physiologiques.....	98
2.2.4.5. Résistance aux métaux lourds .....	99
2.2.4.6. Détermination du profil d'utilisation des substrats carbonés .....	99

2.2.4.7. Détermination du profil de l'utilisation des substrats azotés .....	99
2.3. Traitement numérique des résultats .....	100
<b>3. Résultats et Discussion .....</b>	<b>100</b>
3.1. Authentification des isolats .....	100
3.2. Caractéristiques des souches retenues .....	102
3.2.1. Caractéristiques culturelles en milieu solide.....	102
3.2.2. Caractéristiques culturelles sur milieu liquide.....	104
3.2.3. Caractéristiques cellulaires .....	106
3.3. Caractéristiques biochimiques .....	106
3.4. Détermination des caractères physiologiques.....	109
3.5. La résistance des souches aux métaux lourds .....	115
3.6. Profil d'utilisation des substrats carbonés .....	116
3.7. Profil d'utilisation des substrats azotés .....	117
3.8. Traitement numérique des résultats.....	118
<b>Conclusion.....</b>	<b>120</b>
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>121</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>124</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>146</b>

### Introduction générale

Dans les régions arides et semi arides, le climat sec crée un effet évaporatif élevé ce qui nécessite de grandes quantités d'eau pour l'irrigation des cultures. L'utilisation intensive des ressources en eau, conduit inévitablement à la salinisation des sols, pouvant limiter sévèrement leur productivité.

Selon Lepri (2006), 10 à 15% des surfaces irriguées dans le monde souffrent, à des degrés divers, de problèmes de salinisation ; 0,5 à 1% des surfaces sont perdues chaque année et près de la moitié des surfaces irriguées sont menacées à long terme. Actuellement, sur 1.5 milliard d'hectares de terre cultivée dans le monde, environ 77 millions d'hectares sont affectés par la salinisation (Munns et Tester, 2008).

En Algérie, près de 3,2 millions d'hectares subissent à des degrés de sévérité variable, le phénomène de salinisation dont une bonne partie se trouve localisée dans les régions steppiques où ce processus est plus marqué du fait des températures élevées durant presque toute l'année, du manque d'exutoire et de l'absence de drainage efficient (Szablocs, 1989). Ce problème a été observé dans plusieurs régions du pays (Chéelif, Relizane, Ain Témouchent, Hautes plaines de Sétif et de Constantine). La situation grave dans laquelle se trouve certains périmètres irrigués de l'Oranie, illustre parfaitement les dimensions de ce phénomène (Kessiran, 2003).

L'excès de sel dans le sol, affecte la germination des semences, retarde la croissance des plantes entraînant par conséquent une baisse du rendement (Munns, 2002).

La plante exposée à la contrainte de salinisation, déclenche des mécanismes de tolérance ou une réaction d'adaptation lui permettant de faire face à cette nouvelle situation et poursuivre sa croissance (Flowers, *et al.*, 1977).

Ces mécanismes qui peuvent s'exprimer déjà dans la graine pourrait être un indicateur de la tolérance des plantes au sel pour les stades ultérieurs de développement (Misra et Dwivedi, 2004). D'autres critères ont été proposés comme la survie, la vigueur, les dommages foliaires, la taille des plantes et le rendement (Subbaro et Johansen, 1994 ; Ashraf et Harris, 2004); ainsi que la production de métabolites spécifiques et l'accumulation d'ions (Hasegawa *et al.*, 2000).

Pour trouver une solution à cette contrainte des méthodes efficaces sont requises pour améliorer la tolérance au sel pour de nombreuses variétés de plantes cultivées. Ceci passe obligatoirement par la sélection des variétés pouvant se développer et fournir de bons rendements sous stress salin. Le choix des variétés tolérantes aux sels est tributaire d'une

## **Introduction**

---

connaissance approfondie des mécanismes physiologiques et biochimiques mis en jeu par les plantes pour s'adapter à cette contrainte (Trinchant *et al.*, 2004). Ces mécanismes sont plus complexes quand il s'agit d'une légumineuse et de son symbiote.

Le choix de la féverole pour ce travail est dicté par son intérêt tant sur le plan nutritionnel, par son apport en protéines, que sur le plan agronomique par sa contribution à l'enrichissement du sol en azote grâce à la fixation symbiotique de l'azote qu'elle réalise en association avec des rhizobia (Duc *et al.*, 2010). De ce fait la recherche de souches de *Rhizobium* osmotolérantes à haut potentiel fixateur d'azote doit être intégrée dans la sélection d'associations *Rhizobium*-légumineuses tolérantes à la salinité. La sélection et l'identification de ces souches permet ensuite la fabrication d'inoculum et l'inoculation des cultures et des semences de légumineuses par des *Rhizobium* tolérantes à la salinité. C'est une pratique qui permet d'implanter de manière durable dans un sol l'inoculum rhizobien afin qu'il puisse établir au rythme de la succession des cultures une symbiose efficiente avec sa plante hôte (Räsänen, 2002).

C'est dans cette problématique que s'inscrit cette étude qui a pour objectif principal, l'évaluation de la réponse de 4 variétés de féverole (*Vicia faba L. minor*) au stress salin. Ces réponses sont évaluées par la mesure des paramètres de croissance, de nodulation ainsi que des paramètres physiologiques et biochimiques. L'objectif étant de contribuer à la mise au point d'un test de sélection pour l'amélioration de la féverole sous contrainte saline.

La présente thèse comporte trois chapitres

### **Chapitre 1**

Revue bibliographique rapportant l'importance de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse et l'effet du stress salin sur la croissance et le développement des légumineuses en général.

### **Chapitre 2**

Effet de différentes concentrations en NaCl sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de quatre variétés de féverole (*Vicia faba L. minor*).

### **Chapitre 3**

Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.

**CHAPITRE I**  
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## CHAPITRE I : Revue bibliographique

### 1. La symbiose *Rhizobium*- légumineuse

La symbiose intracellulaire qui s'établit entre les diverses bactéries du sol appelées rhizobia, et les plantes de la famille des légumineuses aboutit à la formation de structures appelées nodosités sur les racines des plantes et parfois sur les tiges des plantes aquatiques. Dans les cellules de ces nodosités, les bactéries se différencient en bactéroïdes capable de réduire l'azote atmosphérique N<sub>2</sub> en une forme assimilable par la plante hôte (Lam *et al.*, 1996 ; Franche *et al.*, 2009). En contre partie, la plante fournit aux bactéries une niche dans laquelle elles peuvent se multiplier abondamment et des composés carbonés issus de la photosynthèse. Cette interaction constitue une symbiose, puisque les deux partenaires vivent en contact étroit, et un mutualisme, puisqu'il s'agit d'une association à bénéfice réciproque. Grâce à cette symbiose, les légumineuses sont capables de pousser dans des sols pauvres en azote minéral ou organique (Gough, 2009).

#### 1.1. Les Fabacées ou légumineuses

Les légumineuses constituent la troisième super-famille par ordre d'importance chez les angiospermes (Doyle et Luckow, 2003). La famille des *Fabaceae* appelée aussi légumineuses est extrêmement diverse, avec environ 18000 espèces au développement très varié, incluant de petites plantes herbacées annuelles, des arbustes, des lianes et des arbres (Gough, 2009). La majorité des espèces sont dans la sous-famille *Papilionoideae* avec 476 genres et environ 14000 espèces. La sous-famille *Mimosoideae* contient 77 genres et environ 3000 espèces. Et la sous-famille des *Caesalpinoideae* contient 162 genres et environ 3000 espèces (Schrire *et al.*, 2005). La sous famille des *Papilionoideae* regroupe les espèces cultivées les plus importantes économiquement: le soja (*Glycine max*), le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le pois (*Pisum sativum*), la luzerne (*Medicago sativa*), l'arachide (*Arachis hypogaea*), le pois- chiche (*Cicer arietinum*), et la fève (*Vicia faba*) (Broughton *et al.*, 2003). Parmi les espèces de légumineuses décrites, seulement 2800 ont été examinées pour la nodulation racinaire (Sprent, 2001).

Les légumineuses représentent 35% des protéines végétales utilisées au niveau mondial pour l'alimentation humaine et animale. D'un point de vue nutritionnel, la composition en acides aminés des légumineuses est très complémentaire de celle des céréales. En effet, les protéines

provenant des céréales sont déficientes en lysine, et les légumineuses à graines sont déficientes en acides aminés sulfurés et en tryptophane (Wang *et al.*, 2003). Les légumineuses sont également cultivées pour leurs huiles alimentaires (soja, arachide). En plus de leur contribution à la fixation symbiotique de l'azote, elles constituent un potentiel de reforestation et de contrôle de l'érosion des sols et un couvert végétal pour les terres dégradées lorsqu'elles sont en association (Revellin, 2009). Les légumineuses favorisent également la survie de la faune sauvage, ce sont des espèces source de miel contribuant au développement des pollinisateurs tels que les abeilles (Terzot et Rasmont, 2007).

Les légumineuses associées à leurs symbiotes peuvent être utilisées en phytoremédiation car elles ont la propriété de faciliter la dégradation de contaminants du sol, comme les pesticides et les herbicides (Revellin, 2009). Elles ont la propriété également de réduire le N<sub>2</sub>O (protoxyde d'azote) puissant gaz à effet de serre en N<sub>2</sub>. Ces effets ont été observés sur un sol de luzerne avec *Sinorhizobium meliloti* (Henault et Revellin, 2011).

La culture des légumineuses représente donc le meilleur moyen de produire des protéines tout en respectant l'environnement : c'est un exemple de culture dans le cadre d'une agriculture durable.

### 1.1.1. La féverole (*Vicia faba* L. *minor*)

Les fèves et féveroles appartiennent au genre *Vicia faba* à 2n = 12 chromosomes. Cette espèce de légumineuse annuelle de la famille des *Fabaceae*, sous-famille des *Faboideae*, tribu des *Fabeae* dont elle est le type ; présente une assez grande variabilité morphologique (biologie florale, taille et composition du grain, hauteur des plantes, rendement, efficacité de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique et la tolérance aux stress abiotiques et biotiques) (Duc *et al.*, 2010).

Selon Muratova (1931) la féverole (*Vicia faba* L.) possède deux sous-espèces *V. faba* subsp *paucijauga* (Alef.) Murat. et *V. faba* subsp *eu-faba*. Dans la sous-espèce *eu-faba* on dénombre trois variétés différentes classées selon la taille de leurs graines (Gallais et Bannerot, 1992) :

- Vicia faba* L. *minor*** Beck, la petite fève ou féverole dont la graine, plus petite, est plus ou moins cylindrique ou ovoïde légèrement comprimée, utilisée pour l'alimentation animale ;
- Vicia faba* L. *equina*** Pers, la fève à cheval à grains moyens, utilisée également pour l'alimentation animale ;

-*Vicia faba L. major* Harz, la fève maraîchère, à grosse graines aplaties pouvant mesurer 2 à 3 cm de long, destinée à la consommation humaine.

La culture de la féverole est pratiquée dans le monde entier. Elle est très répandue en Europe occidentale et du nord, destinée particulièrement à l'alimentation du bétail. C'est une culture de l'ancien monde répandue avec la révolution néolithique, dont les plus anciens centres connus se situent au septième et huitième millénaire avant notre ère au proche orient dans le croissant fertile (Doré et Varoquaux, 2006). Selon Cubero (1973), le centre d'origine de *Vicia faba* est le proche Orient ; elle s'est ensuite diffusée en Europe, de l'Afrique du Nord en direction de la côte espagnole, le long du Nil puis vers l'Ethiopie, et à partir de la Mésopotamie vers l'Inde. Par contre, selon Maxted (1995), le centre d'origine de *Vicia faba* serait le Sud Est de l'Europe et le Sud Ouest de l'Asie.

Décrite par Linné en 1753, la féverole (Tick bean en anglais et Foueyla en arabe) est une plante dicotylédone, annuelle herbacée d'une taille qui varie entre 60 à 200 cm.

Elle se caractérise par une tige robuste et creuse. Elle possède une capacité d'enracinement de 60 à 80 cm, portant des nodosités abondantes dans les 30 premiers centimètres. Les feuilles sont composées de deux à trois paires de folioles larges ovales, entières et succulentes.

Ses fleurs, de couleur blanche ornées de motifs noirs et pourpres ou violacés, sont disposées par grappes de 2 à 9 fleurs à l'aisselle des feuilles (Gallais et Bannerot, 1992). Le fruit est une gousse contenant 4 à 9 graines, disposée en bouquets à l'aisselle des rameaux foliaires. D'abord verte, elle est noirâtre à maturité (Laumonier, 1979). La plupart des graines sont de formes ovales, plus ou moins régulières et parfois rétrécies en leur milieu suivant les variétés et de couleur blanche, beige, verte ou marron (Elzebroek et wind, 2008).

Deux types de développement peuvent être distingués chez la féverole :

-le type hiver ramifié à sa base, à longue période végétative et présentant un certain niveau de résistance au froid,

-le type printemps à tige généralement unique, à rythme de végétation rapide, sensible au froid (Moule, 1972).

La féverole pousse particulièrement bien dans les sols argileux ou de limon argileux bien drainés. Elle craint les fortes températures et la sécheresse à la floraison et au stade de remplissage des grains. La température optimale de croissance est comprise entre 21 et 27°C. Elle n'aime pas les sols humides et asphyxiants, ni les sols séchant et peu profonds, ni les pH trop faibles. Par contre, elle tolère bien les sols caillouteux avec une bonne capacité de

rétenction d'eau. Sa culture peut être effectuée dans les zones bénéficiant d'une pluviométrie supérieure à 400 mm/an (Zaghouane, 1991).

### 1.1.1.1. Intérêts et domaines d'utilisation de la féverole

La féverole est d'une valeur énergétique élevée, la composition moyenne de féverole pour 100g de MS a montré qu'elle constitue une bonne source de glucides (48,9-52%), de protéines (27- 29%) et de fibres (8%), et présente une faible teneur en matières grasses (1,5%) (Cuq et Leynaud-Rouaud, 1992). Elles se mangent fraîches, ou en légume sec quand elles sont récoltées à maturité. La qualité des féveroles proposées à l'alimentation humaine a progressé avec la sélection de variétés à faible teneur en vicine-convicine (MC Vicar *et al.*, 2013). Elles sont connues également pour leur effet de réduction du cholestérol dans le sang, et leur effet hypoglycémiant (Messina, 1999). Cependant, leurs graines contiennent des facteurs antinutritionnels comme les facteurs antitrypsiques qui vont baisser la digestibilité des composants nutritifs de la graine et des phytohémagglutinines qui altèrent et atrophiaient les villosités de la muqueuse intestinale (Calet, 1992).

Depuis peu, en Europe du Nord, la farine de féverole se substitue partiellement à la farine de soja qui est aussi utilisée comme adjuvant de panification (Crepon, 2007). La féverole offre également de grandes possibilités pour l'alimentation des animaux d'élevage (ruminants et volailles) grâce à son excellente valeur nutritive, à son appétibilité universelle et à sa préparation facile (INIP, 2002).

La féverole apporte une certaine contribution en azote en fixant et en intégrant une partie de l'azote atmosphérique, lorsqu'elles sont utilisées en rotation ou en association dans les systèmes de culture (McVicar *et al.*, 2013). Les résidus de cette culture sont plus riches en azote et contribuent à enrichir le sol en cet élément. Les cultures succédant aux légumineuses peuvent aussi bénéficier indirectement de l'azote fixé par l'entremise des résidus laissés par la légumineuse (Chalck, 1998).

Dans beaucoup de cas la féverole a confirmé son intérêt en tant que plante de couverture, de surcroît c'est une légumineuse avec une capacité de fixation de 30 à 100 kg de N/ha pour une interculture de 2,5 à 3 mois.

Par ailleurs, la taille des graines qui augmente le volume des semences, lui octroie un pouvoir germinatif sans égal et suffisamment de réserves pour s'installer quel que soient les

conditions climatiques ou de semis. En complément, cette culture possède un système racinaire très agressif et structurant qui en plus de travailler le sol et induire de la bio fissuration, en consommant l'eau du profil, dynamise comme toutes les légumineuses, l'activité biologique (Proléa, 2009).

### 1.1.1.2. Production de la féverole dans le monde et en Algérie

La production mondiale de graines est de l'ordre de 50 millions de quintaux, dont le principal pays producteur est la Chine avec 14 millions de quintaux. Les autres pays producteurs sont l'Ethiopie (7,15 millions de quintaux), l'Australie (4 millions de quintaux), le Royaume-Uni (3,77 millions de quintaux) et la France (3,06 millions de quintaux) (Unip et Eurostat, 2014), ce dernier étant aujourd'hui le seul pays capable de fournir des graines à faible teneur en vicine-convicine.

En Algérie, la féverole a été l'une des espèces les plus utilisées dans les régions montagneuses, particulièrement en Kabylie, pour l'alimentation humaine et animale. La seule variété de féverole cultivée connue est « Sidi Aich » (Zaghouane, 1991).

Peu d'effort de recherche et de travaux ont été réalisés sur l'introduction de semences et la création variétale. De nos jours, la féverole cultivée est souvent issue d'un mélange variable de semences. Les agriculteurs utilisent une variété dite de ferme, c'est à dire qu'ils produisent leurs semences eux mêmes, et ne tiennent pas compte de sa pureté variétale. Cette culture voit sa superficie décroître à chaque campagne agricole et se retrouve actuellement en voie de régression.

La fève et féverole constituent les légumineuses alimentaires les plus cultivées en Algérie. La superficie totale réservée à ces cultures est de 37 668 ha avec un rendement moyen de 11,3 qx/ha (DSAEE, 2013). Les principales zones de culture en Algérie sont Chlef (6255 ha), Tlemcen (4570 ha), Skikda (4490 ha), Guelma (2740 ha), Souk Ahras (2400 ha), Relizane (2145 ha) et Mostaganem (1445 ha). Le rendement moyen de ces régions est faible, n'excédant pas les 13,5 qx/ha. Toutes les autres régions du Nord de l'Algérie, cultivent également la fève et la féverole, mais sur des superficies beaucoup moins importantes. Le rendement moyen le plus élevé est enregistré dans les régions de Tipaza et Saida atteignant 21 qx/ha suivi de Constantine et Bejaia avec 17 qx/ha (DSAEE, 2013).

### 1. 2. Les rhizobia: *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*

Les rhizobia sont des bactéries aérobies du sol qui font partie de la subdivision des  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  protéobactéries, un groupe important et diversifié de micro-organismes à Gram négatif. Actuellement, on préfère utiliser le terme BNL (Bactéries Nodulant les Légumineuses) à la place du terme rhizobia qui lui dérive du nom du genre *Rhizobium* (Zakhia *et al.*, 2004).

Ces bactéries présentent la capacité de rentrer en symbiose avec des plantes de la famille des fabacées en formant des nodosités racinaires ou caulinaires (Oldryod et Downie, 2004).

Cette symbiose confère aux fabacées, l'aptitude unique parmi les plantes de grande culture de fixer l'azote de l'air et de s'en nourrir (Gough, 2009).

Les rhizobia sont capables également d'interagir avec le système racinaire des plantes non légumineuses et d'améliorer la productivité agricole. Elles sont regroupées sous le terme de « Bactéries promotrices de la croissance végétale » (Plant growth promoting rhizobacteria ou PGPR). Ces bactéries en interaction mutualiste avec les plantes n'induisent pas la formation d'un organe spécifique, mais les deux organismes impliqués tirent profit de cette relation non obligatoire. Différents travaux ont démontré les effets bénéfiques de *Rhizobium leguminosarum* sur la laitue et la canne à sucre (Singh, 2013). Les effets bénéfiques de ces PGPR se traduisent par une synthèse de phytohormones, de sidérophores (Ahemad et Khan, 2011) et une augmentation de la solubilisation du phosphate (Khan, 2010).

#### 1.2.1. Evolution de la classification des rhizobia

La taxonomie des *Rhizobiaceae* a connu de profonds remaniements du fait de l'abandon du spectre d'hôte comme important critère pris en compte pour la définition des espèces et de l'adoption des critères généralement retenus pour la classification bactérienne (Vandamme *et al.*, 1996).

Initialement Fred et Waksman (1932) ont défini les groupes d'inoculation croisée, en partant du concept que les rhizobia peuvent être classés en fonction de la plante hôte avec laquelle ils entrent en symbiose. Cependant, les limites de cette classification sont rapidement apparues.

Parallèlement, Lohnis et Hansen (1921) proposèrent les notions de rhizobium à croissance lente et rhizobium à croissance rapide basées sur les vitesses de croissance sur milieu de culture. Le terme croissance rapide se réfère à des rhizobia associés à la luzerne, au trèfle, au haricot et au pois ; tandis que le terme croissance lente désignait les rhizobia du soja et de vigna.

La classification proposée par Bergey's Manual of systematic Bacteriology (Jordan, 1984) reconnaissait deux genres regroupés dans la famille des *Rhizobiaceae* : *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*. Le genre *Rhizobium* comprenait trois espèces *R. loti*, *R. meliloti* et *R. leguminosarum*, cette dernière espèce étant divisée en trois biovars : *trifolii*, *phaseoli* et *viciae* (Jordan, 1982). Le genre *Bradyrhizobium* ne comprenait que l'espèce *japonicum* (Jordan, 1982).

En 1988, la combinaison d'études polyphasiques et phylogénétiques a modifié considérablement la taxonomie des rhizobia. Deux genres nouveaux : *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988) et *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988) et six nouvelles espèces ont été proposées, *A. caulinodans* (Dreyfus *et al.*, 1988), *S. fredii* et *S. xinjiangensis* (Chen *et al.*, 1988), *R. galegae* (Lindström, 1989), *R. tropici* (Martinez-Romero *et al.*, 1991), *R. huakuii* (Chen *et al.*, 1991). Cette classification a été contestée, tant au niveau de certaines espèces et biovars que pour certains genres comme *Sinorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1992).

Plus tard, l'étude des gènes codant pour l'ARNr 16S a démontré la proximité phylogénétique entre le genre *Rhizobium* et *Agrobacterium* d'une part et entre *Bradyrhizobium*, *Rhodopseudomonas* et *Nitrobacter* d'autre part (Sawada *et al.*, 1993). Ceci a conduit à une classification plus affinée et une nomenclature plus précise dans les genres d'*Agrobacterium* et *Rhizobium*. Ainsi, en plus des quatre genres des bactéries symbiotiques des légumineuses : *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* et une vingtaine d'espèces ; un cinquième genre *Mesorhizobium* a été reconnu.

L'isolement de nombreuses souches à partir de diverses légumineuses non étudiées auparavant et leur caractérisation par des approches polyphasiques et phylogénétiques basées sur l'analyse des loci *atp D* et *rec A* (Gaunt *et al.*, 2001 ; Vinuesa *et al.*, 2001) et sur l'ADN 16S ont permis de décrire de nouveaux genres et de nouvelles espèces (Zakhia et de Lajudie, 2001 ; Sawada *et al.*, 2003).

Actuellement, un total de 98 espèces de rhizobia répartis en 14 genres et appartenant aux classe  $\alpha$ - Proteobacteria (11 genres),  $\beta$ - Proteobacteria (2 genres) et  $\gamma$ - Proteobacteria (1 genre) ont été identifiées (Berrada et Fikri Benbraham, 2014). Les genres de la classe  $\alpha$ - Proteobacteria : *Rhizobium* (Franck, 1889), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988), *Ensifer* (anciennement *Sinorhizobium*) (Chen *et al.*, 1988), *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997), *Methylobacterium* (Sy *et al.*, 2001), *Devosia*, (Rivas *et al.*, 2003), *Microvirga* (Kanso et Patel, 2003), *Ochrobactrum* (Trujillo *et al.*, 2005), *Phyllobacterium* (Valverde *et al.*, 2005), et *Shinella* (Lin *et al.*, 2008).

Les genres de la classe  $\beta$ - Proteobacteria : *Burkholderia* (Moulin *et al.*, 2001) et *Cupriavidus* (anciennement *Ralstonia*) (Chen *et al.*, 2001). Le genre de la classe  $\gamma$  - Proteobacteria est *Pseudomonas sp* (Shiraissi *et al.*, 2010).

Cette classification est loin d'être définitive, elle est dynamique et en perpétuel changement, ce qui la rend complexe. Cette complexité est non seulement liée à la diversité des isolats bactériens et des plantes légumineuses mais aussi due au phénomène naturel qui est le brassage génétique entre les bactéries du sol qui est souvent soldé par un transfert latéral des gènes entre les souches du même genre ou de différents genres (Berrada et Fikri-Benbraham, 2014).

Les bactéries symbiotiques nodulant le genre *Vicia faba* ont été initialement décrites par Franck (1889), *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* (*Rlv*) est capable de noduler toutes les espèces de légumineuses appartenant à la tribu des *Viciae* comprenant les genres : *Vicia*, *Pisum*, *Lathyrus* et *Lens* (Jordan, 1984).

A l'instar du terme biovar, Rogel *et al.* (2011) ont proposé récemment le terme symbiovar, en suivant le concept pathovar classique pour les bactéries pathogènes des plantes. Symbiovar s'applique pour différencier les rhizobia d'une espèce mais qui possède une gamme d'hôte différente. Ainsi, ce terme s'est étendu à d'autres genres : *Ensifer*, *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium*.

Divers travaux ont porté sur la diversité et la spécificité symbiotique vers les plantes hôtes des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* isolées de tous les continents (Laguerre *et al.*, 2003 ; Barr *et al.*, 2008). Ces travaux ont mis en évidence des différences génétiques entre ces souches capables de noduler les légumineuses de la tribu des *Viciae*.

Alvarez Martinez *et al.* (2009) ont suggéré une origine commune en Europe pour les souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* d'où elles auraient diffusés vers d'autres continents.

Depuis 2008, d'autres espèces de *Rhizobium* capables de noduler les légumineuses de la tribu de *Viciae* ont été décrites, comme *Rhizobium fabae*, isolées à partir de nodules de féverole en Chine capable de noduler le pois (Tian *et al.*, 2008), présentant des gènes nodC similaires à ceux du biovar *viciae* (Rogel *et al.*, 2011). Saidi *et al.* (2014) ont proposé une nouvelle espèce *Rhizobium laguerreae* capable de noduler *Vicia faba* dans différentes régions géographiques (Tunisie, Pérou et Espagne).

### 1.3. La nodulation

La symbiose rhizobia-légumineuse résulte d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie. L'établissement et le fonctionnement de la symbiose sont sous le contrôle génétique des deux partenaires. La reconnaissance entre les deux symbiotes est possible grâce à des échanges de signaux moléculaires (Limpens et Bisseling, 2003).

#### 1.3.1. Les signaux moléculaires

L'installation de la symbiose est contrôlée par un dialogue moléculaire qui se met en place entre la bactérie et la plante hôte (Fig.1). En présence de substances inductrices provenant des exsudats racinaires (flavonoïdes et bêtaïnes), les protéines régulatrices synthétisées par Nod D de la bactérie sont activées. Ces dernières présentes de manière constitutive chez les rhizobia, sont des facteurs de transcription de la famille LysR indispensables à l'activation des gènes nod (Long, 2001).

Les gènes *nod ABCIJ* sont des gènes communs très conservés chez les différentes espèces de rhizobia. L'expression des gènes structuraux conduit à la production de signaux bactériens constitués de lipo-oligosaccharides ; ce sont les facteurs de nodulation ou facteurs Nod (Duhoux et Nicole, 2004).

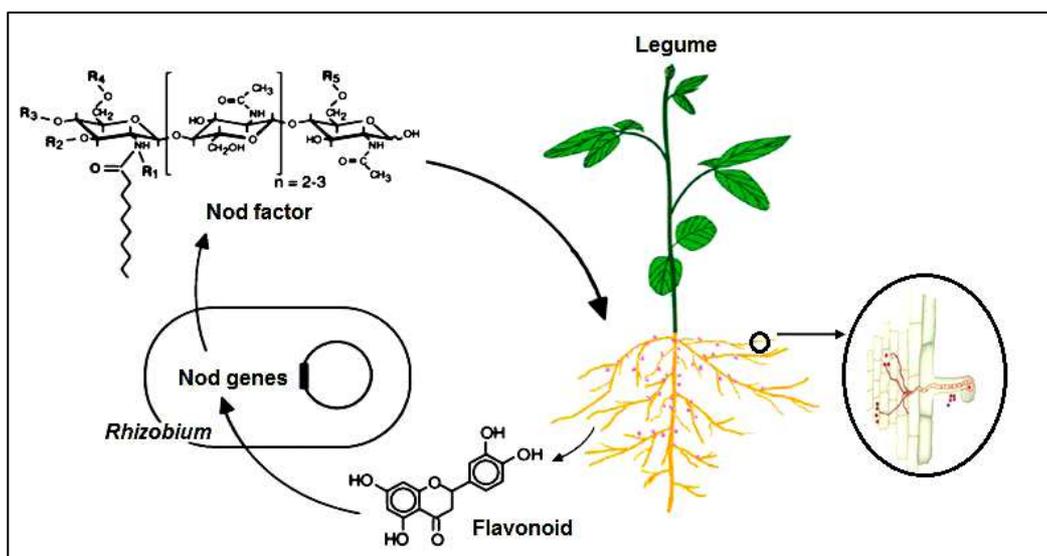


Figure 1 : Échanges de signaux contrôlant les interactions symbiotiques précoces (Lindström *et al.*, 2010).

Les gènes de rhizobia essentiels pour l'infection et la nodulation incluent les gènes *nod* (*nod*, *nol*, *noe*), les gènes *hsn* (gènes de nodulation spécifiques de l'hôte) et d'autres gènes qui codent pour l'expression et la synthèse de molécules de structure de la surface bactérienne tels que les gènes *exo* responsables de la synthèse des exopolysaccharides, et les gènes *lps* responsables de la synthèse des lipopolysaccharides (Broughton *et al.*, 2000).

Les facteurs Nod sont des lipo-chito-oligosaccharides (LCOs), formés par 3 à 5 résidus N-acétyl-glucosamine liés par des liaisons  $\beta$  (1-4). Un acide gras est lié à la partie non réductrice du sucre terminal (Dénarié *et al.*, 1996). Ces facteurs Nod synthétisés par différentes espèces de rhizobia portent diverses substitutions (fucosyl, sulfuryle, acétyle, méthyle, carbonyle et les résidus arabinosyle) qui déterminent la spécificité d'hôte (Oldroyd et Downie, 2004). Ils jouent un rôle dans l'induction du programme symbiotique précoce de la plante hôte (Gough, 2009).

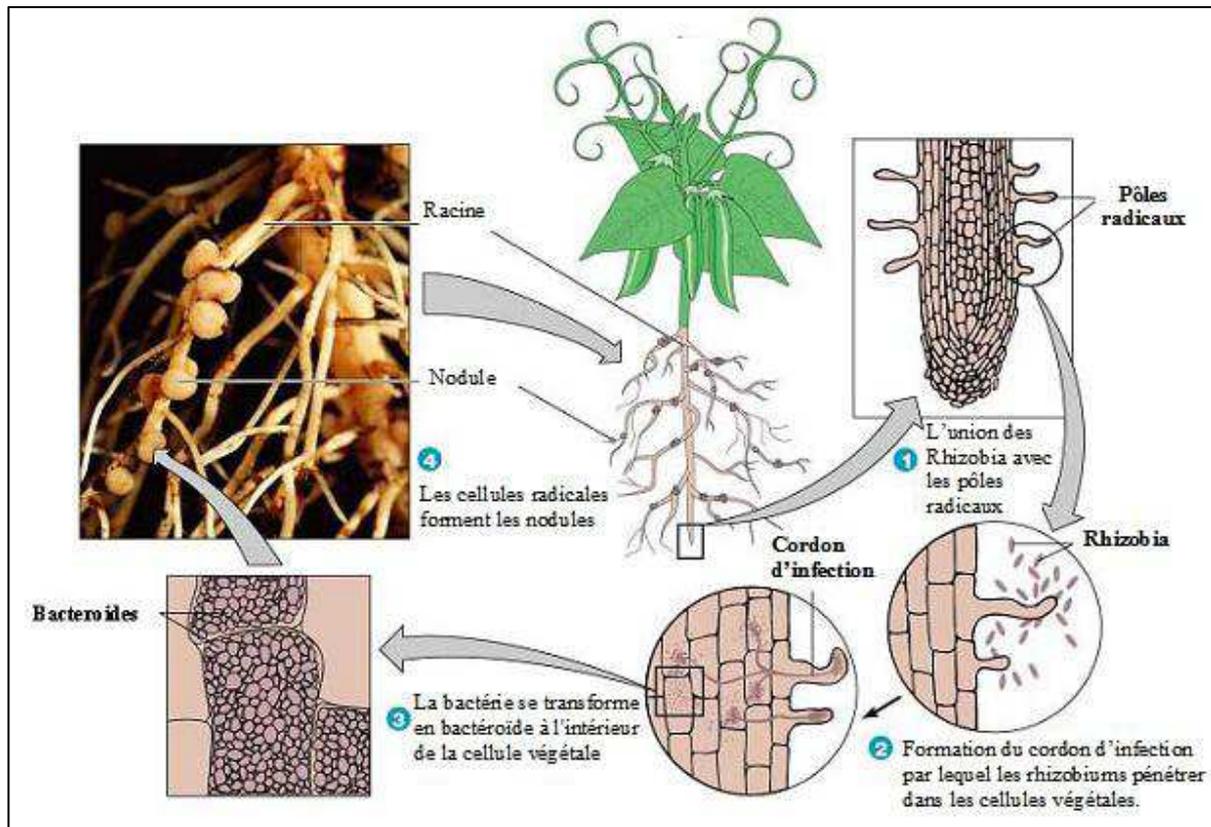
Chaque espèce de rhizobium produit une structure de facteurs Nod qui lui sont propres, avec des substitutions différentes déterminant sa spécificité d'hôte et son activité biologique. Ainsi, un nombre restreint de rhizobia est capable de noduler un nombre restreint de légumineuses, en revanche, certains microsymbiotes s'associent avec plusieurs partenaires. Les réponses cellulaires aux facteurs Nod sont les plus visibles : deux processus sont simultanément mis en place, le développement du nodule au niveau du cortex racinaire et le développement d'un cordon d'infection depuis les poils absorbants jusqu'au nodule (Perret *et al.*, 2000).

### 1.3.2. La formation des nodules

Après perception des facteurs Nod par la plante, des flux d'ions traversent la membrane plasmique de l'épiderme racinaire et entraînent une dépolarisation membranaire. Cette dernière s'accompagne d'oscillations périodiques en calcium intracellulaires ainsi que l'expression des gènes de la plante impliquée dans les étapes précoces du cycle cellulaire (Ané *et al.*, 2004).

Les différents événements aboutissant à la formation du nodule (Perret *et al.*, 2000) sont : **a.** la fixation du rhizobium ainsi que la déformation des poils absorbants de la racine permettant d'englober la bactérie située à proximité ; **b.** formation d'un cordon d'infection conduisant la bactérie jusqu'à un primordium nodulaire issu des divisions cellulaires corticales (Crespi et Frugier, 2008 ; Oldroyd *et al.*, 2011); **c.** libération des bactéries par endocytose dans les cellules du primordium nodulaire (Ivanov *et al.*, 2010); **d.** le primordium nodulaire se développe alors en nodosité pendant que les cellules pénètrent dans les cellules végétales et se

différencient en bactéroïdes formant ainsi le symbiosome (Brewin, 2004) dans lequel la fixation de  $N_2$  va se réaliser (Djordjevic, 2004 ; Giraud *et al.*, 2007).



**Figure 2 : Les différentes étapes du processus de nodulation (Faghire, 2012).**

Les bactéroïdes sont responsables de la réduction de l'azote atmosphérique  $N_2$  en ammoniacque  $NH_4^+$  grâce à l'action de la nitrogénase (Peters et Szilagyi, 2006). Le développement d'un nodule fonctionnel nécessite la production par les cellules hôtes, d'un certain nombre de protéines spécifiques du nodule, appelées nodulines. Les nodulines précoces sont exprimées pendant le processus d'infection et le développement du nodule. L'expression des nodulines tardives coïncident avec le début de la fixation, elles sont impliquées dans le fonctionnement et la maintenance du nodule. La leghémoglobine est la noduline tardive la plus abondante, elle est à l'origine de la couleur rose chez les nodules et permet la régulation de l'oxygène chez les bactéroïdes (Oldroyd *et al.*, 2011).

Sur la base de leur morphologie, du site d'initiation des divisions cellulaires du cortex et la durée du fonctionnement du méristème nodulaire, les nodules de légumineuses se subdivisent en deux catégories : nodules déterminés et indéterminés (Franssen *et al.*, 1992 ; Maunoury *et al.*, 2008).

Chez les légumineuses tropicales telles que *Phaseolus vulgaris* et *Glycine max* ; les nodules de type déterminés sont initiés à partir du cortex externe dont la persistance du méristème disparaît très tôt et la longueur du nodule est limitée. La croissance du nodule se fait par élargissement des cellules, donnant une forme arrondie.

Les nodules des légumineuses tempérées telles que *Medicago truncatula*, *Pisum sativum* ou *Vicia faba* sont indéterminés. Ils se développent à partir des cellules du cortex interne, et ont un méristème apical persistant qui produit en continue de nouvelles cellules, ce qui se traduit par des nodules de forme allongée (Timmers *et al.*, 2000).

### 1.3. 3. Fonctionnement des nodosités

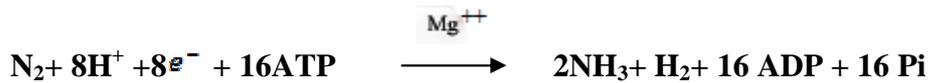
Le nodule mature est capable de réduire l'azote moléculaire grâce à un complexe enzymatique appelé nitrogénase. Le pouvoir fixateur des bactéroïdes est codé par des gènes bactériens qui sont : les gènes **fix** essentiels à la fixation d'azote et les gènes *nif* impliqués dans la synthèse de la nitrogénase, dont les gènes de structure *nifH*, *nifD* et *nifK* (Halbeib et Ludden, 2000 ; Masson-Boivin *et al.*, 2009).

La nitrogénase est composée de deux métalloprotéines qui comportent trois groupements prosthétiques (Dean *et al.*, 1993). La protéine I appelée dinitrogénase est un tétramère de haut poids moléculaires (220.000 Daltons) contenant le cofacteur à fer et à molybdène appelé Fe-Mo-Co au niveau duquel l'azote moléculaire est réduit en ammoniacque (Newton, 1993). La protéine II ou dinitrogénase réductase qui contient du fer et du soufre est responsable du transfert des électrons à la dinitrogénase (Elmerich, 1997).

Le gène *nifH* code pour la dinitrogénase réductase, alors que les gènes *nifD* et *nifK* codent pour la dinitrogénase. Durant la catalyse, les électrons sont délivrés de la dinitrogénase, dans un processus impliquant l'association et la dissociation des composants protéiniques et l'hydrolyse de deux molécules Mg-ATP pour chaque transfert d'électrons. Ces électrons peuvent être représentés par des produits de photosynthèse, de fermentation de sucres, ou de composés du cycle de Krebs (Eady, 1986).

La nitrogénase exige non seulement la présence d'un donneur d'électron à bas potentiel d'oxydoréduction, mais aussi celle de l'ATP et d'ions Mg<sup>++</sup>.

La fixation d'azote est un processus très coûteux en énergie, la réduction par la nitrogénase d'une molécule de N<sub>2</sub> en 2 molécules de NH<sub>3</sub> nécessite au moins 16 molécules d'ATP et 8 électrons (Jones *et al.*, 2007). La réaction catalysée par cette enzyme est la suivante :



La production de l'ammoniaque s'accompagne d'un dégagement de molécule d'hydrogène. L'émission d'hydrogène constitue une perte d'énergie qui réduit l'efficacité de la nodosité. Il existe des bactéries fixatrices d'azote telles que *Bradyrhizobium* possédant une hydrogénase membranaire Hup+ permettant de recycler l'hydrogène produit par la nitrogénase ce qui a pour effet d'améliorer l'efficacité des nodosités (Halbeib et Luden, 2000).

Le fonctionnement de la fixation d'azote nécessite la contribution des deux partenaires. La plante fournit un environnement micro aérobie, de l'énergie et des sources de carbone nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase. Le complexe nitrogénasique est très sensible à l'oxygène alors que l'énergie requise par la fixation de l'azote implique une activité respiratoire aérobie chez les bactéroïdes. Ce phénomène paradoxal est résolu par plusieurs mécanismes qui participent au contrôle de la concentration intra-nodulaire de l'oxygène, ils concourent également à la protection de la nitrogénase contre l'oxygène : **a.** la respiration intense des bactéroïdes empêche l'accumulation de l'oxygène et diminue son taux intra-nodulaire ; **b.** existence à la périphérie des nodules, au niveau des cellules internes du cortex, d'une barrière à la libre diffusion de l'oxygène ; **c.** la présence d'une protéine propre à la symbiose rhizobium-légumineuse, la leghémoglobine qui fixe l'oxygène et permet de le maintenir à faible pression partielle (Ott *et al.*, 2005).

L'azote moléculaire fixé sous forme d'ammoniaque se retrouve directement dans le flux métabolique de la plante où il est transformé en composés azotés organiques assimilables par la plante (acides aminés, amides, etc.) (Graham et Sadowsky, 2006).

### 1.4. La salinité

La salinisation des sols se traduit par une accumulation de sels solubles à la surface ou proche de la surface des sols. Elle est due aux forts taux d'évaporation qui favorise les remontées capillaires et donc l'accumulation des sels qui étaient dissous dans l'eau. Des précipitations insuffisantes empêchent un lessivage des sels qui s'accumulent. En dépassant un certain seuil de minéralisation, le sol acquiert un caractère salin (Mermoud, 2006). La salinisation d'un milieu implique la présence d'une source de sels qui peut être naturelle, dénommée primaire, et une salinisation anthropique, généralement liée à l'irrigation, que l'on appellera secondaire (Cherbuy, 1991).

### A. Salinisation primaire

Dans le monde, près de 80 % des terres salinisées ont une origine naturelle, il s'agit d'une salinisation primaire. Elle est due à la formation des sels pendant l'altération de minéraux et de roches sodiques ou à des apports naturels externes: **a.** Dans les régions côtières par intrusion de l'eau salée ou submersion des terres basses ; **b.** Inondation périodique par de l'eau de mauvaise qualité ; **c.** Remontée d'une nappe phréatique salée près de la zone racinaire (Mermoud, 2006).

### B. Salinisation secondaire

L'agriculture moderne, en raison de défrichement ou de l'irrigation intensive conduit, à l'augmentation de la salinité des terres. L'irrigation combinée à un mauvais drainage est la cause la plus grave, parce qu'elle conduit à des pertes de terres agricoles productives. En effet, même une eau douce de meilleure qualité contient des sels dissous, et si la quantité de sels apportée par cette eau peut sembler négligeable, la quantité d'eau apportée au fil du temps entraînerait un dépôt cumulé de sel dans les sols qui peut s'avérer considérable. L'eau pure est perdue par évaporation mais les sels restent et s'accumulent (Ciseau, 2006).

Qadir *et al.* (2001) énumèrent d'autres facteurs qui peuvent enclencher une salinisation: des pratiques culturales inadaptées, des effets indirects de l'irrigation, l'intrusion marine et la contamination par des déchets salins.

Il existe des moyens de prévenir ou de corriger la salinisation : **a :** Lixiviation, en donnant aux cultures juste un peu plus d'eau que nécessaire, réduisant ainsi la salinité dans la zone racinaire et les sels sont transportés dans la couche aquifère qui les disperse, à condition que le drainage naturel soit suffisant ; **b :** Drainage : des fossés ou des tuyaux souterrains peuvent emporter l'eau saline ; **c :** Meilleure utilisation de l'eau d'irrigation, l'aspersion est plus efficace que l'irrigation de surface (Bouteyre et loyer, 1992 ; Ciseau, 2006).

#### 1.4.1. Définition des sols salés

Les sols salés ou sols halomorphes sont caractérisés par leur teneur élevée en sels solubles dans l'ensemble ou dans une partie du profil ou par la dégradation de la structure de l'un de leurs horizons –ou de tout leur ensemble- sous l'influence de l'un des ions provenant de ces sels en particulier du sodium (Aubert, 1976).

On parle en général de sols salés ou sols halomorphes lorsque la concentration des solutions en sels solubles dépasse 0.5g/L. Cette concentration est le plus souvent mesurée en conductivité électrique (CE) de la solution de sol saturée exprimée en déci siemens par mètre (ds/m) (Robert, 1996). Selon Calvet (2003) un sol est dit salé lorsque la conductivité de l'extrait de sol saturé est supérieure à 4 dS/m à 25°C ou  $4\text{dS/m} \approx 40\text{mM NaCl}$  ou plus (Tab.1). Les sels les plus communs présents dans la solution du sol correspondent aux cations  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , et aux anions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$ ,  $\text{NO}_3^-$ .

**Tableau 1. Classification des sols salinisés (Brady, 2002)**

Classification	Conductivité électrique ( $\text{dS.m}^{-1}$ )	pH du sol	Ratio d'adsorption du sodium
Saline	>4.0	<8.5	<13
Salin-sodique	>4.0	<8.5	>13
Sodique	<4	>8.5	>13

Pour l'irrigation, la qualité de l'eau est d'une importance capitale pour le sol et la plante. Elle est déterminée par ses composantes solubles, à savoir : la teneur totale en sels, la composition ionique et la présence d'oligo-éléments. L'évaluation de la salinité des eaux d'irrigation est en général basée sur la conductivité électrique à 25°C. Les eaux dont la conductivité électrique est inférieure à 0.25 mmhos/cm sont faiblement salines alors que celles pour lesquelles cette conductivité est comprise entre 0.75 et 2.25 mmhos/cm sont très salines (Brady, 2002).

### 1.4.2. Importance de la salinité dans le monde et en Algérie

A la surface du globe existent de vastes zones où une salinité élevée fait naturellement partie de l'environnement. Les marais salins côtiers, sont caractéristiques de régions basses, souvent des estuaires, qui sont submergées à marais haute. Une forte salinité est également caractéristique des déserts continentaux, l'évaporation y est supérieure aux précipitations ; le drainage est faible ou nul et les sels s'accumulent dans le sol (Fitter et Hay, 1987).

Une forte salinité est également présente sur les rives de lacs intérieurs, comme le Grand Lac Salé ou la Mer Morte, qui ne possèdent pas d'évacuation et qui accumulent du sel du fait de l'évaporation. Une autre catégorie de sols très salés est constituée par les terres agricoles qui ont été très irriguées (Flowers *et al.*, 1977).

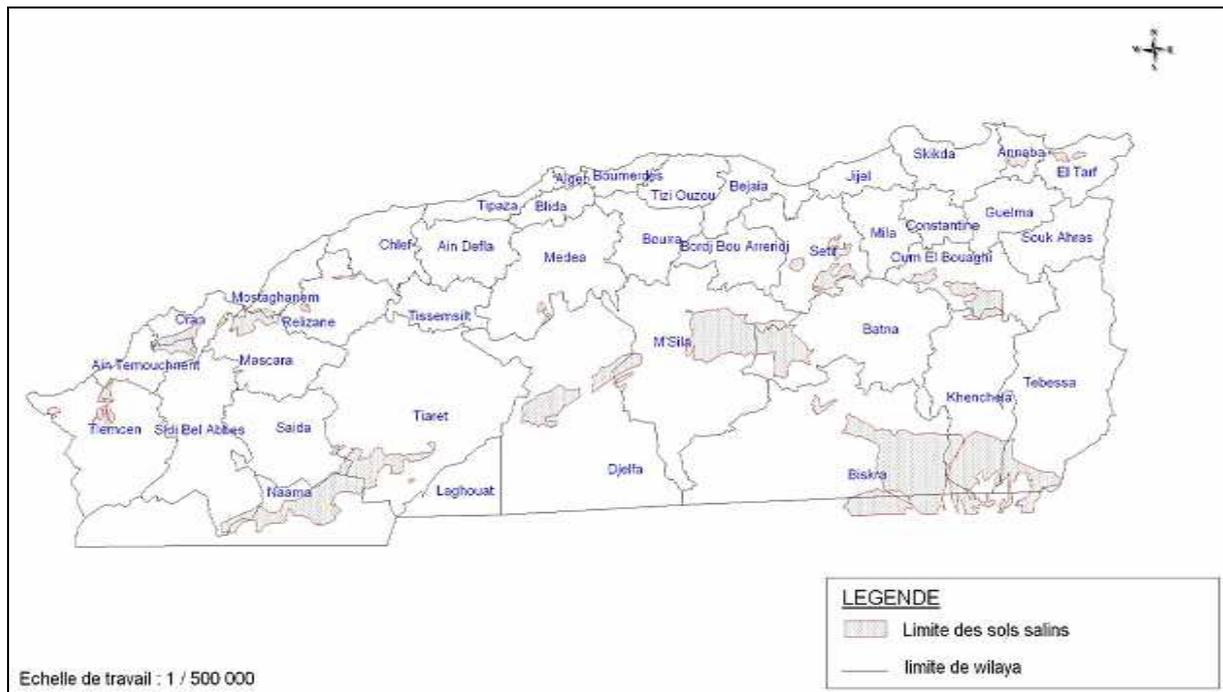
Ainsi, la salinisation des terres est un problème majeur à l'échelle du globe. Selon les estimations les plus récentes, elle affecte déjà au moins 400 millions d'ha et en menace gravement une surface équivalente (Nachtergaele et young, 2000). Selon FAO (2007), au niveau mondial, 10 millions d'hectares des terres cultivées sont abandonnées chaque année à cause des problèmes d'irrigation. Sur les 1,5 milliards d'hectares de terres cultivées non irriguées, seulement 2% (32 millions d'hectares) sont affectés par la salinité à différents degrés, alors que sur les 230 millions d'hectares des terres irriguées actuellement, ce chiffre s'élève à 20% (45 millions d'hectares) (Munns et Tester, 2008).

En Afrique, près de 4M ha sont affectés par la salinisation, soit près de 2% de la surface totale, en Tunisie 25%, en Afrique du Sud environ 9%. Au Proche- Orient, près de 92 Mha sont touchés, soit environ 5% de la surface totale. Au Pakistan, plus de 25% des surfaces irriguées sont salinisées, aux USA 23%, en Inde près de 17%, et en Chine près de 15% (Mashali *et al.*, 2005).

En Algérie, près de 3,2 million d'hectares subissent à des degrés de sévérité variable, le phénomène de salinisation dont une bonne partie se trouve localisée dans les régions steppiques où le processus de salinisation est plus marqué du fait des températures élevées durant presque toute l'année, du manque d'exutoire et de l'absence de drainage efficient (Szablocs, 1989). Selon le Houerou (1995), les sols salés occupent de vastes superficies. Ils sont localisés plus au Nord qu'au Sud, ils s'expriment mieux sous les isohyètes 450mm, qui semble être la limite supérieure des sols fortement sodiques. Rouabhia et Djabri (2010) estiment que 20% des sols irrigués sont concernés par des problèmes de salinité en Algérie.

Ce phénomène est observé dans les basses plaines et vallées de l'Ouest du pays ( Mina, Cheliff, Maghnia, Habra Sig), dans les hautes plaines de l'Est (Constantine, Sétif, Bordj Bou Arreridj, Oum El Bouagui), aux abords des Chotts et de Sebkhass (Chott Ech Chergui, Chott Gharbi, Chott Hodna, Chott Melghir, Sebkhass d'Oran, de Benziane, Zemmoul, Zazhrez Gharbi et Chergui, etc..) et dans le grand Sud (dans les Oasis et dans les régions sahariennes au Sud de Biskra jusqu'à Touggourt, Ouargla et au-delà) (Fig.3) ( Insid, 2008).

Les travaux d'Aubert (1976) ont montré que l'origine des sols sodiques en Afrique du nord est très diverse, mais proviennent principalement d'une action de la mer ou de la présence de dépôts lagunaires salés et gypseux répartis dans l'échelle stratigraphique depuis le Trias jusqu'au Quaternaire. Ces sols doivent également leur développement à la présence de nappes salées, souvent proches de la surface ; et autour de certaines zones très salées Sebkhass par exemple, l'extension des terrains sodiques est due à l'action du vent.



**Figure 3 : Répartition des sols salins du nord de l'Algérie (Insid, 2008).**

### 1.4.3. Le stress salin

La terminologie utilisée dans la description d'un environnement stressant et les réponses qu'une plante peut y apporter a fait l'objet de controverses. Levitt (1980) décrit la physiologie du stress en l'abordant dans son aspect physique, comme étant une force exercée par unité de surface d'un objet. En réponse au stress, l'objet oppose une déformation, ou un changement de dimensions. Pour Grime (1979), toute contrainte externe au niveau d'un écosystème qui limite la productivité en deçà de la potentialité génétique d'une plante peut être considérée comme stress. Jones et Jones (1989) ont défini le stress biologique comme étant une force ou une influence hostile qui tend à empêcher un système normal de fonctionner.

Les principaux stress environnementaux auxquels les plantes sont confrontées sont : le déficit hydrique (sécheresse, faible potentiel hydrique) ; la salinité, la température élevée (chaleur) ; les faibles températures (froid et gel), l'excès d'eau (inondation, anoxie), les radiations (lumière visible, ultraviolet), les produits chimiques (pesticides, métaux lourds, polluants atmosphériques) et biotiques (pathogènes, compétition).

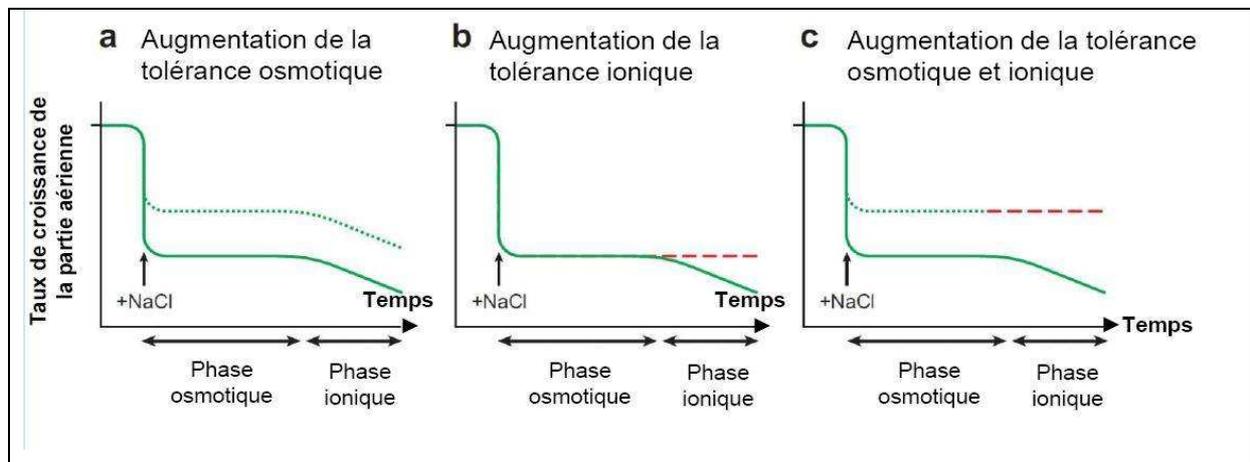
Le stress salin est une brusque augmentation de la concentration en sel qui conduit d'une part à un afflux plus élevé d'ions dans la cellule et d'autre part à une perte d'eau par voie osmotique. C'est pour cette raison que le stress salin et le stress hydrique se ressemblent sur

certain points (Nultsh et Miesch, 1998). Cependant, le stress salin est plus complexe que le stress hydrique car son effet osmotique est combiné à des phénomènes de toxicité ionique et des interactions nutritionnelles (Greenway et Munns, 1980). Le stress salin s'applique surtout à un excès d'ions, en particulier, aux ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  (Hopkins, 2003).

### 1.4.3.1. Effets du stress salin sur la plante

La salinité joue un rôle important dans la distribution des plantes ; à la différence des halophytes croissant sur des sols très salins, les glycophytes sensibles ne peuvent tolérer que de faibles quantités de sel et peuvent subir des dommages irréparables par des concentrations inférieures à 50 mM. Beaucoup d'espèces cultivées importantes comme le haricot (*Phaseolus vulgaris*), la fève et féverole (*Vicia faba*), le soja (*Glycine max*), le riz (*Oryza sativa*) et le maïs (*Zea mays*) sont des glycophytes. La réponse de ces plantes à la salinité se manifeste généralement par un effet dépressif sur la croissance et le développement (Munns, 2002).

Le stress salin s'applique sur la plante sous deux types de contraintes. Tout d'abord, le sel exerce un effet osmotique dès que les racines sont en contact avec le sel jusqu'à un niveau seuil de concentration en sel. Ce niveau seuil diffère d'une plante à une autre. Dans un deuxième temps, le sel s'accumule à des concentrations toxiques dans les feuilles et entraîne un stress ionique (Fig.4) (Munns et Tester, 2008).



**Figure 4 : Schéma hypothétique de la réponse de la croissance aux deux phases de réponse à la salinité pour les génotypes qui diffèrent par la vitesse à laquelle le sel atteint des niveaux toxiques dans les feuilles (Munns et Tester, 2008).**

Le stress osmotique est provoqué par la présence dans la solution du sol des ions (principalement  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ ) qui diminuent la disponibilité de l'eau aux racines (Lluch *et al.*, 2007), une forme de sécheresse physiologique est générée ce qui rend de plus en plus difficile l'acquisition d'eau par la plante (Munns, 2002 ; Hopkins, 2003).

La toxicité ionique se produit quand les racines prélèvent des ions  $\text{Na}^+$  et/ou  $\text{Cl}^-$  et les accumulent à des niveaux nuisibles dans les feuilles (Lluch *et al.*, 2007), ceci inhibe le prélèvement et l'assimilation des éléments minéraux (Munns *et al.*, 1995 ; Hasegawa *et al.*, 2000 ; Munns et Tester, 2008). Au delà d'une certaine intensité de stress les plantes sensibles présentent un flétrissement, un retard voire un arrêt du développement, une chlorose et la sénescence des parties aériennes.

Des concentrations salines trop fortes dans le milieu provoquent un déséquilibre de la nutrition minérale des plantes (Lluch *et al.*, 2007) en particulier vis-à-vis des transporteurs ioniques cellulaires. L'accumulation des ions  $\text{Na}^+$  par la plante limite l'absorption des cations  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{+2}$ , il y'aurait une compétition entre  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{+2}$  pour les mêmes sites de fixation apoplasmiques (Haoula *et al.*, 2006) ; de leur part, les ions  $\text{Cl}^-$  limitent l'absorption des anions  $\text{NO}_3^-$ , cet effet d'antagonisme est mieux connu chez les glycophytes que chez les halophytes (Bouhmouch *et al.*, 2005). Chez certaines plantes, l'augmentation de la concentration en  $\text{Na}^+$  s'accompagne d'une réduction de concentration en Mg, P et N. Ce déséquilibre nutritionnel entraîne une réduction de croissance en présence de sel lorsque des ions essentiels tels que  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  et  $\text{NO}_3^-$  deviennent limitants (Gratan et Grieve, 1998). De même, la présence excessive d'ions sodique, chlorique et borique engendrent une augmentation du pH du sol, ce qui a un effet indirect sur l'impossibilité d'absorption des ions ferreux, phosphate, zinc et manganèse indispensable pour la croissance des plantes (Tester et Davenport, 2003). Les effets nutritionnels de la salinité incluent les deux actions primaires du sel sur les plantes: la toxicité directe due à l'accumulation excessive des ions dans les tissus et un déséquilibre nutritionnel provoqué par l'excès de certains ions.

La teneur en sel élevée dans les tissus influence directement les enzymes photosynthétiques et par voie de conséquence les réactions d'échange de lumière et de gaz. Or, la réduction de la photosynthèse à long terme entraîne l'inhibition de la formation et de l'expansion de la feuille ainsi que l'abscission précoce de cette dernière (El Hendawy, 2004). L'accumulation du  $\text{Na}^+$  dans les tissus photosynthétiques se manifeste par une baisse de la teneur en chlorophylle et en caroténoïdes, par une diminution de la surface foliaire, du nombre de feuilles et de la conductance stomatique (Davenport *et al.*, 2005). La réduction du taux photosynthétique chez les plantes sensibles au sel engendre un stress oxydatif avec formation des espèces réactives d'oxygène (ROS) (Foyer et Noctor, 2003) tels que le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et les radicaux superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ) et ( $\text{OH}^\cdot$ ) qui attaquent les lipides, les protéines et les acides

nucléiques causant une peroxydation des lipides et une dénaturation des protéines. Ces ROS altèrent également les enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase, la catalase et la peroxydase (Han et Lee, 2005). La salinité induit également des changements dans l'équilibre hormonal, par l'accumulation de l'acide abscissique (ABA) mais également par une diminution des niveaux des hormones de croissance comme les auxines et les cytokinines (Itai, 1999). L'accumulation de l'ABA provoque très rapidement la réduction de la transpiration, ainsi qu'une réduction de la croissance végétative (Gravot, 2009). L'éthylène est aussi accumulé, mais s'oppose à un grand nombre de manifestations du développement végétal ; inhibe par exemple le transport des auxines réduisant ainsi l'élongation racinaire (Hartman *et al.*, 2000). Un stress salin extrême conduit à un nanisme et à une inhibition de la croissance racinaire. Les feuilles deviennent sclérosées avant même d'avoir fini leur croissance et l'organisme tout entier risque de dépérir assez vite (Calu, 2006).

### 1.4.3.2. Effets du stress salin sur la croissance et la survie des rhizobia

La salinité affecte d'une manière délétère la croissance et la persistance des souches de *Rhizobium* dans le sol (Farissi *et al.*, 2014). En effet, en présence de sel toutes les phases de la croissance bactérienne sont affectées, la phase de latence se retrouve plus allongée ; le temps de génération se dédouble et la phase exponentielle est moins importante (Pocard *et al.*, 1987).

L'effet du sel sur la croissance et la survie des microorganismes varie d'une souche bactérienne à l'autre en fonction du degré d'halotolérance de la nature et de la concentration en sel (Rai et Singh, 1999). En effet, certaines souches de rhizobia sont inhibées en culture pure à des concentrations de 100 mM NaCl, alors que d'autres comme *Sinorhizobium meliloti* tolèrent des concentrations allant de 300 mM à 700 mM NaCl (Zahran, 2001). Cependant, des souches extraites de nodosités d'Acacia se sont révélées hautement tolérantes au sel, elles peuvent croître sur des milieux contenant entre 500 et 850 mM de NaCl (Zahran, 2001).

### 1.4.3.3. Effets sur la symbiose *Rhizobium*- légumineuse

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse est une relation complexe nécessitant des conditions optimales pour sa réalisation. La salinité peut affecter la symbiose indirectement en réduisant la croissance de la plante hôte et la disponibilité des photosynthétats (Delgado *et al.*, 1993), ou bien directement en inhibant le processus d'infection et le développement des nodules et enfin sur l'activité des nodules (Georgiev et Atkins, 1993 ; El Nady et Bellal, 2005; Arshad *et al.*, 2010).

Chez les cultivars tolérants de pois chiche, la salinité inhibe le processus d'infection et affecte la taille et le nombre de nodules, tandis que chez le haricot, une inhibition du cordon d'infection a été remarquée (Bouhmouch *et al.*, 2005). Chez la fève, la courbure du poil absorbant et la colonisation bactérienne ont été réduites en présence de 100 mM NaCl (Zahran et Sprent, 1986).

### 1.4.3.4. Effets sur la fixation symbiotique de l'azote

La salinité limite d'une manière sévère la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (Zahran, 1999). Elle affecte négativement l'activité de la nitrogénase (Tejera *et al.*, 2005 ; Khadri *et al.*, 2007) et la respiration nodulaire (Serraj *et al.*, 1994) qui cause par la suite, une diminution des teneurs en azote totale de la plante (Salehi *et al.*, 2008). La réduction de l'activité fixatrice d'azote est généralement due à une limitation de la régulation de la diffusion de l'oxygène (Serraj *et al.*, 1994) ou une diminution de la production des protéines cytosoliques, la léghémoglobine, par les nodules (Delgado *et al.*, 1994 ; Lõpez *et al.*, 2008). Cet effet négatif a été corrélé avec une diminution des photosynthétats fournis pour les nodules (Garg et Singla, 2004 ; Lõpez *et al.*, 2008).

## 1.5. Stratégies d'adaptation à la salinité chez les plantes

La plante exposée à la contrainte saline, déclenche des mécanismes de tolérance ou une réaction d'adaptation lui permettant de faire face à cette nouvelle situation et poursuivre sa croissance (Flowers, 2003). La tolérance au sel chez les plantes est un caractère complexe et polygénique, ayant pour origine de nombreux processus agissant de façon additive et synergique (Parida et Das, 2005).

Les événements précoces de l'adaptation des plantes au stress commencent par les mécanismes de perception puis de signalisation via une transduction de signaux et de

messagers afin d'activer les diverses réponses physiologiques et métaboliques, y compris l'expression de gènes de réponse au stress (Calu, 2006).

L'adaptation cellulaire des plantes à la contrainte saline repose sur des mécanismes d'homéostasie ionique, la biosynthèse et l'accumulation d'osmolytes organiques participant à l'ajustement osmotique ainsi qu'aux remaniements protéiques nécessaires au maintien de l'intégrité cellulaire (Hasegawa *et al.*, 2000 ; Munns, 2005).

### 1.5.1. Homéostasie

L'homéostasie ionique cellulaire est la capacité d'autorégulation d'un organisme pour maintenir un état d'équilibre dynamique entre les conditions extérieures et les différentes composantes de son milieu (Niu *et al.*, 1995). La plupart des cellules parviennent à maintenir un niveau élevé de potassium et un faible niveau de sodium dans le cytoplasme à travers la coordination et la régulation des différents transporteurs et canaux (Blumwald *et al.*, 2004). Il existe deux principales stratégies que les plantes utilisent pour faire face à la salinité : la compartimentation des ions toxiques au sein de la vacuole et leur exclusion hors de la cellule (Hasegawa *et al.*, 2000 ; Munns, 2005). Ce sont les gènes *SOS* (Salt overly sensitive) qui codent pour des protéines responsables du maintien de l'homéostasie. La protéine *SOS3* interagit avec la protéine *SOS2*, qui est une sérine/thréonine protéine kinase. La cible du complexe *SOS3/ SOS2* est la protéine *SOS1*, un transporteur membranaire  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (antiport) qui exporte les ions sodiums hors la cellule (Calu, 2006).

#### 1.5.1.1. La compartimentation vacuolaire

Cette stratégie consiste à évacuer du cytoplasme les ions  $\text{Na}^+$  en excès vers la vacuole afin d'éviter leur effet toxique et inhibiteur à l'encontre des processus enzymatiques (Flowers *et al.*, 1977). Ce mécanisme de compartimentation vacuolaire est assuré par l'action d'un antiport vacuolaire sodium/proton ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) dont l'énergie est fournie par les pompes à protons ATPases (adénosine triphosphatase) et PPases (pyrophosphatases) vacuolaires (Zhang *et al.*, 2001). Ainsi, grâce à ce processus, la cellule parvient à maintenir une faible concentration de sodium dans le cytoplasme, minimisant ainsi son effet toxique; et d'autre part, l'augmentation concomitante de la concentration de sodium dans la vacuole va engendrer une forte pression osmotique qui va favoriser l'absorption d'eau et donc améliorer la turgescence des cellules (Glenn *et al.*, 1999).

Chez les plantes de type *includer*, les flux de sodium sont essentiellement ascendants, et le sel est accumulé dans les parties aériennes au niveau des vacuoles. La compartimentation du NaCl dans les vacuoles représente le mécanisme principal de détoxification du sel chez les halophytes (Borsani *et al.*, 2003), tandis que les glycophytes ont recours au mécanisme d'exclusion du sodium des cellules des parties aériennes vers les racines (Munns, 2002 ; Tester et Davenport 2003; Blumwald *et al.*, 2004).

La compartimentation vacuolaire concerne également les ions chlorures afin d'éviter leur effet toxique. Les travaux réalisés par Hechenberger *et al.* (1996) ont démontré l'implication des canaux chlorures (CLC) dans le mécanisme de compartimentation des ions chlorures à l'intérieur de la vacuole. Les cellules des plantes tolérantes seraient alors capables d'accumuler dans leurs vacuoles des concentrations en Cl<sup>-</sup> qui peuvent atteindre 200 à 1000 mmol/L sans exigence énergétique supplémentaire à celle mise à disposition par les pompes à protons vacuolaires (Glenn *et al.*, 1999).

### 1.5.1.2. Exclusion des ions toxiques

Cette stratégie consiste à exclure le sodium du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule. Cette stratégie caractérise les plantes *excluder* qui semblent être dotées d'un mécanisme de protection contre l'envahissement par le sodium, par exclusion de cet ion de leurs parties aériennes (Rahmoune *et al.*, 2009). L'exclusion du sodium est réalisée par l'action combinée d'une série de protéines de type SOS (Zhu, 2003). La protéine de type SOS1 est un antiport (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>) localisé au niveau de la membrane plasmique, qui intervient dans ce mécanisme d'exclusion de sodium vers le milieu extérieur (Mahajan *et al.*, 2008). SOS2 et SOS3 assurent conjointement la régulation de l'activité de SOS1 mais également celle de l'antiport vacuolaire NHX1 (Qiu *et al.*, 2003). D'autre part, afin de réduire l'accumulation de sodium au niveau de la partie aérienne de la plante, ce complexe protéique SOS interagit avec le transporteur HKT1 (Rus *et al.*, 2001) lui aussi situé sur la membrane plasmique et qui est responsable de la recirculation du sodium des feuilles vers les racines via le phloème (Hauser et Horie, 2009). Après avoir été ramené dans la racine, il peut éventuellement être libéré dans le milieu, réduisant ainsi son transport vers les feuilles (Zid et Grignon, 1991). Il existe une corrélation positive entre l'exclusion des sels et la tolérance à la salinité chez plusieurs espèces végétales (Munns *et al.*, 2006).

### 1.5.1.3. Ajustement osmotique

Parmi les mécanismes d'adaptation, l'ajustement osmotique joue un rôle primordial dans la tolérance des végétaux à la contrainte saline (Munns, 2002). En effet, les plantes sont capables de supporter le déficit hydrique engendré par le stress salin, en ajustant plus ou moins rapidement leur potentiel osmotique avec celui du milieu extérieur (Calu, 2006). L'ajustement osmotique se rapporte spécifiquement à une augmentation nette de la concentration de solutés provoquée par des processus métaboliques déclenchés par le stress. Ceci entraîne une diminution du potentiel hydrique, permettant ainsi de maintenir le mouvement d'eau vers les feuilles et par conséquent leur turgescence (Hopkins, 2003).

Les solutés qui participent à l'ajustement osmotique comprennent une série de composés organiques et des ions inorganiques, principalement le  $K^+$ . Ces composés sont dits osmoprotecteurs ou solutés compatibles, ce sont principalement des acides aminés tels que la proline, l'alanine, la  $\beta$ -alanine et la taurine ; des ammoniums quaternaires comme la glycine bêtaïne, la choline-o-sulfate et la glycerophosphorylcholine ainsi que des sulphoniums tertiaires comme (3 diméthylsulfoniopropionate) ; des sucres ou leurs dérivés alcools tels que le mannitol, le sorbitol, le pinitol, le glycérol, et le tréhalose (Hasegawa *et al.*, 2000). Ces composés sont non chargés à pH neutre, hydrophiles, ils sont qualifiés de compatibles car ils ne perturbent pas les interactions entre les macro-molécules et le solvant. La MAPK (Mitogen-Activated-Protein Kinase) est suggéré comme à l'origine de la régulation de la réponse au stress osmotique par l'implication d'osmorégulateurs.

### 1.5.2. Induction des enzymes antioxydantes

Le stress salin provoque la formation des dérivés réactifs de l'oxygène tels que le peroxyde d'oxygène ( $H_2O_2$ ), le superoxyde ( $O_2^-$ ) et le radical hydroxyle (OH $\cdot$ ) (Foyer et Noctor, 2003). Ces dérivés causent des dommages oxydatifs aux différents composants cellulaires, y compris les lipides membranaires, les protéines et les acides nucléiques (Halliwell et Gutteridge, 1989).

Pour faire face aux dérivés réactifs de l'oxygène, les plantes possèdent des antioxydants (de nature non enzymatique) de faible masse moléculaire, tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes, les anthocyanes, et l'acide ascorbique (Ashraf, 2008), mais aussi, elles emploient des enzymes, telles que la superoxyde dismutase, la catalase, l'ascorbate peroxydase, la

glutathion S-transférase et la glutathion peroxydase (Sairam *et al.*, 2010). Dans ce sens, l'induction de la superoxyde dismutase est considérée comme le premier mécanisme de défense contre ces dérivés par réaction de dismutation de  $O_2^-$  en  $H_2O_2$  et  $O_2$ . La catalase et les peroxydases assurent la conversion  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$  (Gratao *et al.*, 2005).

### 1.5.3. Régulation de la croissance

Pour s'adapter au stress salin, la plante peut éviter les dommages par la réduction de la croissance (Zhu, 2002). En effet, ce retard de développement permet à la plante d'une part, la conservation des ressources en eau, ce qui permet la survie de la plante (Zid et Grignon, 1991), d'autre part, d'accumuler de l'énergie et des ressources pour combattre le stress avant que le déséquilibre entre l'intérieur et l'extérieur de la plante n'augmente jusqu'à un seuil où les dommages seront irréversibles (Zhu, 2002). Aussi, la plante maintient une croissance racinaire afin de s'adapter à ces conditions. L'allongement racinaire peut être dû à une augmentation d'activité des enzymes impliquées dans la construction du cytosquelette ou l'accumulation de proline (Ober et Sharp, 1994). Ces deux actions sont régulées par l'acide abscissique (ABA), qui est induit par le stress salin (Jia *et al.*, 2002).

### 1.6. Amélioration de la tolérance au sel chez les légumineuses

L'utilisation des techniques moléculaires modernes et l'introduction de deux espèces de légumineuses modèles (*Medicago truncatula* et *Lotus japonicus*) ont contribué à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires du stress salin, de la tolérance et du fonctionnement de la symbiose chez les légumineuses (Manchanda et Garg, 2008).

Une des approches de l'amélioration du rendement des légumineuses cultivées sous contrainte saline est la sélection des souches de rhizobia tolérantes au sel. Bala *et al.*, (1990) ont montré que des espèces d'*Acacia nilotica* inoculées avec des souches de *Rhizobium* tolérantes au sel étaient capables de maintenir une fixation d'azote proche de 70% à 12 ds/m en comparaison à un taux maximal à 2 ds/m. Plusieurs travaux ont été réalisés sur les effets de l'inoculation des souches de *Rhizobium* tolérantes au sel sur l'amélioration de la fixation d'azote chez *Vicia faba* (Cordovilla *et al.*, 1999).

L'inoculation des cultures avec des mycorhizes et la co-inoculation (*Azospirillum brasilense* - *Glomus clarum*) améliorent la tolérance des cultures au sel chez *Vicia faba* (Rabie et

Almadini, 2005). D'autres travaux ont montré chez le soja une augmentation de la fixation d'azote en présence de genistein avec l'inoculum rhizobia (Miransari et Smith, 2009).

El Hamdaoui *et al.*, (2003), ont montré que la présence du calcium et du bore dans le milieu pouvait contrecarrer les effets négatifs du sel sur la croissance, la nodulation et la fixation d'azote chez *Pisum sativum*. Bruning et Rozema (2013) suggèrent que l'amélioration de la productivité végétale serait plus efficace en présence d'une symbiose tripartite (*Rhizobium*-mycorhize- légumineuse).

## **CHAPITRE II**

**EFFET DU STRES SALIN SUR LA  
GERMINATION, LA CROISSANCE, LA  
SYMBIOSE ET LE RENDEMENT DE 4  
VARIETES DE FEVEROLE**

## **Chapitre II Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole.**

### **Introduction**

Dans les régions arides et semi arides, les végétaux sont exposés aux divers facteurs de stress abiotiques (Ashraf, 2004). La salinité constitue l'une des contraintes environnementales majeures qui en réduisant la disponibilité d'eau dans le sol, affecte profondément la physiologie des végétaux et en particulier la photosynthèse ce qui limite par conséquent leur croissance et leur productivité (Flexas *et al.*, 2007). Bien que les sols salins contiennent beaucoup de sels à des concentrations élevées, le NaCl domine généralement. Les effets nocifs des conditions salines sur la plupart des espèces sont principalement provoqués par une combinaison de stress osmotique et le stress ionique exercé par le Na<sup>+</sup> et/ou le Cl<sup>-</sup> (Tavakkoli *et al.*, 2010).

La plante exposée à la contrainte saline, déclenche des mécanismes de tolérance ou d'adaptation (Ashraf et McNeilly, 2004) lui permettant de poursuivre sa croissance ; par la mise en place d'un ajustement osmotique interne, contribuant à la réduction des pertes en eau et au maintien de la turgescence cellulaire (Greenway et Munns, 1980).

Compte tenu de l'importance de la phase germinative des semences dans le déroulement des stades ultérieures du développement de toute espèce végétale, il s'avère indispensable d'étudier dans la première partie de ce chapitre, l'effet de la contrainte saline sur la germination des graines de quatre variétés de féverole Castel, Espresso, Maya et Sidi Aich.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Matériel végétal**

Les graines consacrées à cette étude sont issues de quatre variétés de féverole (*Vicia faba* L. *minor*) : Espresso, Maya, Castel et Sidi Aich.

Hormis la variété locale Sidi Aich qui provient de l'Institut Technique des Grandes Cultures, d'El Khroub (Constantine), les autres variétés nous ont été fournies gracieusement par le groupe GAE Semences (France). Les caractéristiques des quatre variétés étudiées sont données dans le Tableau 2.

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

Le choix de ces variétés a été fait, suite à une faible germination des variétés fournies par l'ITGC d'El Harrach. Ces variétés sont : N86-139-12-2-4, B87-149FB, ILB 1812 (Syrie) et F321 (Maroc).

**Tableau 2. Quelques caractéristiques des variétés de féverole (*Vicia faba L. minor*) étudiées (Zaghouane, 1991 ; Proléa, 2009).**

Variétés	Type	Hauteur	Floraison	Couleur de la graine	Teneur en protéines % MS	P100G (g)
Espresso	printemps	Moyenne à haute	précoce	beige clair	28,2%	56
Maya	printemps	Moyenne à haute	demi tardive	beige	27,7%	58
Sidi Aich	printemps	moyenne à haute	précoce	marron	27,7%	51
Castel	hiver	courte	demi tardive	marron	29%	65

### 2.2. Milieux de germination et conduite de l'essai

Nous avons choisi comme milieu, de l'eau distillée additionnée de NaCl à des concentrations croissantes de 0 mM (témoin), 50, 100, 150, 200, 250 et 300 mM correspondant respectivement à 0, 2,92, 5,84, 8,76, 11,68, 14,61 et 17,52 g/l.

Les graines sont disposées dans des boîtes de Pétri contenant deux couches de papier filtre imbibées d'eau distillée comme témoin (0 mM) ou d'une solution à différentes concentrations de NaCl. Elles sont placées à l'obscurité à une température de 27°C dans une étuve de germination. Chaque essai porte sur 30 graines, soit 3 répétitions de 10 graines par boîte de Pétri. Les observations sont effectuées quotidiennement pendant 7 jours. L'essai prend fin lorsqu'après deux comptages successifs aucune germination n'est enregistrée.

### 2.3. Caractères mesurés pour le test de germination

Le pourcentage de germination a été exprimé par le rapport du nombre de graines germées sur le nombre total de graines. Une graine est considérée germée lorsque la radicule perce le tégument (Come, 1970).

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

---

La vitesse de germination exprimée en jour a été déterminée par la durée médiane de germination (Scott *et al.*, 1984).

$$\text{Durée médiane} = T_1 + (0.5 - G_1) / G_2 - G_1 (T_2 - T_1)$$

Avec :

$G_1$  = pourcentage cumulé des graines germées dont la valeur est la plus proche de 50% par valeur inférieure ;

$G_2$  = pourcentage cumulé des graines germées dont la valeur est la plus proche de 50% par valeur supérieure.

### 2.4. Conduite des cultures

La conduite des essais a été réalisée sous serre (conditions semi-contrôlées) à la station expérimentale de l'Institut Technique des Cultures Maraîchères et Industrielles (ITCMI) de Staouéli, Alger (altitude : 22m, longitude Est 3°-15°C, latitude Nord 36°-45°C). L'essai s'est étalé de la fin du mois de novembre jusqu'au début du mois d'avril.

Les cultures sont conduites dans des pots de 11 Kg sur un sol cultivé de texture sablo-limoneuse, sous éclairage naturel et dans des conditions de température jour/ nuit de  $23 \pm 5^\circ\text{C}$  /  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  et  $70 \pm 10\%$  d'humidité relative.

Le sol est de pH neutre (pH =7,56), légèrement salin (CE ds/m=2,40). Il se caractérise par une faible teneur en phosphore assimilable (2,79 ppm), en matière organique (0,68 %), en azote (0,03%) et une faible capacité d'échange cationique.

Après germination des graines et transfert des plantules dans les pots, l'arrosage s'effectue à l'eau courante (CE ds/m =1,45).

Le traitement salin est appliqué du stade trois feuilles (20 jours après le semis), jusqu'au stade floraison ; et l'arrosage s'effectue à l'eau courante additionnée ou non de différentes concentrations de NaCl (0 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM) correspondant à 0 ; 2,92 ; 4,38 et 5,84 g/L (Delgado *et al.*, 1994 ; Cordovilla *et al.*, 1995). Une irrigation à l'eau courante est appliquée toutes les deux irrigations afin d'éviter l'accumulation du NaCl dans le substrat de culture. La durée du stress est de deux mois.

Afin de préserver les cultures, nous avons procédé à l'épandage d'une antilimace à base de Métaldéhyde à 5%, du Karaté contre les pucerons et la bouillie bordelaise contre les attaques fongiques.

## **2.5. Dispositif expérimental**

Un dispositif en Split Plot a été adopté avec 10 répétitions. Chaque répétition comprend 2 facteurs, soit un total de 160 pots.

-Facteur 1 : représente le traitement salin avec quatre concentrations de NaCl : 0 mM, 50 mM, 75mM et 100mM ;

-Facteur 2 : représente les quatre variétés.

## **2.6. Caractères mesurés**

À la fin de l'application du stress, les mesures réalisées sur 5 plants par variété et par traitement, ont porté sur les caractères morphologiques (hauteur de la tige, nombre de feuille et ramification, surface foliaire, biomasse aérienne et racinaire), sur les caractères biochimiques : dosage des pigments photosynthétiques, de la proline, des sucres solubles et des protéines, dosage du malondialdéhyde et de la nitrate réductase), caractères liés à l'état hydrique de la plante ( la teneur relative en eau et le potentiel hydrique foliaire), caractères symbiotiques (nombre et poids sec des nodules, l'activité réductrice de l'acétylène et dosage de la leghémoglobine), et dosage des ions minéraux ( $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  ).

À maturité, les composantes du rendement (nombre de gousses, nombre de graines par gousse et poids de 100 graines) ont été mesurées sur les 5 plants restants par variété et par traitement.

### **2.6.1. Caractères morphologiques**

#### ***- Hauteur de la tige***

La hauteur de la tige a été déterminée à partir du collet de la plante jusqu'au bourgeon terminal. Les mesures en (cm) ont été effectuées à l'aide d'une règle graduée.

#### ***-Surface foliaire***

La surface foliaire en ( $\text{cm}^2$ ) a été estimée à l'aide d'un planimètre Area Meter (Thomson model Air Pax Methatronics). Cette mesure a été réalisée au laboratoire de la station Mahdi Boualem (INRA, Baraki).

***-Nombre de feuilles et de ramifications***

Le nombre de feuilles et de ramifications a été déterminé par simple dénombrement.

***-Détermination de la biomasse aérienne, racinaire et nodulaire***

À la fin de l'application du stress, les parties aériennes, racinaires et les nodules ont été séparés et mises à sécher pendant 48h à 80°C, afin de déterminer le poids de la matière sèche des différents organes.

**2.6.2. Caractères biochimiques**

***- Dosage des pigments photosynthétiques***

Les teneurs en chlorophylles *a* et *b* et en caroténoïdes ont été déterminées selon le protocole d'Arnon (1949).

L'extraction est réalisée par 10 mL d'acétone à 80% pour 0,1g de matière fraîche. Le broyat est centrifugé à 2000 trs/mn pendant 10 mn. L'absorbance du surnageant est lue par spectrophotométrie à des longueurs d'ondes de 645 nm, 663 nm et 470 nm respectivement pour la chlorophylle *a*, *b* et les caroténoïdes.

Les concentrations en pigments sont calculées selon la méthode décrite par Lichtenthaler et Welburn (1983).

$$\begin{aligned} & - \text{Chl } a = 12.25 \text{ DO (663 nm)} - 2.79 \text{ DO (647 nm)} \text{ (}\mu\text{g/mL)} \\ & - \text{Chl } b = 21.5 \text{ DO (647 nm)} - 5.10 \text{ DO (663 nm)} \text{ (}\mu\text{g/mL)} \\ & - \text{Caroténoïdes} = 1000 \text{ D0 (470 nm)} - 1.82 \text{ chl}a - 85.02 \text{ chl}b / 198 \text{ (}\mu\text{g/mL)} \end{aligned}$$

***- Dosage des sucres solubles***

Les sucres solubles ont été dosés à l'anthrone par la méthode de Schields et Burnett (1960). Le principe est basé sur la transformation des oses en furfural et dérivés furfuraliques en milieu acide et à chaud par l'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré (Cerning-Beroard, 1975).

L'extraction est effectuée à partir de 0,1 g de matière fraîche (MF) broyée dans 3 mL d'éthanol bouillant à 80%. Le broyat est centrifugé 3 fois pendant 10 min à 3000 trs/min. Le surnageant est destiné au dosage des sucres solubles. Le réactif à l'anthrone est préparé en mettant 0,2 g d'anthrone dans 100 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 91 %, le réactif est conservé au frais et à l'abri de la lumière.

## **Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

---

Dans une série de tubes à essai propres, on prélève 1mL de l'extrait auquel on ajoute 2 mL de réactif à l'antrone. Après agitation, les tubes sont placés au bain marie à 100°C pendant 8 minutes, une coloration vert-bleu est observée.

Après refroidissement dans de la glace, les densités optiques sont lues au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 630 nm. Les teneurs en sucres sont déduites de la courbe étalon réalisée à l'aide des concentrations croissantes en glucose obtenues à partir d'une solution mère de 100 µg/mL. Les teneurs sont exprimées en µg /g MF.

### **- Dosage de la proline**

Le dosage de la proline a été réalisé selon la méthode de Bates *et al.*, (1973). Cette technique est basée sur la capacité de la proline à réagir en milieu acide et à chaud avec la ninhydrine pour donner un composé de couleur rose à rouge, soluble dans les solvants organiques tel que le toluène.

L'extraction est effectuée à partir de 0,1g de matière fraîche additionnée de 2 mL de méthanol à 40%. Un volume de 1mL de l'extrait est additionné de 1ml de mélange d'acide acétique glacial et d'acide orthophosphorique (6M) (3 : 2, V/V) et de 25 mg de ninhydrine. Après 1h d'incubation à 100°C, les tubes sont refroidis et additionnés de 5ml de toluène. Après agitation au vortex deux phases se forment :

- la phase supérieure organique contenant la proline est prélevée.
- la phase inférieure aqueuse est éliminée.

L'absorbance est lue par spectrophotométrie à une longueur d'onde  $\lambda = 520$  nm, les valeurs obtenues sont ensuite reportées sur la courbe d'étalonnage réalisée à partir de concentrations croissantes en proline préparées à partir d'une solution mère de 20 µg/mL. Les teneurs sont exprimées en µg proline/g MF.

### **- Dosage des protéines**

Le dosage des protéines a été réalisé suivant la méthode de Bradford (1976), dont le principe est basé sur la formation de complexes entre le bleu de Coomassie (G250) et les résidus basiques aromatiques des protéines. La formation de liaisons protéine-bleu de Coomassie est visualisée par l'apparition d'une coloration bleue.

L'extraction des protéines est réalisée à partir d'une aliquote de 0,5g de matière fraîche foliaire, broyée dans 6 mL d'eau distillée, puis centrifugée à 5000 trs/mn pendant 15 mn. Un volume de 0,1 mL du surnageant est additionné à 3 mL d'un mélange d'acide

## **Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

---

orthophosphorique à 85%, et 25 mg de bleu de Coomassie (G250) et de 12,5 mL d'éthanol à 95%. Le volume est ensuite complété à 250 mL par de l'eau distillée. L'absorbance est lue par spectrophotométrie à une longueur d'onde  $\lambda = 595$  nm.

Les concentrations en protéines sont déterminées par projection des densités optiques obtenues sur la courbe d'étalonnage faite à partir d'une solution mère de BSA.

### ***-Dosage du malondialdéhyde (MDA)***

La méthode utilisée pour l'estimation de la peroxydation des lipides est le dosage du malondialdéhyde par la réaction à l'acide thiobarbiturique (TBA). Ce procédé permet la formation d'un chromatophore rouge mesurable à 532 nm (Nair et Turner, 1984).

L'extraction est réalisée à partir d'une aliquote de 0,5 g de matière fraîche foliaire homogénéisée avec 1ml de TCA (10% p/v). L'homogénat est rincé deux fois avec 5mL d'acétone et centrifugé après chaque rinçage (4000tr/mn pendant 10mn). Le culot est porté à ébullition à 100°C pendant 30mn en présence de 3mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1%) et 1mL de TCA (0.6%) puis refroidi dans la glace. Un volume de 3mL de n-butanol est ajouté au mélange puis centrifugé à 4000 trs/mn. L'absorbance est lue par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 532 nm et 600 nm. L'absorbance non spécifique due à la turbidité est éliminée en soustrayant à la DO à 532 nm celle absorbée. La teneur en MDA est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire 155 mM<sup>-1</sup>.C<sup>-1</sup>.

### ***- Détermination de l'activité nitrate réductase (ANR)***

Le dosage de l'activité nitrate réductase a été réalisée par la méthode Robin *et al.* (1983).

La nitrate réductase réduit le nitrate en nitrite qui développe une coloration rose par réaction avec le N-Naphtyl-Ethylène Diamine-Dichlorure en milieu acide.

Une foliole est placée dans des tubes venoject de 13 mL contenant 0,5 m de KNO<sub>3</sub> (0,2 N). L'anoxie est réalisée en introduisant deux aiguilles creuses de seringues dans les tubes hermétiquement fermés, permettant le balayage d'azote gazeux sous pression (1,5 Bar). Le balayage est interrompu après 1 minute par retrait simultané des deux aiguilles. L'obscurité est assurée par une feuille d'aluminium entourant le tube. Après 30 mn d'incubation, l'extraction du nitrite est réalisée par addition de 4 mL d'eau distillée bouillante et passage au bain marie à 100°C pendant 10 minutes. Le nitrite produit est alors révélé en ajoutant 2 mL de sulfanilamide (10 g/L dans HCl 1,5N) et 2 mL de N-Naphtyl-Ethylène Diamine-Dichlorure

## **Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

---

(0,2 g/L). Après 10 mn de réaction la coloration est lue au spectrophotomètre à 540 nm. L'activité nitrate réductase (ANR) est exprimée en  $\mu$  mols de  $\text{NO}_2^-$ / h/ g MF.

### **- Mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA)**

Pour la mesure de l'activité fixatrice d'azote des couples symbiotiques *Rhizobium*-légumineuse, nous avons retenu la technique de réduction de l'acétylène en éthylène et quantifier le dégagement de ce dernier par chromatographie en phase gazeuse (Hardy *et al.*, 1968). Cette méthode est basée sur le fait que la nitrogénase contenue dans les nodules des plantes fixatrices d'azote peut utiliser l'acétylène ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ) comme substrat et le réduire en éthylène ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ).

Le dispositif utilisé pour cette mesure est une adaptation de la méthode de Balandreau et Domergues (1971). La partie souterraine est isolée de la partie aérienne de la plante, en couvrant le pot par un sac en plastique bien fermé au niveau du collet. Á l'aide d'une seringue, un volume de 10 mL d'acétylène est injecté dans le pot à travers le sac en plastique. Après 30 mn d'incubation, un volume de 5 mL du mélange gazeux est prélevé, stocké dans des tubes venoject. La teneur en éthylène produit est mesurée au chromatographe en phase gazeuse (CPG) de marque Perkin Elmer 8600 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme avec une colonne remplie de porapack R (80 mesh). La température du four est de 90°C et le gaz vecteur est l'azote à la pression de 2 bars.

L'activité réductrice d'acétylène (ARA) est exprimée en  $\mu$  mols  $\text{C}_2\text{H}_4$  /h/plant. L'activité spécifique est exprimée en  $\mu$  mols  $\text{C}_2\text{H}_4$  / h/ nodules.

### **- Dosage de la leghémoglobine nodulaire**

Le dosage de la leghémoglobine a été réalisé suivant la méthode de Becana *et al.*, (1986). Cette méthode colorimétrique est basée sur l'oxydation du  $\text{Fe}^{2+}$  de l'hémoglobine en  $\text{Fe}^{3+}$  de la méthémoglobine par le ferricyanide, suivie de la formation d'un complexe très stable, la cyanméthémoglobine grâce aux ions cyanures de potassium (KCN). L'absorbance de la cyanméthémoglobine, est directement proportionnelle à la concentration en hémoglobine.

Un poids de 100 mg de nodule frais est broyé dans 3 mL du réactif de Drabkin (52 mg KCN, 198 mg  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  et 1 mg de  $\text{NaHCO}_3$  dans 1L d'eau distillée). Le broyat est centrifugé à 500 trs /mn pendant 15 mn. Le surnageant récupéré est additionné de 10 mL du réactif de

## **Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

---

Drabkin. Le mélange est centrifugé à 20000 trs /mn pendant 30 mn. Les densités optiques du surnageant sont lues par spectrophotométrie à la longueur d'onde  $\lambda = 540$  nm.

### **2.6.3. Caractères liés à l'état hydrique**

#### **- Mesure de la teneur relative en eau (TRE)**

La mesure de la TRE a été réalisée selon la méthode de Clark et Mc Caig (1982). Les folioles ont été prélevées de façon aléatoire et transférées immédiatement au laboratoire.

Ces folioles sont pesées puis placées dans des tubes à essai contenant de l'eau distillée pendant 24 h. Elles sont repesées pour avoir le poids en pleine turgescence. Le poids sec est déterminé après passage dans l'étuve pendant 48 heures à 80 °C.

La teneur relative en eau (TRE) est calculée selon la formule suivante :

$$\text{TRE} = (\text{PF} - \text{PS}) / (\text{Ppt} - \text{PS}) \times 100.$$

Où :

-PF : Poids frais (g) des folioles ;

-PS : Poids sec (g) déterminé après étuvage des folioles pendant 48h à 80°C ;

-Ppt : Poids de pleine turgescence (g) déterminé après immersion des folioles dans de l'eau distillée pendant 18h.

#### **- Mesure du potentiel hydrique foliaire**

Les mesures du potentiel hydrique foliaire ont été faites grâce à la chambre à pression de Scholander. La feuille sectionnée est introduite dans un bouchon en silicone, le tout est introduit dans la chambre à pression de sorte que le bout sectionné apparaisse à l'extérieur du couvercle sur une hauteur maximale de 1,5cm et on envoie de l'azote sous pression jusqu'à l'apparition de la première goutte de sève au niveau de la section de la feuille. La pression nécessaire à l'excrétion d'une goutte de sève est égale, en valeur négative, au potentiel hydrique foliaire du tissu considéré (BenNaceur, 1994). Le potentiel hydrique est exprimé en unité de pression, le Méga Pascal (MPa).

### **2.6.4. Dosage des ions minéraux**

L'analyse à porté sur des échantillons de feuilles et de racines, ces derniers ont subi une dessiccation à l'étuve à 80°C pendant 48 h et mis dans des tubes contenant 20 mL d'acide nitrique N/10 (El Mekkaoui, 1987). Les différents dosages se font sur le filtrat de l'extraction

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

---

acide à froid. Les cations  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  sont dosés par spectrophotométrie de flamme en émission. Les teneurs sont exprimées en mg/g MS.

### 2.6.5. Mesure de la capacité de survie

La détermination de la capacité de survie des plants a été effectuée à la fin de l'application du stress salin. Le taux de survie est défini comme étant le rapport du nombre de plantes survivantes au nombre de plantes initialement installées (Mezni *et al.*, 1999).

### 2.6.6. Mesure des composantes du rendement

À maturité, le nombre de gousses par plant, le nombre de graines par gousse et le poids de 100 grains (g) ont été déterminés.

## 2.7. Analyse des données

Pour chaque caractère mesuré, l'indice de sensibilité au sel (I.S) a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{I.S} = [(\text{traité} - \text{témoin}) / \text{témoin}] \times 100$$

La réponse des variétés à la salinité est évaluée par leur indice de sensibilité relative au sel (I.S.R.S.) qui traduit le rapport de la sensibilité d'une variété donnée au sel exprimé par le déficit relatif de biomasse (D.R.B.) par rapport à la sensibilité moyenne de l'ensemble des variétés ou indice d'intensité de la salinité (I.I.S) (Fisher et Maurer, 1978).

$$\text{I.S.R.S.} = \text{D.R.B.} / \text{I.I.S.}$$

Avec  $\text{D.R.B.} = (\text{BT}_t - \text{BT}_s) / \text{BT}_t$

$\text{BT}_t$  : biomasse totale moyenne d'une variété donnée en l'absence de sel

$\text{BT}_s$  : biomasse totale moyenne d'une variété donnée sous contrainte saline

Et  $\text{I.I.S.} = (\text{M}_t - \text{M}_s) / \text{M}_t$

$\text{M}_t$  : la biomasse totale moyenne de toutes les variétés en l'absence de sel

$\text{M}_s$  : la biomasse totale moyenne de toutes les variétés sous contrainte saline

## **2.8. Analyses statistiques**

Les données recueillies pour l'ensemble des caractères étudiés sont soumises à une analyse de la variance à deux facteurs (traitement salin et facteur variété) par le logiciel SPSS 10. Le test de la plus petite différence significative (LSD) à un risque d'erreur de 0,05 % a été réalisé ; ainsi que des corrélations. L'analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée pour l'ensemble des caractères par le logiciel Winstatic 2.0.

## **3. Résultats**

### **3.1. Effet du stress salin sur la germination des graines de quatre variétés de féverole**

#### **3.1.1. Cinétique de germination**

Les pourcentages de germination des variétés Espresso, Castel, Maya et Sidi Aich ont été relevés tous les jours. Leur évolution en fonction des différentes concentrations et du temps est illustrée sur la figure 5.

En l'absence de NaCl (0mM NaCl), la germination a atteint dès le 2<sup>ème</sup> jour des taux de 60%, 70% ,80% et 93%, respectivement pour les variétés Castel, Sidi Aich, Maya et Espresso. Un maximum (100%) de germination est obtenu le 3<sup>ème</sup> jour pour la variété Espresso et le 4<sup>ème</sup> jour pour les variétés Maya, Sidi Aich et Castel (Fig. 5).

La présence de faibles concentrations de NaCl (50 mM) dans le milieu réduit la germination dès le deuxième jour avec des taux de germination de 43% et 50% respectivement pour les variétés Castel et Maya et de 13% seulement chez la variété Sidi Aich. La variété Espresso quant à elle s'est montrée la moins affectée avec un taux de germination de l'ordre de 87%.

À cette même concentration, le pourcentage de germination maximale (100%) est atteint le quatrième jour pour les variétés Espresso et Castel et le cinquième jour pour Sidi Aich et Maya.

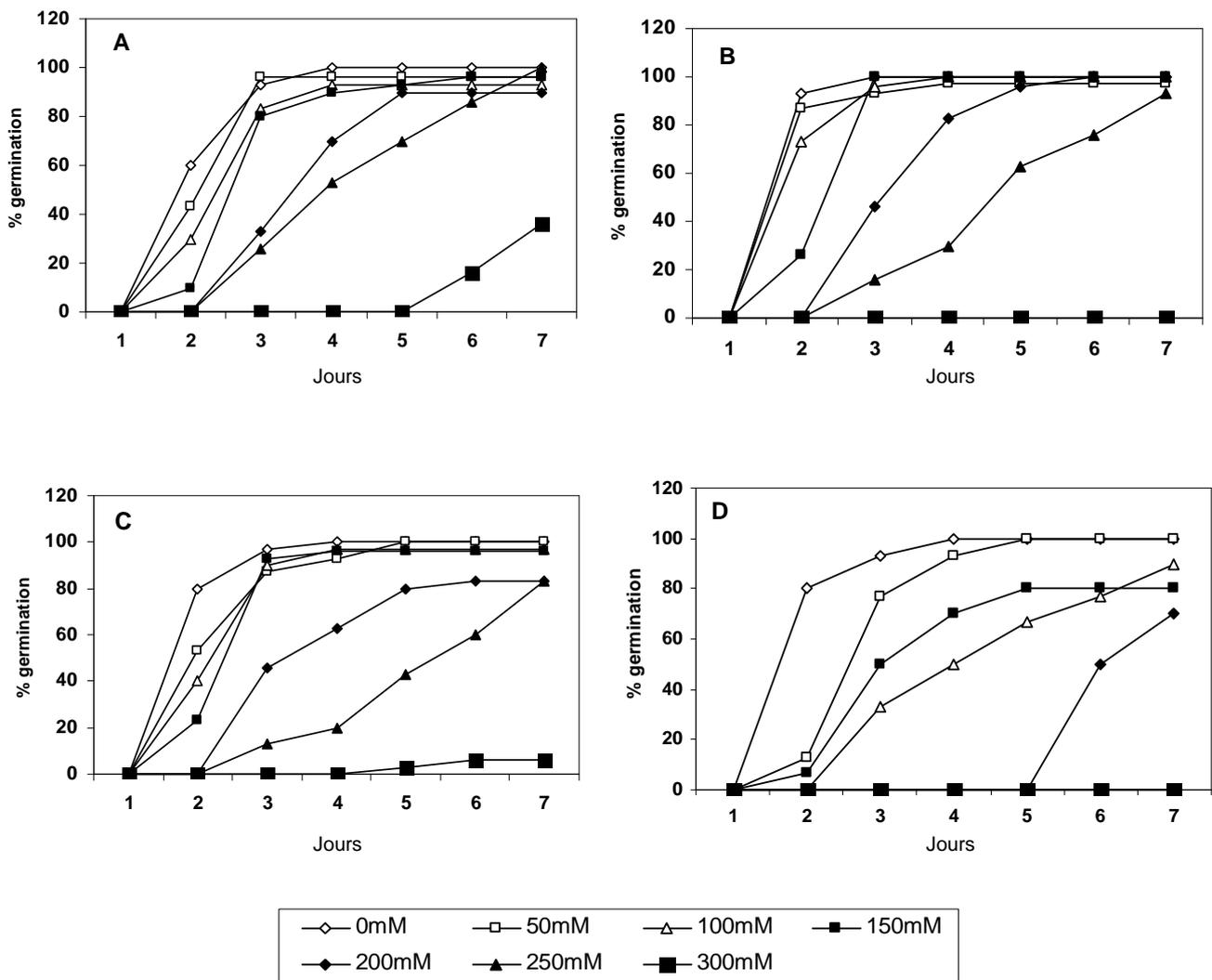
Des pourcentages de germinations avoisinant les 100% sont enregistrés le cinquième jour chez les variétés Espresso, Castel et Maya et le 7<sup>ème</sup> jour chez la variété Sidi Aich, en présence de 100 mM et 150mM NaCl.

En présence de concentrations élevées (200 mM NaCl) la variété Sidi Aich atteint au bout de 5 jours, une faculté germinative de 50% ; son pouvoir germinatif est inhibé à 250 mM NaCl même au bout de 7 jours. Quant aux autres variétés, à 250mM NaCl des pourcentages de

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

93%, 90% et 83% sont enregistrés respectivement pour les variétés Espresso, Castel et Maya au terme de 7 jours d'expérimentation.

À 300 mM de NaCl la germination est fortement réduite pour la variété Maya, elle enregistre un taux de germination de seulement 4% et elle est complètement inhibée chez Espresso. La variété Castel affiche un taux de germination de 36% au bout de 5 jours (Fig. 5).

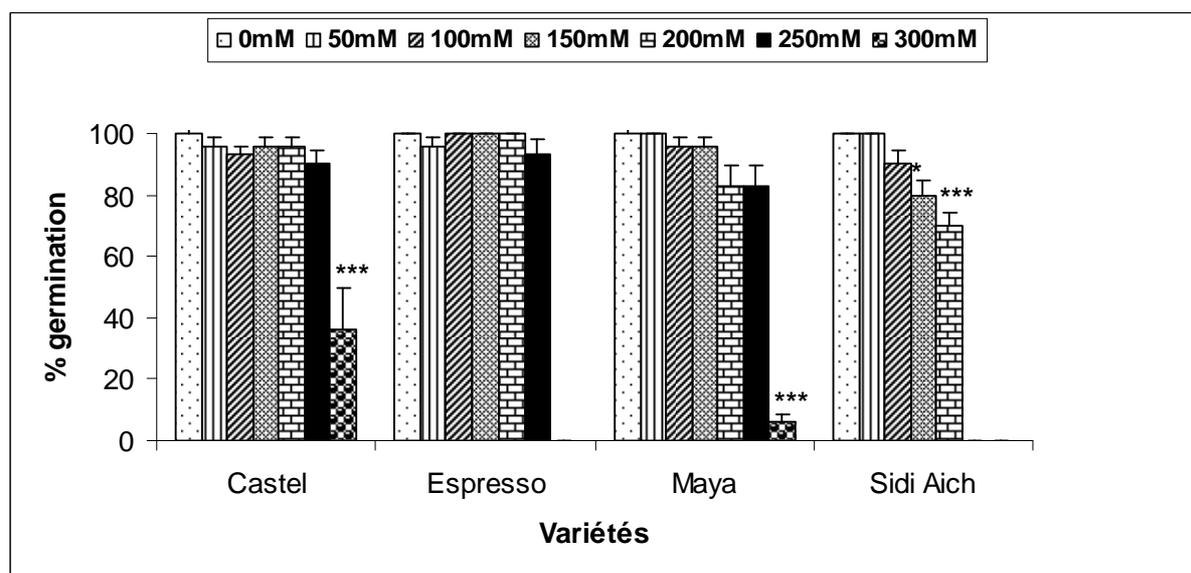


**Figure 5 : Effet de différentes concentrations de NaCl (0, 50, 100, 150, 200, 250 et 300 mM) sur la cinétique de germination des graines de 4 variétés de féverole durant 7 jours.** A: Castel, B : Espresso, C : Maya, D : Sidi Aich. Chaque point représente la moyenne de 3 répétitions.

Le stress salin provoque des baisses très hautement significatives ( $p \leq 0,001$ ) du pourcentage de germination cumulé, les différences entre variétés pour ce paramètre sont également très hautement significatives mais l'interaction variété x traitement salin n'est pas significative ( $p > 0,05$ ) (Annexe, Tab.1).

### 3.1.2. Taux de germination final

Les résultats portés sur la figure 6 présente la réponse de la germination des différentes variétés au stress salin. Ainsi, la salinité n'a pas affecté la faculté germinative des variétés Castel, Maya et Espresso, aucune différence significative ( $p \leq 0,05$ ) n'est observée entre le témoin et les stressées. Le taux de germination enregistré en présence de 250 mM est de 93 %, 90 % et 83 % respectivement pour les variétés Espresso, Castel et Maya (Fig.6).



**Figure 6 : Effet de différentes concentrations de NaCl (0, 50, 100, 150, 200, 250 et 300 mM) sur le taux de germination final (7<sup>ème</sup> jour) des graines de 4 variétés de féverole.** Chaque point représente la moyenne de 3 répétitions. Les barres verticales (barre d'erreur) représentent les ESM.

Pour la variété Sidi Aich, la faculté germinative est maximale (100 %) pour le témoin et en présence de 50mM et 100mM NaCl, alors qu'à partir de 150 mM NaCl, le pourcentage de germination est réduit d'une façon significative ( $p \leq 0,05$ ) pour atteindre 80%. Le maximum de réduction est observé en présence de 200 mM NaCl, un taux de germination de 70% a été enregistré (Fig. 6).

## **Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

---

Les résultats obtenus pour la capacité germinative (Fig. 6), indiquent que les graines des variétés Espresso, Maya et Castel, n'ont pas été affectées par le stress salin à des concentrations inférieures et égales à 250 mM NaCl. En revanche, la concentration 300 mM a fortement réduit le taux final de germination, il est seulement de 4% chez la variété Maya, il ne dépasse pas les 40% chez la variété Castel et il est nul chez la variété Espresso.

Cependant, la variété Sidi Aich s'est montrée plus sensible au sel que les autres variétés et ce à partir de 150 mM NaCl. Sa faculté germinative diminue en effet, avec l'augmentation de la concentration saline pour s'annuler à des concentrations  $\geq 250$  mM NaCl (Fig. 6).

Selon le taux de germination final des 4 variétés soumises à des concentrations de 200 mM NaCl, nous pouvons classer ces dernières en deux groupes :

- le premier groupe constitué des variétés Espresso, Castel et Maya moins affectées par le sel, caractérisées par des taux de germination élevés (respectivement 100%, 96% et 83%) ;
- le deuxième groupe composé de la variété Sidi Aich, plus sensible au sel, enregistre un taux de germination de 70%.

### **3.1.3. Vitesse de germination**

La vitesse de germination est exprimée par la durée médiane ( $t_{50}$ ), temps moyen correspondant à la germination de 50% du lot de graines. Pour l'ensemble des variétés, l'effet de NaCl se traduit par une augmentation du  $t_{50}$  (Fig. 7). Pour les témoins et les graines soumises à une concentration saline de 50 mM NaCl, le  $t_{50}$  est faible, il ne dépasse pas les 2 jours.

Pour des concentrations de 100 mM et de 150 mM, le  $t_{50}$  des variétés Castel, Maya et Espresso ne dépasse pas les 3 jours, sauf pour la variété Sidi Aich qui enregistre un  $t_{50}$  de 4 jours pour 150 mM. Le  $t_{50}$  augmente de façon considérable chez la variété Sidi Aich pour atteindre 7 jours dans le milieu enrichi de 200 mM NaCl, alors qu'il ne dépasse pas les 4 jours chez les autres variétés (Fig. 7).

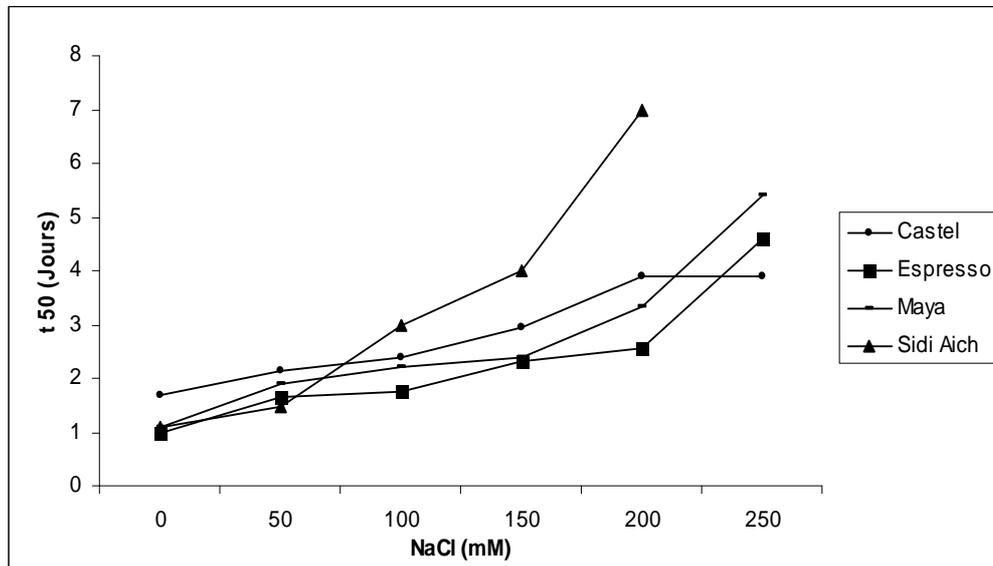
En présence de 250 mM, la vitesse de germination des variétés Castel et Espresso demeure toutefois la plus basse avec un  $t_{50}$  de 4 jours, tandis qu'il est de 5 jours pour la variété Maya.

Selon le  $t_{50}$  des 4 variétés soumises à des concentrations de 200 mM NaCl, nous pouvons classer ces dernières en deux groupes :

- le premier groupe constitué des variétés Castel, Maya et Espresso moins sensibles au sel présentant une vitesse de germination élevée avec un  $t_{50} < 4$  jours.

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

-le deuxième groupe composé de la variété Sidi Aich plus sensible au sel caractérisée par une vitesse de germination lente avec un  $t_{50}$  atteignant 7 jours.



**Figure 7 : Effets de différentes concentrations de NaCl (0 à 250 mM) sur le temps moyen de germination ( $t_{50}$ ) des graines de 4 variétés de féverole.**

### Discussion

La germination est une étape critique dans le cycle de développement de la plante. Elle conditionne l'installation de la plantule, sa fixation sur le milieu, et probablement sa productivité ultérieure (Tremblin, 1984).

Les résultats obtenus montrent que les quatre variétés testées ont atteint leur germination maximale dans le milieu sans sel et dans des milieux enrichis de 50 mM, 100 mM, et 150 mM NaCl, avec des taux avoisinant les 100%. Lorsque la concentration en sel augmente (200 mM) une diminution des taux de graines germées se produit uniquement chez la variété Sidi Aich. Alors qu'une forte concentration de 300 mM NaCl engendre une forte diminution des graines germées chez les variétés Maya et Castel et une inhibition totale chez la variété Espresso.

Des résultats similaires ont été signalés sur des graines de *Vicia faba* par d'autres auteurs. En effet, Abdul Qados et Moftah (2015) ont observé une diminution du taux de germination de 72% en présence de 200 mM NaCl, alors qu'aucune germination n'a été relevée par Younis et Tourky (2014) en présence de 300 mM (NaCl).

La réduction du taux de germination final peut être expliquée par l'incapacité des graines à absorber, en présence de fortes concentrations de sel, des quantités d'eau suffisantes et

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

---

nécessaires au déclenchement du processus de germination. La difficulté d'absorption d'eau résulte de l'augmentation de la pression osmotique externe qui réduit la disponibilité d'eau pour les semences (Khan et Weber, 2008). À cet effet, s'ajoute une accumulation des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  dans l'embryon qui peut conduire à l'altération des processus métaboliques de la germination et dans le cas extrême à la mort de l'embryon (Khan et Ungar, 1997).

La sensibilité au sel des graines pendant la germination pourrait également trouver son explication dans l'augmentation du taux des acides organiques tels que le citrate, le succinate et le malate. Cette accumulation des acides est accompagnée d'une chute de pH du cytosol, ce qui pourrait affecter les activités enzymatiques (Bourgeois-Chaillou et Guerrier, 1992). Cette toxicité se manifeste également par un déséquilibre minéral en faveur d'une charge importante de  $\text{Na}^+$  qui stimule le métabolisme de l'ABA dont le rôle est de limiter l'absorption d'eau et d'inhiber la synthèse d'enzymes spécifiques de la germination (Heller *et al.*, 1977).

L'évolution du taux de germination des quatre variétés en fonction des différentes concentrations en sel et du temps (Fig.5), ont permis de distinguer 3 phases :

- Une phase d'imbibition, nécessaire à l'apparition des premières germinations. La durée de cette phase varie selon la concentration de NaCl ; elle est courte, voire absente chez les graines témoins ;
- Une phase exponentielle, correspondant à une augmentation rapide du taux de germination qui évolue proportionnellement avec le temps ;
- Une troisième phase correspondant à un plateau représentant le pourcentage final de germination et traduisant la capacité de germination de chaque variété pour chaque concentration.

En effet, les précédents résultats montrent que dans notre cas, les graines des variétés étudiées accusent un retard dans l'initiation du processus de germination à partir de 50 mM NaCl (Fig. 5). Ce retard peut être expliqué d'une part, par le temps nécessaire à la graine pour ajuster sa pression osmotique interne et d'autre part, par la réduction progressive de la conductivité de l'eau dans le substrat, altérant l'activité des enzymes alpha et bêta amylase responsables de l'hydrolyse de l'amidon, et de la libération de l'ATP utilisé pour la percée de la radicule (Al Sherif, 2009).

Des résultats similaires ont été obtenus par Lombardi et Lupi (2006) sur *Hordeum secalinum*, qui enregistrent après 10 jours de germination, en présence de 400 mM NaCl, un taux de germination de 55%.

## **Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

---

Ce retard dans la germination peut avoir des répercussions ultérieures préjudiciables au développement de la plante. Par exemple, la conjonction, après le semis, d'un manque de pluie et d'un vent desséchant, provoquent la formation d'une croûte à la surface du sol. Les plantules, dont la germination a été retardée par le sel, risquent alors d'être prises dans la croûte qui s'est formée entretemps (Marlet et Job, 2006).

Nos résultats indiquent que les graines des variétés Castel, Maya et Espresso, sont moins sensibles au sel que la variété Sidi Aich (Fig. 6). Cette tolérance pourrait être due au faible prélèvement de NaCl par les semences et donc par la faible concentration de sel dans l'embryon (Smith et Comb, 1991).

La tolérance de nos graines au sel pourrait être liée également à la morphologie et au poids des semences (Westoby, 2000). En effet, les graines des variétés Espresso, Maya et Castel présentent un poids de 100 graines respectivement de 56g, 58g et 65g sont moins sensibles à la salinité que les graines de la variété Sidi Aich (51g) (Tab.2). Des résultats semblables ont été trouvés par Easton et Kleidorfer (2009), en étudiant la germination de quelques espèces de *Frankenia* en présence de sel. Ces auteurs ont montré que, le poids de 100 graines, constituait un caractère pouvant permettre une meilleure tolérance des graines au stress salin.

Les résultats de la germination ne suffisent pas à établir un classement de la réponse des variétés étudiées vis-à-vis de la salinité. Maas (1996), a rapporté que la plupart des cultures sont tolérantes à la salinité durant la germination, mais sensibles pendant la croissance et redeviennent plus tolérantes aux stades finaux de croissance. D'autres suggèrent que les graines qui présentent une aptitude à germer sous des conditions de salinité auraient des prédispositions à tolérer ce stress au cours de leur croissance ultérieure (Rozema, 1975).

Afin de confirmer les résultats obtenus lors de la germination, nous avons étudié par la suite, la réponse de nos variétés, aux différentes concentrations de sel durant le stade de croissance végétative.

### **3.2. Effet du stress salin sur la croissance, la symbiose et le rendement des quatre variétés de féverole**

#### **3.2.1. Caractères morphologiques**

##### ***- Hauteur de la tige***

Les résultats obtenus montrent que la hauteur des tiges diminue pour les quatre variétés avec l'augmentation du degré de salinité (Tab.3). Ces résultats mettent en évidence une variabilité de réponse en présence de sel chez les quatre variétés de féverole étudiées.

À 50mM NaCl, la variété Sidi Aich semble être la moins affectée, avec une diminution de 19% par rapport au témoin, alors que les autres variétés enregistrent des réductions de 23%, 25% et 30% respectivement chez Castel, Espresso et Maya.

En présence de 100 mM NaCl, les variétés Maya et Espresso sont les plus affectées, car la hauteur de leur tige a baissé respectivement de 47,56% et 49% par rapport au témoin alors que les variétés Castel et Sidi Aich moins sensibles enregistrent respectivement une baisse de 34% et 36 %. Cependant, il n'existe aucune différence significative entre le traitement 75 et 100 mM NaCl pour toutes les variétés.

Le stress salin provoque des baisses très hautement significatives ( $p \leq 0,001$ ) de la hauteur de la tige, les différences entre variétés pour ce paramètre sont également très hautement significatives mais l'interaction variété x traitement salin n'est pas significative ( $p > 0,05$ ) (Annexe, Tab.2).

**Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

**Tableau 3. Effets du traitement salin sur la hauteur de la tige (HAT), surface foliaire (SF), nombre de feuilles/plant et nombre de ramifications/plant des quatre variétés de féverole.**

Variétés	NaCl (mM)	HAT (cm)	SF (cm <sup>2</sup> )	Nombre de feuilles/plant	Nombre de ramification/plant
<b>Castel</b>	0	44,6 ± 2.08 <sup>a</sup>	35,8 ± 3.37 <sup>a</sup>	45,6 ± 4.82 <sup>a</sup>	4,8 ± 0.58 <sup>a</sup>
	50	34,2 ± 3.83 <sup>b</sup>	22,8 ± 3.15 <sup>b</sup>	42,4 ± 4.95 <sup>a</sup>	2,8 ± 0.31 <sup>b</sup>
	75	29,8 ± 3.16 <sup>c</sup>	16,6 ± 2.74 <sup>bc</sup>	38,80 ± 4.65 <sup>a</sup>	2,6 ± 0.63 <sup>b</sup>
	100	29,2 ± 2.95 <sup>c</sup>	13 ± 1.76 <sup>c</sup>	28 ± 4.34 <sup>b</sup>	2,0 ± 0 <sup>b</sup>
<b>Espresso</b>	0	50,4 ± 3.48 <sup>a</sup>	38,8 ± 2.88 <sup>a</sup>	44,4 ± 4.29 <sup>a</sup>	3,0 ± 0.49 <sup>a</sup>
	50	37,8 ± 1.24 <sup>b</sup>	14,2 ± 1.15 <sup>b</sup>	30,4 ± 3.14 <sup>b</sup>	1,4 ± 0.63 <sup>b</sup>
	75	30,8 ± 5.28 <sup>c</sup>	12,2 ± 1.85 <sup>bc</sup>	27 ± 4.09 <sup>b</sup>	1,8 ± 0.58 <sup>b</sup>
	100	25,6 ± 1.74 <sup>c</sup>	9,8 ± 1.88 <sup>c</sup>	25,4 ± 3.34 <sup>b</sup>	1,2 ± 0.58 <sup>b</sup>
<b>Maya</b>	0	57,6 ± 1.63 <sup>a</sup>	59 ± 7.19 <sup>a</sup>	34,6 ± 4.63 <sup>a</sup>	2,2 ± 0.31 <sup>a</sup>
	50	40 ± 2.66 <sup>b</sup>	23,6 ± 1.12 <sup>b</sup>	18,6 ± 3.86 <sup>b</sup>	0,6 ± 0.63 <sup>b</sup>
	75	37 ± 1.41 <sup>c</sup>	19,8 ± 2.08 <sup>bc</sup>	19,6 ± 4.38 <sup>b</sup>	0,2 ± 0.31 <sup>b</sup>
	100	30,2 ± 1.62 <sup>c</sup>	15 ± 2.25 <sup>c</sup>	18 ± 3.97 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>
<b>SidiAich</b>	0	66,2 ± 4.63 <sup>a</sup>	27,8 ± 1.11 <sup>a</sup>	43,6 ± 6.04 <sup>a</sup>	3,2 ± 0.77 <sup>a</sup>
	50	53,2 ± 2.41 <sup>b</sup>	17,6 ± 2.13 <sup>b</sup>	41,6 ± 8.24 <sup>a</sup>	1,6 ± 0.38 <sup>b</sup>
	75	42,6 ± 1.59 <sup>c</sup>	11,4 ± 1.69 <sup>bc</sup>	32,2 ± 3.65 <sup>b</sup>	2,0 ± 0 <sup>b</sup>
	100	41,8 ± 1.11 <sup>c</sup>	9,6 ± 1.28 <sup>c</sup>	33,6 ± 9 <sup>b</sup>	1,4 ± 0.38 <sup>b</sup>

Les résultats sont représentés par les valeurs moyennes ± l'ESM. Les valeurs sur la même colonne pour chaque variété, suivies de la même lettre ne sont pas différentes significativement ( $p < 0,05$ ).

**- Surface foliaire**

La variation de la surface foliaire consignée dans le tableau 3 montre que cette dernière est également sensible au stress salin, elle diminue significativement pour les quatre variétés avec l'augmentation du degré de salinité.

En condition de stress salin (50 mM NaCl), la réduction de la surface foliaire des variétés Castel et Sidi Aich est inférieure à 37% par rapport aux témoins respectifs. À l'opposé, les variétés Espresso et Maya affichent respectivement des taux de réduction de 60% et 63%.

À 75mM NaCl, les deux variétés Castel et Sidi Aich voient leur surface foliaire baisser de plus de 50% par rapport au témoin ; elles enregistrent respectivement des réductions de 53% et 59%. Cette baisse de la surface foliaire s'accroît à 100 mM NaCl, pour atteindre des taux

## **Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

---

de réduction de 63% et 65% respectivement chez les variétés Castel et Sidi Aich, et une réduction de 74% chez les variétés Espresso et Maya.

L'analyse de la variance a montré un effet très hautement significatif du sel ( $p \leq 0,001$ ) sur la surface foliaire, les différences entre variétés et l'interaction variété x salinité sont très hautement significatives (Annexe, Tab.3).

### ***- Nombre de feuilles et ramifications***

Les résultats présentés dans le tableau 3 montrent que la concentration 50 mM NaCl n'a pas affectée le nombre de feuilles des variétés Sidi Aich et Castel, aucune diminution significative n'a été observée par rapport aux témoins respectifs. La diminution du nombre de feuilles des variétés Espresso et Maya, ne présentent pas de différences significatives avec les traitements 50 mM, 75 mM et 100mM ; elles enregistrent respectivement à 100 mM NaCl des taux de réduction maximale de 42,79% et 47,97% par rapport au témoin. Quant à la variété Sidi Aich, elle réagit de la même manière en présence de 75 et 100 mM NaCl, avec une réduction de seulement 23% par rapport au témoin.

Des résultats obtenus, nous constatons que chez la variété Castel, l'effet du sel ne se fait sentir qu'à partir de 100 mM NaCl, où elle enregistre une baisse de 38,5% par rapport au témoin.

Tous traitements confondus, ce sont les variétés Castel et Sidi Aich qui ont formé le plus grand nombre de feuilles (38,7 et 37,75 feuilles/plant respectivement) suivie de la variété Espresso avec 31,8 feuilles/plant et en dernière position la variété Maya avec 22,7 feuilles/plant.

Le stress salin entraîne également une diminution significative du nombre de ramifications chez les quatre variétés étudiées comparativement au témoin. Les réductions observées chez les variétés Sidi Aich, Castel Espresso et Maya ne présentent pas de différences significatives avec les traitements (50, 75 et 100 mM NaCl) elles enregistrent à 100 mM NaCl des baisses maximales de 56%, 58%, 60% et 100% par rapport aux témoins respectifs. Tous traitements confondus, c'est la variété Castel qui a formé en moyenne le plus grand nombre de ramifications (3,05 rameaux/plant) suivie des variétés Sidi Aich et Espresso (2,05 et 1,85 rameaux /plant respectivement) et en dernière position la variété Maya avec seulement 0,75 rameau/plant.

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

L'analyse de la variance a montré un effet très hautement significatif ( $P \leq 0,001$ ) du sel sur le nombre de feuilles et de ramifications par plant, les différences entre variétés pour ce paramètre sont très hautement significatives. Cependant, l'interaction variété x salinité n'est pas significative ( $p \geq 0,05$ ) (Annexe, Tab.4).

### - Biomasse aérienne et racinaire

Les résultats obtenus mettent en évidence une variabilité de réponse en présence et en l'absence de sel chez les quatre variétés de féverole étudiées (Tab.4).

**Tableau 4. Effet du traitement salin sur le poids sec de la partie aérienne (PA), partie racinaire (PR), poids total de la plante (PT), le rapport partie racine-partie aérienne (PR/PA) et l'indice de sensibilité relative au sel (I.S.R.S) des quatre variétés de féverole.**

Variétés	NaCl (mM)	PA (g/plant)	PR (g/plant)	P TOT (g/plant)	PR /PA	I.S.R.S
Castel	0	26,36±1,56 <sup>a</sup>	6,22±0,56 <sup>a</sup>	32,58±1,40 <sup>a</sup>	0,23±0,03 <sup>c</sup>	
	50	8,08±0,7 <sup>b</sup>	3,76±0,14 <sup>b</sup>	11,85±0,77 <sup>b</sup>	0,47±0,04 <sup>b</sup>	1,12
	75	4,42±0,34 <sup>c</sup>	3,05±0,30 <sup>b</sup>	7,48±0,51 <sup>c</sup>	0,7±0,08 <sup>a</sup>	1,14
	100	3,35±0,25 <sup>d</sup>	1,63±0,13 <sup>c</sup>	4,98±0,33 <sup>c</sup>	0,49±0,04 <sup>b</sup>	1,13
Espresso	0	14,54±0,43 <sup>a</sup>	6,24±0,45 <sup>a</sup>	20,78±0,85 <sup>a</sup>	0,42±0,01 <sup>b</sup>	
	50	7,43±0,56 <sup>b</sup>	5,43±0,44 <sup>a</sup>	12,87±0,80 <sup>b</sup>	0,73±0,07 <sup>a</sup>	0,67
	75	5,47±0,23 <sup>c</sup>	4,67±0,30 <sup>ab</sup>	10,14±0,43 <sup>c</sup>	0,85±0,05 <sup>a</sup>	0,76
	100	4,57±0,16 <sup>c</sup>	4,06±0,49 <sup>b</sup>	8,63±0,46 <sup>c</sup>	0,89±0,13 <sup>a</sup>	0,79
Maya	0	24,11±2,20 <sup>a</sup>	8,33±0,33 <sup>a</sup>	32,45±2,28 <sup>a</sup>	0,35±0,04 <sup>c</sup>	
	50	5,9±0,26 <sup>b</sup>	3,23±0,42 <sup>b</sup>	9,13±0,51 <sup>b</sup>	0,54±0,07 <sup>b</sup>	1,28
	75	3,96±0,46 <sup>b</sup>	2,84±0,12 <sup>bc</sup>	6,8±0,57 <sup>bc</sup>	0,74±0,06 <sup>a</sup>	1,17
	100	3,17±0,29 <sup>c</sup>	2,22±0,16 <sup>bc</sup>	5,4±0,38 <sup>bc</sup>	0,71±0,05 <sup>b</sup>	1,12
Sidi Aich	0	13,11±0,27 <sup>a</sup>	5,01±0,26 <sup>a</sup>	18,12±0,34 <sup>a</sup>	0,37±0,02 <sup>a</sup>	
	50	8,53±0,41 <sup>b</sup>	2,85±0,23 <sup>b</sup>	11,39±0,46 <sup>b</sup>	0,33±0,03 <sup>a</sup>	0,66
	75	6,5±0,40 <sup>c</sup>	2,51±0,29 <sup>b</sup>	9,02±0,48 <sup>c</sup>	0,39±0,05 <sup>a</sup>	0,75
	100	5,48±0,13 <sup>d</sup>	2,38±0,29 <sup>b</sup>	7,87±0,33 <sup>c</sup>	0,43±0,04 <sup>a</sup>	0,76

Les résultats sont représentés par les valeurs moyennes ± l'ESM. Les valeurs sur la même colonne pour chaque variété, suivies de la même lettre ne sont pas différentes significativement ( $p < 0,05$ ).

## **Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

---

En l'absence de sel, les variétés Castel et Maya enregistrent les poids sec totaux les plus élevés, soit 32 g/ plant, tandis que les plus faibles poids sec sont observés chez les variétés Espresso et Sidi Aich avec respectivement 20,78 g/plant et 18,12 g/plant.

L'application d'un stress salin affecte négativement la production des biomasses aériennes et racinaires. Cet effet varie en fonction de la concentration en NaCl et de la variété.

La variabilité de la réponse au sel s'exprime clairement à 50 mM. Cette concentration entraîne une réduction significative de 35 % du poids sec de la partie aérienne et de 43 % des racines chez la variété Sidi Aich, tandis que la variété Maya enregistre une diminution de 75 % et de 61 % respectivement pour la partie aérienne et racinaire. Quant à la variété Castel, une réduction de 69% et 39% respectivement pour la partie aérienne et racinaire, a été notée.

À cette concentration, la biomasse de la partie racinaire de la variété Espresso n'a pas été affectée, aucune réduction significative ( $p \leq 0,05$ ) n'a été observée par rapport au témoin, alors que sa biomasse aérienne a été réduite de 49% par rapport au témoin.

En présence de 75mM NaCl, la variété Sidi Aich voit son poids sec aérien baisser de 50% par rapport au témoin, pour les autres variétés des baisses de 62%, 83,23% et 83,57% ont été notées respectivement chez Espresso, Castel et Maya par rapport aux témoins respectifs.

Cette baisse s'accroît pour le poids sec de la partie aérienne à 100 mM NaCl, pour atteindre des diminutions de 58%, 86% et 87% respectivement chez les variétés Sidi Aich, Maya et Castel. En revanche, la variété Espresso maintient le même taux de réduction (68%) que celui observé à 75 mM NaCl.

Le rapport du poids sec racines / parties aériennes tend à augmenter avec l'augmentation de la contrainte saline chez les variétés Espresso, Castel et Maya en raison d'une plus grande sensibilité de la partie aérienne (Tab. 4). Ainsi, les racines sont moins affectées par le sel que les parties aériennes. En outre, il est à noter que les valeurs de ce rapport concernant la variété Sidi Aich, sont plus proches de celles des plants témoins (Tab.4). Le sel affecte à part égale la partie aérienne et la partie racinaire.

Les résultats de l'indice de sensibilité relative au sel (I.S.R.S) montrent que la sensibilité au sel dépend de la concentration saline et des variétés (Tab .4). En effet, les variétés Espresso et Sidi Aich se comportent de la même manière, leurs indices de sensibilité relative au sel sont plus faibles à 50 mM NaCl, et augmentent pour se stabiliser à une concentration supérieure et

## **Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

---

égale à 75mM NaCl. En revanche, la variété Maya, présente un indice plus élevé dès 50 mM NaCl, alors que chez la variété Castel cet indice est semblable pour les trois concentrations salines.

À 100 mM NaCl, les variétés Espresso et Sidi Aich répondent de la même manière et leurs indices restent inférieurs à 0,8. Ces dernières subissent une diminution de biomasse totale par rapport au témoin ne dépassant pas 59 %. Alors que les variétés Castel et Maya semblent être les plus sensibles, puisqu'elles perdent plus de 86 % de leur biomasse et présentent ainsi, des indices supérieurs à 1,10.

L'analyse de la variance a montré un effet très hautement significatif ( $P \leq 0,001$ ) du sel sur le poids sec de la partie aérienne et de la partie racinaire, sur le poids sec total et sur le rapport partie racinaire/partie aérienne chez les 4 variétés. Les différences entre variétés et l'interaction variété x salinité sont très hautement significatives (Annexe, Tab. 6, 7, 8, 9).

### ***Discussion***

La réponse à la salinité se manifeste généralement chez la plupart des plantes cultivées par un effet dépressif sur la croissance et le développement (Munns *et al.*, 1995).

En effet, nos résultats indiquent que le stress salin entraîne une diminution de la hauteur de la tige, de la surface foliaire, du nombre de feuilles et de ramifications et des biomasses aériennes et racinaires chez les quatre variétés étudiées.

Ces paramètres de croissance ont été affectés pour la plupart des variétés dès la plus faible concentration de sel, 50 mM NaCl, néanmoins une variabilité de réponse en présence de sel chez les quatre variétés a été observée. En outre, il est à noter que la hauteur des tiges, la surface foliaire et le nombre de feuilles des variétés Espresso et Maya sont plus affectés par le sel que ceux des variétés Castel et Sidi Aich.

La réduction de la croissance de l'appareil végétatif observée chez nos variétés pourrait être due à une inhibition de l'élongation de l'axe principal (Maaouia-Houimli *et al.*, 2011) et/ou à une baisse du nombre de divisions cellulaires (Benamar *et al.*, 2009). Parida et Das (2005) considèrent que la réponse immédiate au stress salin est la réduction du taux d'expansion de la surface foliaire jusqu'à sa cessation avec l'augmentation des concentrations de sels. De plus, l'effet du NaCl sur la photosynthèse s'exerce par une baisse de la teneur en chlorophylle, une

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

---

diminution de la surface foliaire, du nombre de feuilles et de la conductance des stomates (Slama, 2004).

La réduction de la croissance peut résulter également de l'augmentation de la concentration en acide abscissique dans la partie aérienne ou d'une réduction des cytokinines (Itai, 1999).

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par de nombreux auteurs. Al Tahir et Abdulsalam (1997) et Bibi *et al.* (2012) sur *Vicia faba* ont montré que le stress salin réduit la hauteur des tiges des plants dès la plus faible concentration.

Le stress salin cause des réductions des poids sec totaux des plantes des quatre variétés testées. Nos résultats indiquent une grande sensibilité au sel des variétés Castel et Maya, elles enregistrent en présence de 100mM NaCl (après 8 semaines de stress) des baisses de poids sec totaux de 84%, tandis que les variétés Sidi Aich et Espresso moins affectées, affichent des baisses inférieures à 60%. Nos résultats rejoignent ceux de Cordovilla *et al.*, (1999) mentionnant à la même concentration des réductions de 65% sur (*Vicia faba. cv. Alborea*) (après 6 semaines de stress), et ceux de Pitann *et al.* (2011) sur (*Vicia faba cv. Scirocco*) qui enregistrent des réductions de 67% après 9 jours d'application de 100 mM NaCl. Ces auteurs expliquent cette réduction des biomasses par le fait que le sel inhibe l'absorption des ions essentiels tels que  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{K}^{+}$  et  $\text{NO}_3^{-}$  ce qui affecte la croissance et le développement des plantes.

La réduction des poids sec de nos variétés en présence de sel pourrait trouver son explication également dans le fait que le NaCl agit par augmentation de la pression osmotique du milieu, ce qui empêche l'absorption de l'eau par le système racinaire (Munns, 2002). Ces conditions de milieu favorisent l'accumulation des sels dans les feuilles qui engendre une toxicité ionique inhibant ainsi le prélèvement et l'assimilation des éléments minéraux (Munns *et al.*, 1995). Au delà d'une certaine intensité de stress les plantes sensibles présentent un flétrissement, un retard voire un arrêt du développement, une chlorose et une sénescence des parties aériennes (Munns, 2005).

Des corrélations hautement significatives et positives ont été obtenues entre la surface foliaire et le poids sec de la partie aérienne, ainsi que le nombre de ramification et le poids sec aérien avec respectivement des valeurs pour Espresso ( $r^2 = 0.89^{**}$ ,  $r^2 = 0.59^{**}$ ), Sidi Aich ( $r^2 = 0.88^{**}$ ,  $r^2 = 0.74^{**}$ ), Maya ( $r^2 = 0.83^{**}$ ,  $r^2 = 0.86^{**}$ ) et Castel ( $r^2 = 0.79^{**}$ ,  $r^2 = 0.85^{**}$ ). Ces corrélations positives confirment d'une part l'étroite relation qui existe entre la surface foliaire et le nombre de ramification avec la production de biomasse et d'autre part confirme

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

---

aussi que le sel a réduit la surface active pour la photosynthèse et provoqué une réduction de la croissance (Slama, 2004).

Des résultats obtenus, nous pouvons constater que les variétés ayant un faible poids sec en l'absence de sel sont les moins sensibles aux traitements salins (Tab.4), résultats identiques à ceux rapportés dans la littérature par Saadallah *et al.* (2001) sur certaines lignées de haricot, par Tejera *et al.* (2005) sur des cultivars de pois chiche et par Maaouia-Houimli *et al.*, 2011 sur trois cultivars de piment.

Nos résultats montrent que le rapport du poids sec racines / parties aériennes tend à augmenter avec l'augmentation de la contrainte saline, chez les variétés Castel, Maya et Espresso. Ce résultat laisse indiquer que les biomasses aériennes sont plus affectées par le sel que les biomasses racinaires. Néanmoins, chez la variété Sidi Aich ce rapport est similaire à celui des plants témoins, indiquant ainsi que le sel a affecté à part égale les deux parties de la plante. Ce résultat est identique à celui observé par plusieurs auteurs sur *Vicia faba* (Delgado *et al.*, 1994 ; Al-Tahir et Abduslam, 1997 ; Cordovilla *et al.*, 1999 ; Gaballah et Gomma, 2005 ; Bibi *et al.*, 2012), et sur *Cicer arietinum* (Tejera *et al.*, 2005).

Cette différence de sensibilité entre les organes d'absorption et les organes photosynthétiques est caractéristique des glycophytes (Bernstein *et al.*, 1993). Elle trouverait son explication dans le fait que la plante dépense plus d'énergie photosynthétique sous contrainte saline, pour maintenir un statut hydrique élevé et pour la production de racines en vue de la recherche d'eau et/ou la réduction de la perte d'eau (Zaman-Allah *et al.*, 2008).

Zhu (2001), suggère que la réduction de croissance des parties aériennes est une capacité adaptative nécessaire à la survie des plantes exposées à un stress abiotique. En effet, le retard de développement permet à la plante d'accumuler de l'énergie et des ressources pour faire face au stress avant que le déséquilibre entre l'extérieur et l'intérieur de l'organisme n'augmente jusqu'à un seuil où les dommages sont irréversibles (Zhu, 2001).

Les résultats de l'indice de sensibilité relative au sel ( Tab.4) a fait ressortir deux groupes de variétés, le premier composé des variétés Espresso et Sidi Aich moins affectées par le sel présentant un indice de sensibilité inférieur à 0.8, le deuxième groupe constitué de variétés Castel et Maya plus sensibles au sel affichant un indice de sensibilité supérieur à 1.10. Ce résultat est justifié par la grande réduction de la biomasse totale de ces variétés sous contrainte saline.

### **3.2.2. Caractères physiologiques et biochimiques**

#### **-Pigments photosynthétiques**

Les résultats de l'évolution des teneurs en pigments photosynthétiques (chlorophylle *a*, chlorophylle *b*, chlorophylle totale et caroténoïdes), des quatre variétés sont consignés dans le tableau 5.

#### **-Chlorophylle *a***

Le sel provoque une diminution significative des teneurs en chlorophylle *a*, chez les quatre variétés testées (Tab.5). Les réductions enregistrées respectivement chez les variétés Sidi Aich, Espresso et Castel en présence de 100 mM NaCl sont de 44%, 45% et 56% par rapport aux témoins respectifs. Ces taux de réductions ne présentent pas de différence significative ( $p \geq 0,05$ ) avec 50 mM, 75 mM et 100 mM NaCl. En revanche, la variété Maya, plus affectée par le sel, voit baisser sa teneur en chlorophylle *a* de 36% à 70% par rapport au témoin en présence respectivement de 50 mM et d'une concentration supérieure et égale à 75 mM NaCl. Nos résultats indiquent que les teneurs en chlorophylle *a* de la variété Maya en présence de 75 et 100 mM NaCl, ne présentent pas de différence significative.

#### **-Chlorophylle *b***

La présence de sel dans le milieu engendre également des baisses significatives des teneurs en chlorophylle *b* chez toutes les variétés (Tab.5). Les résultats obtenus indiquent que l'évolution des teneurs en chlorophylle *b* en présence de sel est comparable à celle de la chlorophylle *a*. En revanche, aucune différence significative n'a été observée entre les variétés.

Les taux de réductions maximales des teneurs en chlorophylle *b* en présence de 100 mM NaCl sont de 47%, 48%, 60% et 61% respectivement chez Espresso, Sidi Aich, Maya et Castel.

#### **-Chlorophylle totale (chlorophylle *a* + chlorophylle *b*)**

Les teneurs en chlorophylle totale des quatre variétés étudiées sont réduites de manière significative sous l'effet de la contrainte saline (Tab.5). En effet, les variétés Sidi Aich, Espresso et Castel, affichent respectivement des réductions maximales à 100mM NaCl de 45%, 46% et 57% par rapport aux témoins respectifs. La variété Maya s'avère être la plus

**Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

affectée, à des concentrations supérieures et égales à 75 mM NaCl, elle montre la plus grande baisse (68%) des teneurs en chlorophylle totale par rapport au témoin.

**Tableau 5. Effet du traitement salin sur les teneurs foliaires en pigments chlorophylliens (Chl *a*, Chl *b*), chlorophylle totale (Chl *a+b*) et en caroténoïdes (Carot) en µg /g de MF, des quatre variétés de féverole.**

Variétés	NaCl (mM)	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl totale	Carot
<b>Castel</b>	0	12.45±0.93 <sup>a</sup>	4.75±0.26 <sup>a</sup>	17.21±1.16 <sup>a</sup>	2.98±1.16 <sup>a</sup>
	50	6.56±0.98 <sup>b</sup>	2.83±0.49 <sup>b</sup>	9.41±0.93 <sup>b</sup>	1.63±0.93 <sup>b</sup>
	75	6.86±0.63 <sup>b</sup>	2.36±0.22 <sup>b</sup>	9.23±0.84 <sup>b</sup>	1.66±0.84 <sup>b</sup>
	100	5.4±0.67 <sup>b</sup>	1.83±0.26 <sup>bc</sup>	7.23±0.93 <sup>b</sup>	1.43±0.93 <sup>b</sup>
<b>Espresso</b>	0	9.02±1.25 <sup>a</sup>	3.69±0.08 <sup>a</sup>	12.72±1.56 <sup>a</sup>	2.51±1.56 <sup>a</sup>
	50	6.32±0.76 <sup>b</sup>	2.42±0.40 <sup>b</sup>	8.74±1.52 <sup>b</sup>	1.74±1.52 <sup>b</sup>
	75	4.41±0.51 <sup>b</sup>	2.13±0.35 <sup>b</sup>	6.54±0.22 <sup>b</sup>	0.95±0.22 <sup>bc</sup>
	100	4.95±1.07 <sup>b</sup>	1.94±0.22 <sup>b</sup>	6.89±0.89 <sup>b</sup>	1.18±0.89 <sup>bc</sup>
<b>Maya</b>	0	10.76±0.26 <sup>a</sup>	4.53±0.31 <sup>a</sup>	15.28±0.31 <sup>a</sup>	2.43±0.31 <sup>a</sup>
	50	6.81±0.98 <sup>b</sup>	3.37±0.26 <sup>b</sup>	10.18±0.98 <sup>b</sup>	1.52±0.31 <sup>b</sup>
	75	3.16±0.18 <sup>c</sup>	1.85±0.22 <sup>c</sup>	5.01±0.58 <sup>c</sup>	1.60±0.98 <sup>b</sup>
	100	3.18±0.67 <sup>c</sup>	1.78±0.40 <sup>c</sup>	4.96±1.34 <sup>c</sup>	1.45±0.58 <sup>b</sup>
<b>Sidi Aich</b>	0	10.02±1.20 <sup>a</sup>	4.02±0.26 <sup>a</sup>	14.04±1.43 <sup>a</sup>	2.52±1.43 <sup>a</sup>
	50	6.85±0.71 <sup>b</sup>	2.58±0.17 <sup>b</sup>	9.43±0.93 <sup>b</sup>	1.76±0.93 <sup>b</sup>
	75	5.95±1.05 <sup>b</sup>	2.21±0.44 <sup>b</sup>	8.11±1.47 <sup>b</sup>	1.60±1.47 <sup>b</sup>
	100	5.57±0.80 <sup>b</sup>	2.08±0.17 <sup>b</sup>	7.65±0.93 <sup>b</sup>	1.46±0.93 <sup>b</sup>

Les résultats sont représentés par les valeurs moyennes ± l'ESM. Les valeurs sur la même colonne pour chaque variété, suivies par la même lettre ne sont pas différentes significativement ( $p < 0.05$ ).

**- Caroténoïdes**

L'effet du sel s'est traduit également par une baisse significative des teneurs en caroténoïdes chez les quatre variétés (Tab.5). Les variétés Maya et Sidi Aich semblent être moins affectées par le sel, elles enregistrent respectivement des réductions de l'ordre de 40% et 42%. Par contre, les variétés Castel et Espresso accusent les plus grandes baisses des teneurs en caroténoïdes, 52% et 62% respectivement.

Hormis les teneurs en caroténoïdes de la variété Espresso qui présentent une différence significative entre le traitement 50 mM et le traitement 75 mM NaCl ; pour les autres variétés aucune différence significative n'a été observée avec les trois concentrations salines. Par contre, l'effet variété montre une différence significative.

## **Discussion**

L'analyse de la variance montre que la présence de NaCl dans le milieu entraîne une baisse très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) des teneurs en chlorophylle *a*, en chlorophylle *b*, en chlorophylle totale et en carétonoïdes. L'effet variété est significatif ( $P \leq 0,05$ ) sauf dans le cas de la chlorophylle *b*, mais l'interaction variété x salinité n'est pas significative (Annexe, Tab.10, 11, 12, 13).

En effet, pour les chlorophylles totales, c'est la variété Maya qui semble être la plus affectée avec une réduction de 68%. Par ailleurs, pour les caroténoïdes, ce sont les variétés Castel et Espresso qui se sont montrées les plus sensibles, avec une baisse de 52% et 62% respectivement.

Les réductions des teneurs en chlorophylle observées chez nos variétés stressées par le sel pourraient être dues à l'effet inhibiteur des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  sur la structure des chloroplastes et par conséquent sur la biosynthèse des différents pigments (Mane *et al.*, 2010). En effet, en présence de fortes concentrations de sel, des symptômes de jaunissement, de chlorose et de nécroses allant jusqu'à la mort des feuilles âgées ont été observés chez les quatre variétés. Ce jaunissement résulte des dommages causés sur les pigments chlorophylliens entraînant la diminution des teneurs en pigments (Dajic, 2006).

Ces symptômes déjà observés par Slabu *et al.* (2009), sur des feuilles de *Vicia faba* L. cv Troy seraient dus à une toxicité des ions  $\text{Cl}^-$  accumulés à des niveaux excédant la capacité de compartimentation dans la vacuole. La diminution des teneurs en chlorophylle totale sous l'effet du sel a été citée dans la littérature par plusieurs auteurs chez différentes espèces végétales, notamment chez *Cicer arietinum* (Garg et Singla (2004), *Triticum durum* (Iqbal *et al.*, 2006), *Vigna unguiculata* (Taffouo *et al.*, 2009) et *Medicago ciliaris* (Ben Salah *et al.*, 2011).

La baisse des teneurs en pigments chlorophylliens de nos variétés sous l'effet du stress salin peut trouver également son explication dans l'augmentation de l'activité de la chlorophyllase (Garg et Singla, 2004) et/ou dans la détérioration de la membrane thylakoïdale, liée à un changement de la composition ionique de l'espace stromatique (Al-Sobhi *et al.*, 2006 ; Mane *et al.*, 2010). La présence de sel dans le milieu peut également augmenter le taux de production de l'éthylène inhibant ainsi la biosynthèse des pigments chlorophylliens (Khan, 2003). Parallèlement, une diminution des teneurs en caroténoïdes a été observée chez les

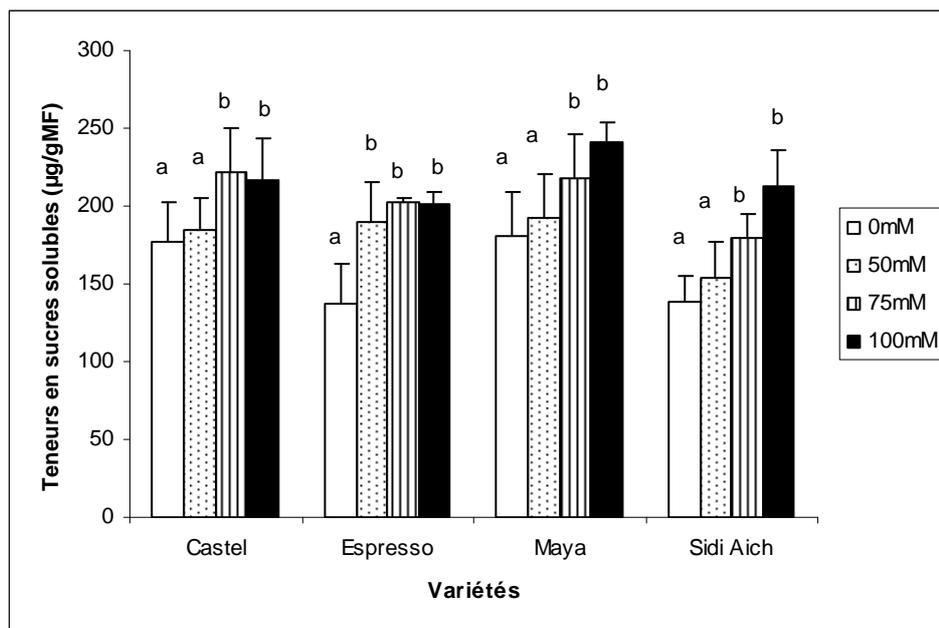
## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

quatre variétés étudiées. El-Tayeb (2006) suggère que l'altération de ces pigments pourrait être liée à leur photoinhibition et photodestruction.

Nos résultats corroborent ceux obtenus par d'autres travaux portant sur différents cultivars du genre *Vicia faba*. En effet, Abdul-Qados (2011) a noté chez *Vicia faba* cv Reina mora une diminution des teneurs en chlorophylle *a*, chlorophylle *b*, chlorophylle totale et en caroténoïdes. Mêmes constatations sur *Vicia faba* cv Giza 2 (El Sayed, 2011) et sur *Vicia faba* cv Sakha (Hassanein *et al.*, 2012). Ces réductions pourraient être dues également à l'instabilité du complexe protéique, du fait que la salinité affecte les forces de liaisons du complexe protéine-pigment (Levitt, 1980).

### - Accumulation des sucres solubles

La figure 8 présente l'influence du stress salin sur l'accumulation des sucres solubles dans les feuilles des quatre variétés.



**Figure 8 : Variation des teneurs en sucres solubles dans les feuilles de 4 variétés de féveroles soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl).** Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions. Les barres verticales (barre d'erreur) représentent les ESM. Pour chaque variété, les histogrammes suivies de la même lettre ne sont pas différents significativement ( $p < 0,05$ ).

L'allure générale des histogrammes montre que chez les 4 variétés étudiées, les teneurs en sucres solubles foliaire augmentent en présence de sel (Fig.8). Cette augmentation est significative à partir de 75 mM NaCl. Cependant, les différences entre variétés et l'interaction salinité x variété ne sont pas significatives.

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

---

Les teneurs en sucres solubles accumulées en présence de 75 mM NaCl et 100 mM NaCl ne présentent pas de différence significative ( $p < 0,05$ ) (Annexe, Tab.14).

Les quatre variétés ont enregistrées à 100Mm NaCl des augmentations de 20%, 24%, 32% et de 34% respectivement chez les variétés Castel, Maya, Espresso et Sidi Aich par rapport aux témoins.

### Discussion

L'accumulation des sucres solubles chez les plantes a été largement rapportée comme une réponse à la salinité et à la sécheresse (Ashraf et Haris, 2004). En effet, nos résultats indiquent, que les variétés irriguées avec des solutions salines supérieures et égales à 75 mM NaCl accumulent plus de sucres que celles irriguées avec 0 et 50 mM NaCl. À l'exception de la variété Espresso qui montre des teneurs en sucres similaires avec les 3 concentrations salines.

Nos résultats rejoignent ceux obtenus par d'autres auteurs sur des espèces différentes. En effet, Cachorro *et al.*, (1993) ont noté chez *Phaseolus vulgaris* stressée par 100 mM NaCl, une augmentation de 51% par rapport au traitement témoin. En présence de 8 g/l NaCl, Ben Khaled *et al.*, (2003) ont observé une augmentation de 57% par rapport au témoin, chez *Trifolium alexandrinum*. L'augmentation des teneurs en sucres solubles observée chez nos quatre variétés en présence de sel pourrait être due à la dégradation des réserves amylacées suite à leur conversion rapide en saccharose (Munns *et al.*, 2006) et / ou à une modification d'activités enzymatiques liées au métabolisme glucidique (Dubey et Singh, 1999). En effet, chez le riz cultivé sous stress salin, il a été observé une dégradation de l'amidon et une accumulation des sucres s'accompagnant de l'augmentation de l'activité de l'amidon phosphorylase, du glucose phosphate synthase et d'une diminution de l'activité de l'invertase (Dubey et Singh, 1999).

L'accumulation des sucres solubles dans les plantes légumineuses en réponse à la salinité a été documentée chez le haricot (Tejera *et al.*, 2005), *Medicago sativa* (Farissi *et al.*, 2011) et dans les espèces de *Phaseolus* (Bayuelo-Jimenez *et al.*, 2012).

Mohsen *et al.* (2013) ont noté sous l'effet de 100 et 150 mM NaCl, une accumulation des sucres solubles durant la période végétative chez *Vicia faba* cv. Misr 2, cette augmentation est observée aussi bien dans les feuilles que dans les racines.

## **Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

---

La teneur élevée des sucres solubles observée dans les feuilles de nos variétés, pourrait témoigner soit d'une limitation de leur utilisation suite à un ralentissement de la croissance (Lawlor, 2002), soit d'une force d'appel importante et leur hydrolyse par des enzymes présentes dans ces organes (Mouri *et al.*, 2012).

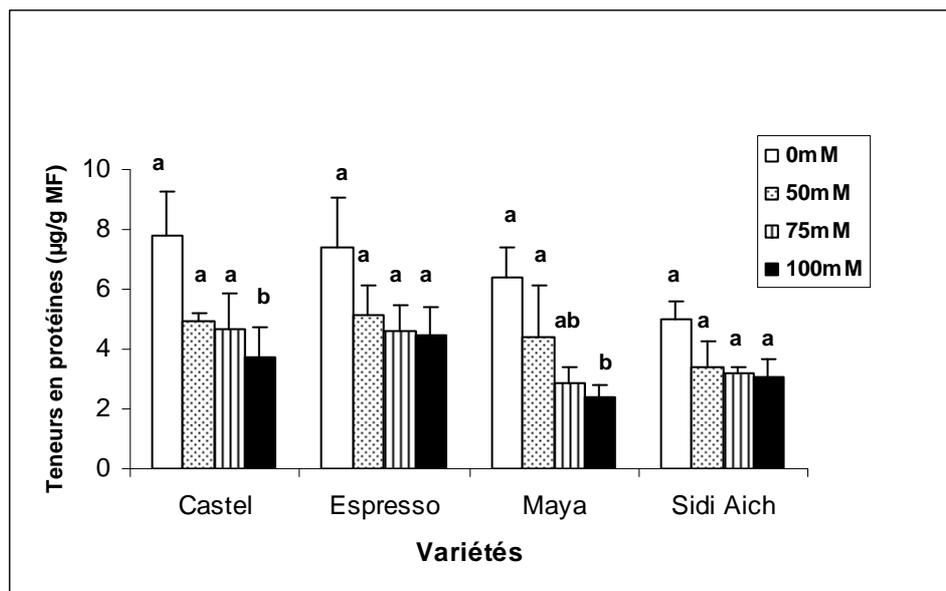
En revanche, Gadallah (1999) a noté une diminution des teneurs en sucres chez *Vicia faba* cv. Calvor 103. Cette diminution pourrait être attribuée aux effets négatifs de la salinité sur le métabolisme des glucides, par l'inhibition de la photosynthèse due aux ions  $Cl^-$ .

Ashraf et Harris (2004), considèrent que les sucres solubles pourraient contribuer à plus de 50% à l'ajustement osmotique des glycophytes soumises aux conditions de salinité. En effet, les sucres solubles assurent des fonctions majeures dans l'osmoprotection, le stockage du carbone et le piégeage des radicaux libres (Parida *et al.*, 2004). La résistance des plantes aux différents types de stress tels que la salinité, la sécheresse et les températures élevées est due à l'accumulation des sucres solubles (Chen et Murata, 2002). Ils jouent un rôle crucial dans le maintien de la turgescence et protègent contre la perte d'eau (Yokota *et al.*, 2006).

Des corrélations significatives et négatives ont été obtenues entre l'accumulation des sucres solubles et la production de matière sèche totale chez les variétés Castel ( $r^2 = - 0,44^*$ ) et Espresso ( $r^2 = - 0,61^{**}$ ). Ces corrélations confirment l'étroite relation qui existe entre l'accumulation des sucres et la diminution de la croissance. En effet, Azcon Bieto (1983) a rapporté que les faibles taux de carbone assimilé et la diminution des poids sec sont liés à l'accumulation des sucres solubles chez de nombreuses espèces végétales.

### **- Teneurs en protéines**

D'après la figure 9 nous remarquons que l'addition du sel à la solution d'arrosage modifie la concentration des protéines avec une variabilité de réponse chez les quatre variétés.



**Figure 9 : Variation des teneurs en protéines chez les 4 variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl).** Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions. Les barres verticales (barre d'erreur) représentent les ESM. Pour chaque variété, les histogrammes suivies de la même lettre ne sont pas différents significativement ( $p < 0,05$ ).

La teneur moyenne des protéines la plus élevée est enregistrée chez les témoins sans sel ; elle est de l'ordre de 6,62  $\mu\text{g/g}$  de MF. Les plus fortes teneurs sont enregistrées chez les variétés Castel et Espresso soit une valeur de 7,59  $\mu\text{g/g}$  de MF. La plus faible teneur est observée chez la variété Sidi Aich avec une valeur de 4,99  $\mu\text{g/g}$  de MF.

Les teneurs en protéines foliaires des variétés Espresso et Sidi Aich, non pas été affectées par le sel, aucune différence significative n'a été enregistrée par rapport au témoin (Fig.9).

En revanche, chez la variété Maya une diminution significative de 54% par rapport au témoin est enregistrée en présence de 75mM NaCl. Chez la variété Castel, l'effet du sel se fait sentir à partir de 100 mM NaCl, avec une réduction des teneurs en protéines de 52% par rapport au témoin. À cette concentration, la variété Maya montre la plus grande baisse (62 %) par rapport au témoin (Fig.9).

L'analyse de la variance a montré un effet très hautement significatif du sel ( $P \leq 0,001$ ) sur la teneur en protéines des 4 variétés étudiées, les différences entre les variétés sont significatives ( $P \leq 0,05$ ) et l'interaction variété x salinité est non significative ( $P < 0,05$ ) (Annexe Tab.15).

## Discussion

La diminution des teneurs en protéines foliaires chez les plantes est considérée comme une réponse au stress salin (Pessarkli, 2010). En effet, nos résultats montrent que la présence de

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

---

sel dans le milieu a provoqué une diminution des teneurs en protéines foliaires chez les variétés Maya et Castel. La variété Maya s'avère plus affectée par le sel. En revanche, les variétés Espresso et Sidi Aich ont maintenues des teneurs stables en protéines, aucune différence significative n'a été observée par rapport aux témoins.

La diminution des teneurs observée chez nos variétés Maya et Castel a déjà été rapportée par Soussi *et al.*, (1998) sur le pois chiche, par Parida *et al.*, (2004) sur *Bruguiera parviflora*.L, et par Gaballah et Gomaa (2007) sur deux variétés de fèves : Giza blanka (tolérante au sel) et Giza (sensible à la salinité).

La baisse des teneurs en protéines serait due d'une part à une réduction de la synthèse des protéines et d'autre part à l'augmentation de l'activité des enzymes protéolytiques (Pessarkli, 2010). En effet, Viégas et Silveira (1999) ont signalé sur des jeunes plantes d'anacardier (*Anacardium occidentale* L.) une augmentation de l'activité des enzymes protéolytiques foliaires accompagnée d'une accumulation concomitante dans le cytoplasme des fractions azotées solubles. Parida *et al.* (2004), suggèrent que la diminution de la teneur en protéines accompagnée d'une augmentation du pool des acides aminés totaux reflète un mode d'ajustement osmotique.

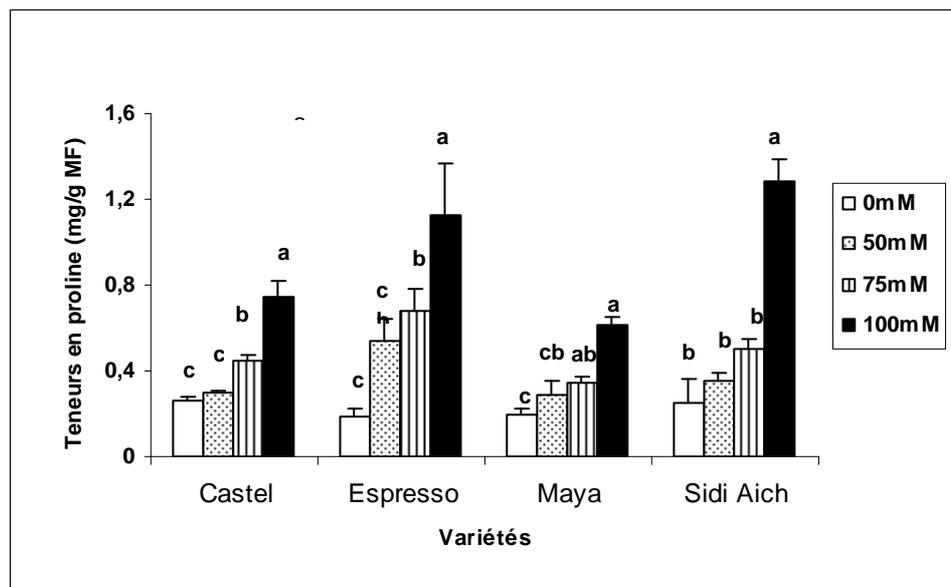
La diminution des teneurs en protéines observée chez les variétés Maya et Castel sous l'effet du sel pourrait être due également à une faible disponibilité des acides aminés et à la dénaturation des enzymes impliquées dans la synthèse des acides aminés et des protéines (Popova *et al.*, 1995).

Cependant, un effet positif du stress salin sur les teneurs en protéines foliaires a été signalé sur la fève (Abdul Qados, 2010). Cette augmentation pourrait trouver son explication dans la synthèse de nouvelles protéines sous l'effet du stress salin et/ou la diminution de l'activité des enzymes protéolytiques (Dubey et Rani, 1989).

Des corrélations positives et significatives ont été obtenues entre les teneurs en protéines et la biomasse totale, chez Sidi Aich ( $r^2 = 0,49^*$ ), Maya ( $r^2 = 0,60^{**}$ ) et Castel ( $r^2 = 0,61^{**}$ ). Ces corrélations montrent que les teneurs en protéines et la biomasse totale suivent la même évolution. En revanche, aucune corrélation n'a été observée chez la variété Espresso.

### **- Accumulation de la proline**

La figure 10 montre que les quatre variétés réagissent à l'égard de la salinité par une augmentation progressive des teneurs en proline.



**Figure 10 : Variation des teneurs en proline foliaire chez les 4 variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl).** Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions. Les barres verticales (barre d'erreur) représentent les ESM. Pour chaque variété, les histogrammes suivies de la même lettre ne sont pas différents significativement ( $p < 0,05$ ).

En l'absence de contrainte saline, les quatre variétés ont présenté les valeurs les plus basses comparativement aux plantes ayant subi un traitement salin. Elles ont accumulé sensiblement la même teneur en proline, en moyenne 0,22 mg/g MF par plante (Fig. 10).

L'enrichissement de l'eau d'irrigation avec 50 mM NaCl n'a pas eu d'effet sur l'accumulation des teneurs en proline chez les variétés Castel, Maya et Sidi Aich, aucune différence significative n'a été observée par rapport aux témoins respectifs. En revanche, une augmentation significative de 64% a été enregistrée chez la variété Espresso.

La présence de 75 mM NaCl dans l'eau d'irrigation induit une augmentation significative des teneurs en proline chez les variétés Maya (41%), Castel (42%) et Espresso (70%). Cependant, cette concentration n'a pas affectée les teneurs en proline de la variété Sidi Aich (Fig.10).

Les teneurs maximales en proline sont accumulées en présence de 100 mM NaCl. Les variétés Sidi Aich et Espresso ont accumulé respectivement les plus fortes teneurs, soit 1,28 et 1,13 mg/g MF, suivies des variétés Castel (0,74 mg/g MF) et Maya (0,61 mg/g MF).

L'analyse de la variance a révélé un effet très hautement significatif du sel ( $P < 0,001$ ) sur l'accumulation de la proline, des différences entre les variétés sont très hautement significatives. Cependant, l'interaction variété x salinité est significative ( $p \leq 0,05$ ) (Annexe Tab.16)

## **Discussion**

Les résultats obtenus indiquent que la salinité est associée à une augmentation significative des teneurs en proline. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Amini *et al.*, (2005) sur deux cultivars de tomate qui notent une augmentation de la teneur en proline chez ces espèces soumises à un stress salin.

La figure 10 montre qu'en présence d'un stress sévère (100 mM NaCl), les variétés Espresso et Sidi Aich accumulent plus de proline que les variétés Maya et Castel, ce qui semble confirmer, du point de vue tolérance, la supériorité des variétés Espresso et Sidi Aich par rapport aux deux autres. Plusieurs auteurs ont rapporté que l'accumulation de la proline est souvent corrélée avec la tolérance des plantes au stress salin (Ashraf et Harris, 2004). Chez les plantes sensibles, la présence de cet acide aminé est par contre amoindrie (Chen *et al.*, 1995). L'accumulation de la proline contribue à l'acquisition de cette résistance grâce au maintien de la turgescence cellulaire créée par l'ajustement osmotique (Munns, 2002 ; Lluch *et al.*, 2007).

En effet, la proline agit comme un osmoticum qui permet de neutraliser les effets ioniques et osmotiques de l'accumulation des ions du sel dans la vacuole (Zid et Grignon, 1991) ; de conférer une protection aux enzymes ; de stabiliser la membrane et la structure cellulaire durant les conditions de stress (El-Sayed Saffan, 2008) et constituer une réserve de carbone et d'azote réduit, utilisés par la plante ultérieurement à la période de stress (Zerrad *et al.*, 2008).

L'augmentation des teneurs en proline a été également rapportée par El-Sayed (2011) chez *Vicia faba* cv. Giza 2 et par Hassanein *et al.* (2012) chez *Vicia faba* cv. Sakha, qui montrent une augmentation des teneurs en proline plus importante en cas de stress sévère. En revanche, Katerji *et al.*, (2002) ne rapportent aucune augmentation des teneurs en proline chez *Vicia faba*. Ce résultat est identique à celui observé par Tejera *et al.* (2005) sur des génotypes de haricot qui ont noté une diminution des teneurs en proline sous l'effet du sel qui serait due à une inhibition de synthèse de son précurseur ou à une rapide activité de la proline déshydrogénase impliquée dans la dégradation de cet acide aminé.

Certains auteurs admettent que le changement des teneurs en proline est déclenché par la perte de la turgescence et/ou par la stimulation de sa synthèse induite par les stress (El-Iklil *et al.*, 2002). D'autres affirment que c'est une conséquence de l'effet inhibiteur du stress sur son oxydation, ainsi que sur son incorporation dans les protéines (Yoshida *et al.*, 1995).

## **Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

---

En outre, la synthèse de l'acide abscissique sous l'effet du stress salin, joue un rôle déterminant dans la régulation de l'expression du gène P5CS impliqué dans la synthèse de la proline (Xiong *et al.*, 2001).

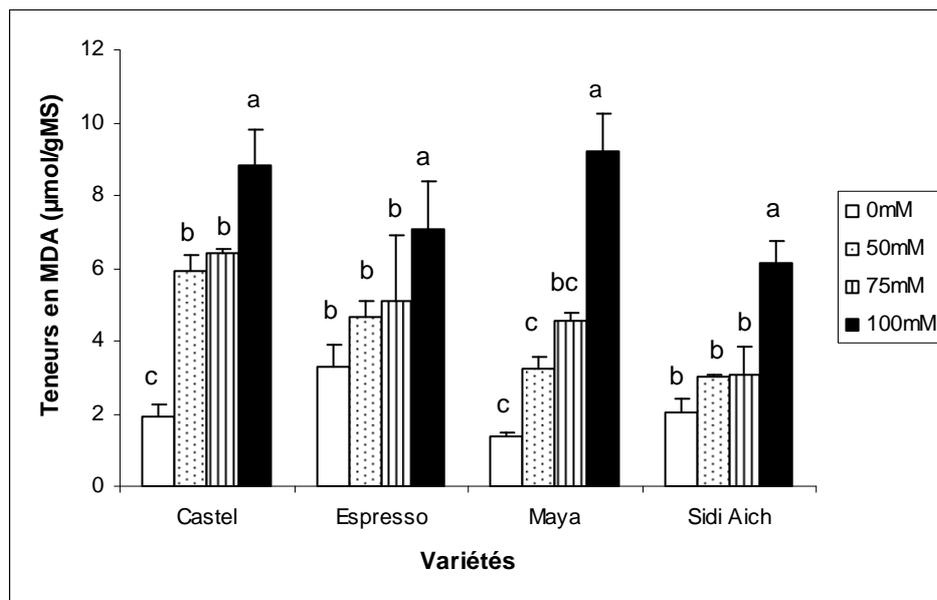
L'augmentation du taux de proline pourrait aussi être le résultat de la dégradation des protéines (Yoshida *et al.*, 1997). Nos résultats, ont montré une corrélation significative et négative entre la teneur en protéine avec la teneur en proline, chez la variété Maya avec un coefficient de  $r^2 = - 0,48^*$ , ce résultat laisse indiquer que la proline accumulée dans les feuilles de la variété Maya, est le résultat de la dégradation des protéines. En revanche, chez les variétés Castel, Espresso et Sidi Aich, aucune corrélation n'a été observée entre les protéines et la proline. Ce résultat laisse supposer que la proline proviendrait d'une synthèse de novo, le précurseur principal est le glutamate (Yoshida *et al.*, 1995).

Belkhodja et Bidai (2004) suggèrent que le mécanisme d'accumulation de la proline serait lié à la présence de sites de résistance de la plante à la contrainte. En effet, le transport de la proline de la source (lieu de synthèse) au site de la résistance est admis depuis longtemps comme un paramètre important dans l'acquisition de cette résistance. Paquin (1986), signale que la proline serait synthétisée dans les feuilles et transportées vers ces sites ; d'autres rapportent que l'acide aminé migre vers les feuilles et s'y localise chez la fève (Belkhodja et Benkabilia, 2000) et chez le tréfle (Benkhaled *et al.*, 2003)

Des précédents résultats, nous avons constaté que parallèlement à l'augmentation de la teneur en proline foliaire, une baisse des teneurs en pigments chlorophylliens totaux a été remarquée sous l'effet du stress salin. Ceci est confirmé par des corrélations négatives et significatives obtenues chez les variétés Maya ( $r^2 = - 0,67^{**}$ ), Espresso ( $r^2 = - 0,54^*$ ) et chez Castel ( $r^2 = - 0,53^*$ ). Ce résultat suggère l'existence d'une connexion entre les voies de biosynthèse des pigments chlorophylliens et de la proline. Une compétition entre ces deux composés sur leur précurseur commun, le glutamate, peut être à l'origine de cette évolution (Grennan, 2006).

### **- Teneurs en malondialdéhyde**

Le stress salin provoque une augmentation des teneurs en malondialdéhyde chez les 4 variétés étudiées (Fig. 11).



**Figure 11 : Variation des teneurs en malondialdéhyde chez les 4 variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl).** Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions. Les barres verticales (barre d'erreur) représentent les ESM. Pour chaque variété, les histogrammes suivies de la même lettre ne sont pas différents significativement ( $p < 0,05$ ).

En l'absence de sel, les variétés Castel et Maya enregistrent les plus faibles teneurs soit 1,38  $\mu\text{mol/g MS}$  et 1,93  $\mu\text{mol/g MS}$  respectivement. L'enrichissement de l'eau d'irrigation avec 50 mM NaCl n'a pas eu d'effet sur l'accumulation des teneurs en malondialdéhyde chez les variétés Maya, Espresso et Sidi Aich, aucune différence significative n'a été observée par rapport aux témoins respectifs. En revanche, la variété Castel affiche une augmentation significative de 67% par rapport au témoin (Fig.11).

Hormis, la variété Maya qui enregistre une augmentation significative de 69% en présence de 75 mM NaCl, les variétés Espresso et Sidi Aich maintiennent respectivement les mêmes teneurs que celles observées chez les plantes témoins, aucune différence significative n'a été observée ( $p \geq 0,05$ ).

Pour toutes les variétés, les teneurs maximales en malondialdéhyde sont produites en présence de 100 mM NaCl. Les variétés Maya et Castel ont enregistré respectivement des augmentations de 85% et 78% par rapport aux témoins respectifs, alors que les variétés Sidi Aich et Espresso montrent des augmentations de 67% et 53% respectivement.

L'analyse de la variance a révélé un effet très hautement significatif du sel ( $p \leq 0,001$ ) sur les teneurs en malondialdéhyde chez les 4 variétés testées, des différences entre les variétés sont hautement significatives. Cependant, l'interaction variété x salinité est significative ( $p \leq 0,05$ ) (Annexe, Tab 17).

## **Discussion**

L'effet du sel s'est traduit par une augmentation des teneurs en malondialdéhyde chez toutes les variétés. Cette accumulation est souvent considérée comme un indicateur de peroxydation des lipides, qui nous renseigne sur l'état de dégradation des membranes cellulaires (Halliwell et Gutteridge, 1989).

Les résultats obtenus indiquent que les variétés Castel et Maya présentent des teneurs en MDA plus élevées que les variétés Espresso et Sidi Aich, ce qui témoigne des dommages plus prononcés de leurs membranes cellulaires. En effet, l'augmentation de la teneur en MDA sous l'effet du stress salin pourrait être due à une réduction de l'activité de différentes enzymes du système antioxydant des feuilles, notamment de la superoxyde dismutase et de la catalase (Jiang et Huang, 2001). Cela entraînerait une accumulation des espèces réactives à l'oxygène, telles que l'ion superoxyde  $O_2^-$ , le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et le radical hydroxyle  $OH^-$ , dans les tissus et favoriserait donc l'oxydation des lipides membranaires (Foyer et Noctor, 2003).

Nos résultats sont semblables à ceux rapportés par Hassanein *et al.* (2012) sur la fève, qui montrent une augmentation des teneurs en MDA en présence de sel.

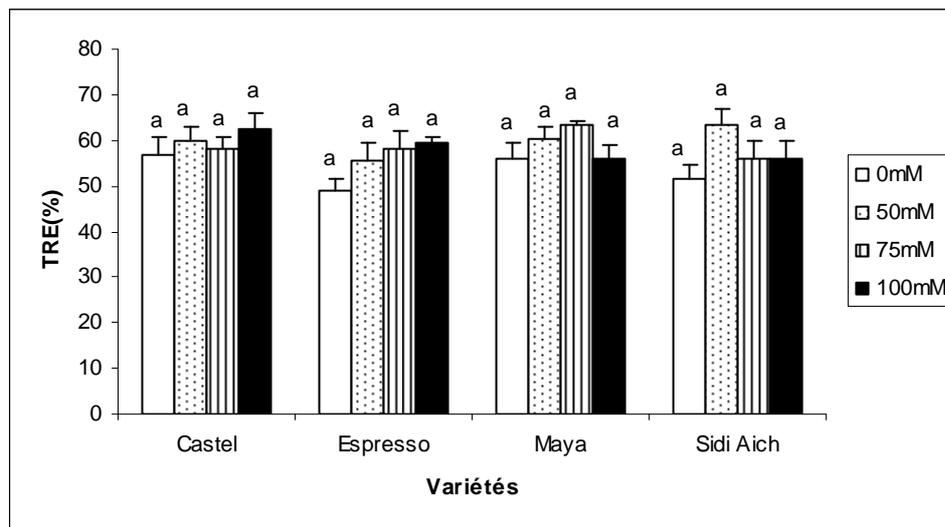
En revanche, d'autres travaux ont montré que chez la tomate soumise à un stress salin, les teneurs en MDA étaient identiques à celles des plantes témoins sans sel. Ce résultat semble être une caractéristique des plantes tolérantes au sel, et le degré des dégâts oxydatifs cellulaires est fonction de la capacité des plantes à se protéger contre les agents oxydatifs (Shelata *et al.*, 1998).

De même, l'augmentation de la teneur en MDA indicateur d'une dégradation oxydative des lipides membranaires, pourrait aussi expliquer la diminution des teneurs en chlorophylle totale chez les variétés étudiées. Des corrélations significatives et négatives entre les teneurs en MDA et les teneurs en chlorophylle totale ont été observées chez Maya ( $r^2 = -0,76^*$ ), Castel ( $r^2 = -0,79^*$ ) et chez Sidi Aich ( $r^2 = -0,56^*$ ). En effet, une dégradation lipidique des membranes entraînerait une perturbation des membranes thylacoïdales, une perte de l'intégrité des chloroplastes, réduisant ainsi la biosynthèse des pigments chlorophylliens (Benhassine-Kesri, 2002).

### 3.2.3. Caractères liés à l'état hydrique de la plante

#### -Teneur relative en eau foliaire

La figure 12 indique que les teneurs relatives en eau foliaire des plantes stressées sont similaires à celles des plantes témoins.



**Figure 12: Variation des teneurs relatives en eau chez les quatre variétés sous différentes concentrations salines (0, 50, 75 et 100 mM NaCl).** Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions. Les barres verticales (barre d'erreur) représentent les ESM. Pour chaque variété, les histogrammes suivies de la même lettre ne sont pas différents significativement ( $p < 0,05$ ).

La présence de sel dans l'eau d'irrigation entraîne une augmentation graduelle de la teneur relative en eau foliaire, chez les 4 variétés testées. Les TRE maximales enregistrées sont de l'ordre de 59%, 62%, 63%, et 63% chez Espresso, Castel, Maya et Sidi Aich respectivement. Cependant, ces augmentations ne présentent aucune différence significative entre les variétés, les concentrations salines et les plants témoins.

L'analyse de la variance montre que l'effet du sel est non significatif ( $p \geq 0,05$ ) sur la teneur relative en eau des 4 variétés étudiées (Annexe, Tab.18).

### Discussion

La teneur relative en eau des feuilles, nous renseigne sur l'état hydrique de la plante, qui peut être un indicateur de tolérance au stress salin (Hassani *et al.*, 2008). Nos résultats montrent que quel que soit la concentration saline dans l'eau d'irrigation, nos variétés ont maintenu un niveau d'hydratation proche à celui des plants témoins. Ce résultat indique que le stress salin

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

n'a pas affecté la teneur relative en eau foliaire des 4 variétés étudiées, ceci pourrait être expliqué par l'efficacité de l'ajustement osmotique, qui contrebalance la diminution du potentiel hydrique, permettant ainsi de maintenir les mouvements d'eau vers les feuilles et par conséquent leur turgescence (Hopkins, 2003).

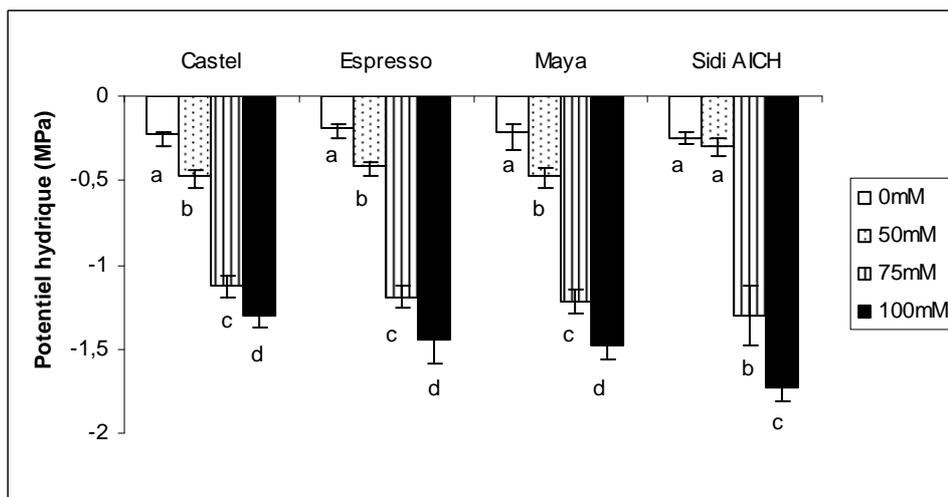
Dans ces conditions, l'absorption de l'eau est maintenue à un niveau suffisant pour éviter la déshydratation des tissus de la plante pour établir le phénomène de succulence et pouvoir diluer le plus d'osmolytes possible (Hassani *et al.*, 2008).

Ce maintien du niveau d'hydratation par les 4 variétés peut trouver également son explication dans la diminution de l'intensité de transpiration et/ou de la diminution de la surface foliaire. En effet, Allem *et al.* (2002) ont montré que les variétés de blé tendre qui arrivent à réduire le plus l'intensité de transpiration sont celles qui maintiennent le meilleur niveau d'hydratation.

La régulation de la teneur en eau est aussi reliée aux mécanismes racinaires. Munns *et al.*, (2000) ont noté que c'est la capacité de succion développée par les racines qui conditionne le maintien d'un bon potentiel hydrique au niveau des feuilles chez les plantes soumises à un stress salin.

### - Potentiel hydrique foliaire

Les variations du potentiel hydrique foliaire en fonction des traitements salins appliqués, montrent que chez toutes les variétés étudiées l'augmentation de l'intensité du stress provoque un abaissement du potentiel hydrique foliaire comparativement aux témoins. Cette baisse est d'autant plus accentuée que l'intensité du stress est importante (Fig.13).



**Figure 13 : Variation du potentiel hydrique chez les 4 variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl).** Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions. Les barres verticales (barre d'erreur) représentent les ESM. Pour chaque variété, les histogrammes suivies de la même lettre ne sont pas différents significativement ( $p < 0,05$ ).

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

---

En l'absence de sel, toutes les variétés affichent un potentiel hydrique élevé par rapport aux autres traitements. Des potentiels hydriques de  $-0,19$  MPa,  $-0,21$  MPa,  $-0,23$  MPa et  $-0,29$  MPa sont observés respectivement chez les variétés Espresso, Maya, Castel et Sidi Aich.

Lorsque le stress est de  $50$  mM NaCl, la variété Sidi Aich n'est pas affectée, son potentiel hydrique ne présente aucune différence significative avec le témoin ( $P \geq 0,05$ ). Alors que les variétés, Castel, Espresso et Maya plus sensibles voient leurs potentiels hydriques chuter de plus de  $50\%$  par rapport aux témoins respectifs, elles enregistrent des baisses de  $51\%$ ,  $53\%$  et  $55\%$  respectivement (Fig. 13).

Pour la variété Sidi Aich, l'effet du sel se fait sentir à partir de  $75$  mM NaCl, une baisse significative de  $77\%$  a été notée par rapport au témoin. Cette baisse s'accroît pour toutes les variétés en présence de  $100$  mM NaCl, des pourcentages de réductions sont de l'ordre de  $82\%$ ,  $83\%$ ,  $85\%$  et  $86\%$  respectivement pour les variétés Castel, Sidi Aich, Maya et Espresso.

L'analyse de la variance révèle que l'effet du sel sur le potentiel hydrique foliaire des 4 variétés et l'interaction variété x salinité sont très hautement significatives ( $P \leq 0,001$ ). Les différences entre les variétés sont hautement significatives (Annexe, Tab.19).

### Discussion

Nos résultats montrent que l'augmentation de la salinité réduit très significativement le potentiel hydrique foliaire de toutes les variétés étudiées. Cependant, la variété Sidi Aich a enregistré un potentiel plus faible que celui observé chez les variétés Castel, Espresso et Maya.

En effet, le stress salin cause une réduction du potentiel hydrique du sol, ce qui rend difficile l'absorption de l'eau par la plante et par conséquent induit une réduction du potentiel hydrique foliaire (Lluch *et al.*, 2007). La baisse du potentiel hydrique foliaire est associée à une réduction du potentiel osmotique foliaire ; face à cette situation les plantes accumulent des osmotocums tels que la proline et les sucres (Hasegawa *et al.*, 2000) qui en association avec la réduction de la transpiration par fermeture des stomates et la réduction de la surface foliaire (Allem *et al.*, 2002) permettent de garder la turgescence et le volume cytosolique aussi élevé que possible (Wang *et al.*, 2003).

D'autres travaux ont confirmé que les glycophytes et les halophytes tolèrent la salinité par la réduction du potentiel hydrique foliaire soit par la synthèse de solutés organiques et ou par

## **Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

---

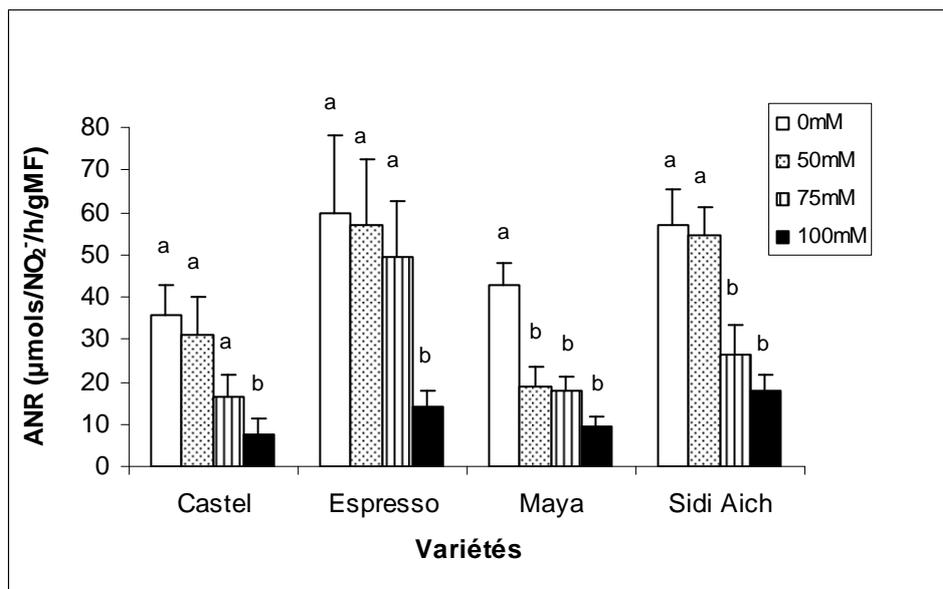
compartimentation des ions inorganiques engendrant ainsi un ajustement osmotique (Munns, 2002 ; Lluch *et al.*, 2007). Le rôle principal de ces solutés consiste à maintenir à l'intérieur des cellules un faible potentiel hydrique afin de générer une force de succion pour l'absorption de l'eau (Carpenter *et al.*, 1990).

Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Abdul-Qados (2010) qui a souligné sur *Vicia faba* stressée par le sel une baisse du potentiel hydrique. Bayuelo-Jimenez *et al.*, (2003) ont noté également chez 4 espèces appartenant au genre *phaseolus* une baisse du potentiel hydrique associée à une augmentation des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{K}^+$ .

En effet, des corrélations significatives et négatives ont été obtenues entre le potentiel hydrique et la proline ainsi que les sucres solubles et le potentiel hydrique avec respectivement des valeurs pour Espresso ( $r^2 = - 0,80^{**}$ ,  $r^2 = - 0,49^*$ ), Sidi Aich ( $r^2 = - 0,77^{**}$ ,  $r^2 = - 0,44^*$ ), Maya ( $r^2 = - 0,74^*$ ,  $r^2 = - 0,50^*$ ) et Castel ( $r^2 = - 0,74^*$ ,  $r^2 = - 0,54^*$ ). Ces corrélations montrent que l'abaissement des potentiels hydriques chez les 4 variétés stressées par le sel est associé à une accumulation concomitante de la proline et des sucres solubles. Ces corrélations sont plus fortes dans le cas de la proline, ce qui laisse suggérer la grande contribution de la proline dans l'ajustement osmotique.

### **3.2.4. Activité nitrate réductase (ANR)**

La figure 14 montre que cette activité diminue pour les 4 variétés en présence de sel. Ces résultats mettent en évidence une variabilité de réponse en présence de sel chez les 4 variétés testées.



**Figure 14 : Variation de l'ANR chez les 4 variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl).** Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions. Les barres verticales (barre d'erreur) représentent les ESM. Pour chaque variété, les histogrammes suivies de la même lettre ne sont pas différents significativement ( $p < 0,05$ )

Pour le traitement témoin (0mM NaCl), l'activité nitrate réductase est plus élevée chez les variétés Espresso et Sidi Aich (59 et 56  $\mu\text{mol de NO}_2^-/\text{h/g MF}$  respectivement) et plus faible chez les variétés Maya et Castel (43,05 et 35,54  $\mu\text{mol de NO}_2^-/\text{h/g MF}$ ).

La présence de 50 mM NaCl dans le milieu n'a pas affecté l'ANR des variétés Castel, Espresso et Sidi Aich, aucune différence significative n'a été enregistrée par rapport au témoin. Tandis que la variété Maya plus sensible, accuse une baisse de 56% par rapport au témoin. Lorsque le stress est de 75 mM NaCl, seule l'ANR de la variété Sidi Aich qui est affectée, avec une réduction de 53% par rapport au témoin. Toutefois la variété Maya maintient la même ANR que celle observée à 50mM NaCl, aucune différence significative n'a été observée entre 50 et 75mM NaCl.

Pour les variétés Espresso et Castel, l'effet du sel se fait sentir à 100 mM NaCl, elles enregistrent respectivement des baisses significatives de 76% et 78% par rapport aux témoins respectifs. Les variétés Maya et Sidi Aich se comportent de la même manière qu'avec 75mM NaCl, elles affichent des réductions de 77% et 68% respectivement.

L'analyse de la variance a révélé un effet très hautement significatif du sel ( $P \leq 0,001$ ) sur l'activité nitrate réductase des 4 variétés. Les différences entre variétés sont également très hautement significatives. Cependant l'interaction variété x salinité n'est pas significative ( $P \geq 0,05$ ) (Annexe, Tab.20).

## **Discussion**

Les résultats obtenus montrent que le stress salin provoque une diminution de l'activité nitrate réductase chez les 4 variétés étudiées. Cet effet se traduit par une réduction de l'assimilation des nitrates. Cette baisse de l'ANR sous l'effet du stress salin a été rapportée par plusieurs auteurs (Lin et Chang, 1997; Parida et Das, 2005 ; Jabeen et Ahmad, 2011).

Cette diminution de l'ANR chez les variétés de féverole, pourrait être due à une restriction du flux de nitrate provenant des racines aux feuilles, inhibant ainsi les mécanismes d'induction de la synthèse de la protéine nitrate réductase et de son activité (Foyer *et al.*, 1998). Les ions chlorures en compétition avec le nitrate vis à vis des transporteurs entraînent également une diminution de sa concentration dans les racines et dans les feuilles (Dean-Drummond, 1986) et/ou une inactivation des transporteurs  $\text{NO}_3^-$  due aux effets toxiques du sel, suite à leur forte accumulation dans les feuilles (Lin et Chang, 1997).

Ce résultat observé chez les quatre variétés pourrait s'expliquer également par une diminution du potentiel osmotique foliaire réduisant ainsi l'absorption de l'eau et les éléments minéraux (Dubey et Pessarkli, 2001). En effet, des corrélations positives et significatives entre l'activité nitrate réductase et le potentiel hydrique ont été trouvées chez Sidi Aich ( $r^2 = 0,81^{**}$ ), Maya ( $r^2 = 0,68^{**}$ ) et Castel ( $r^2 = 0,63^{**}$ ), traduisant l'étroite relation qui existe entre le potentiel hydrique et l'activité nitrate réductase.

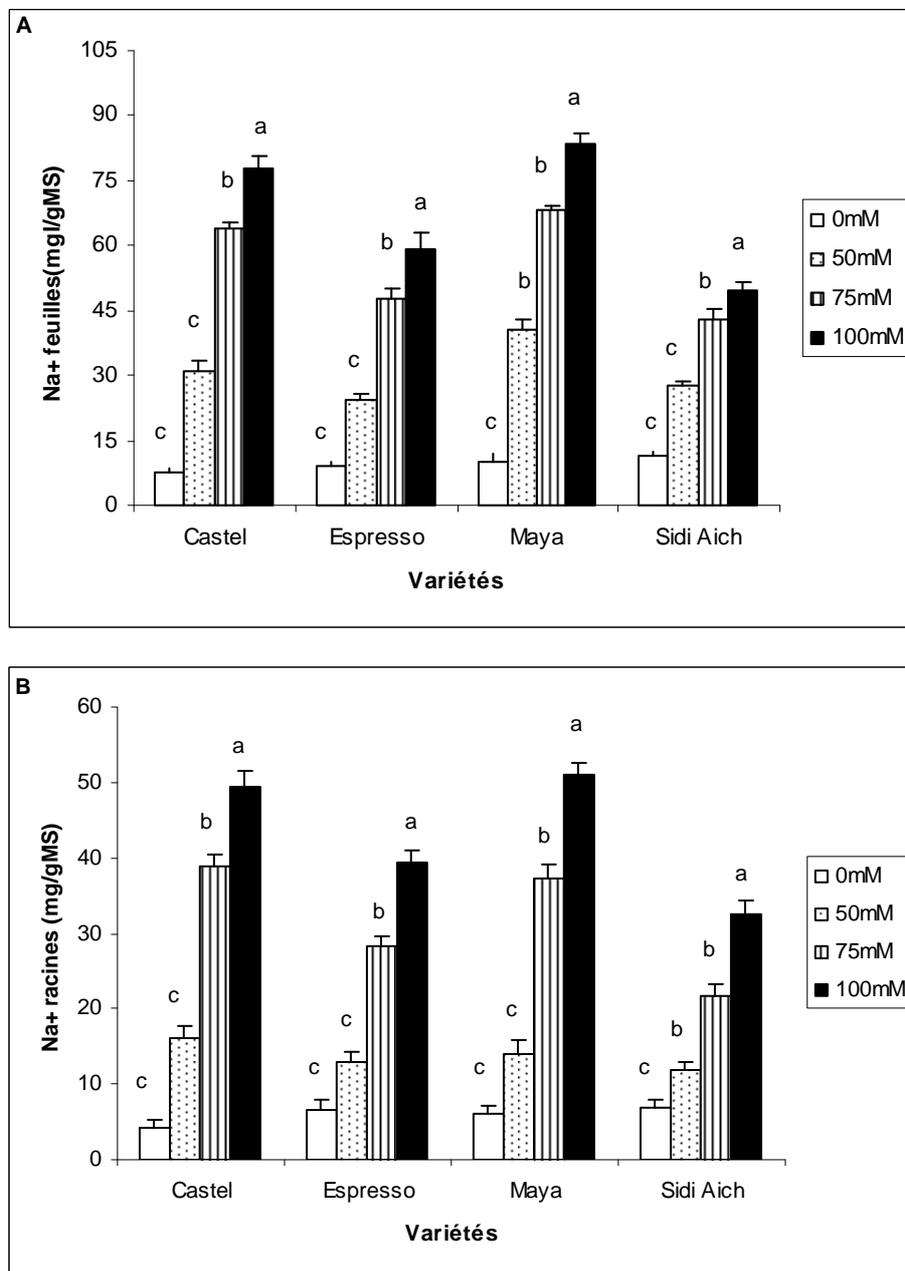
Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature chez d'autres légumineuses, notamment chez *Pisum sativum* (Dean-Drummond, 1986) et *Glycine max* (Moussa, 2004). Ces auteurs, attribuent la baisse de l'ANR chez les plantes stressées par le sel à une diminution du flux des nitrates dans les feuilles.

Dans les conditions de stress sévère (100mM NaCl), les variétés Sidi Aich et Espresso moins affectées par le sel présentent les plus fortes activités enzymatiques soit 17,9  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NO}_2^-$ /h/g MF et 14,29  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NO}_2^-$ /h/g MF respectivement. Par contre, les variétés Castel et Maya, plus sensibles au sel, ont affiché une activité de seulement 7,62  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NO}_2^-$ /h/g MF et 9,58  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NO}_2^-$ /h/g MF respectivement.

Cette diminution de l'ANR pourrait être due également à une perturbation de l'intégrité membranaire des racines sous l'effet du sel, inhibant ainsi le prélèvement des nitrates par les racines (Carjaval *et al.*, 1999). Ceci est justifié par des corrélations significatives et négatives obtenues entre l'ANR et les teneurs en MDA chez Maya ( $r^2 = -0,73^{**}$ ), Castel ( $r^2 = -0,63^{**}$ ) et Sidi Aich ( $r^2 = -0,57^{**}$ ).

### 3.2.5. Déterminations des teneurs en Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>

La détermination des teneurs en Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> dans les feuilles et les racines des quatre variétés ont révélé une variabilité de réponse en l'absence et en présence de sel (Fig.15).



**Figure 15 : Variations des teneurs en Na<sup>+</sup> dans les feuilles (A) et dans les racines (B) des 4 variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl).** Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions. Les barres verticales (barre d'erreur) représentent les ESM. Pour chaque variété, les histogrammes suivies de la même lettre ne sont pas différents significativement (p < 0,05)

De ces histogrammes, il ressort que les feuilles et les racines des plants témoins accumulent les plus faibles teneurs en Na<sup>+</sup> (Fig.15).

## **Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

---

Les teneurs foliaires en  $\text{Na}^+$  sont de l'ordre de 7,82 ; 8,92 ; 10,12 et 11,5 mg/g MS respectivement chez les variétés Castel, Espresso, Maya et Sidi Aich. Dans les racines, les teneurs sont plus faibles, elles sont de l'ordre de 4,14 ; 5,95 ; 6,53 et 6,9 mg/g MS respectivement chez Castel, Maya, Espresso et Sidi Aich.

La présence de sel dans le milieu entraîne une accumulation de sodium chez les 4 variétés testées au niveau des deux organes d'une façon croissante avec l'augmentation de la concentration en sel. Toutefois, les teneurs en  $\text{Na}^+$  sont plus importantes dans les feuilles que dans les racines.

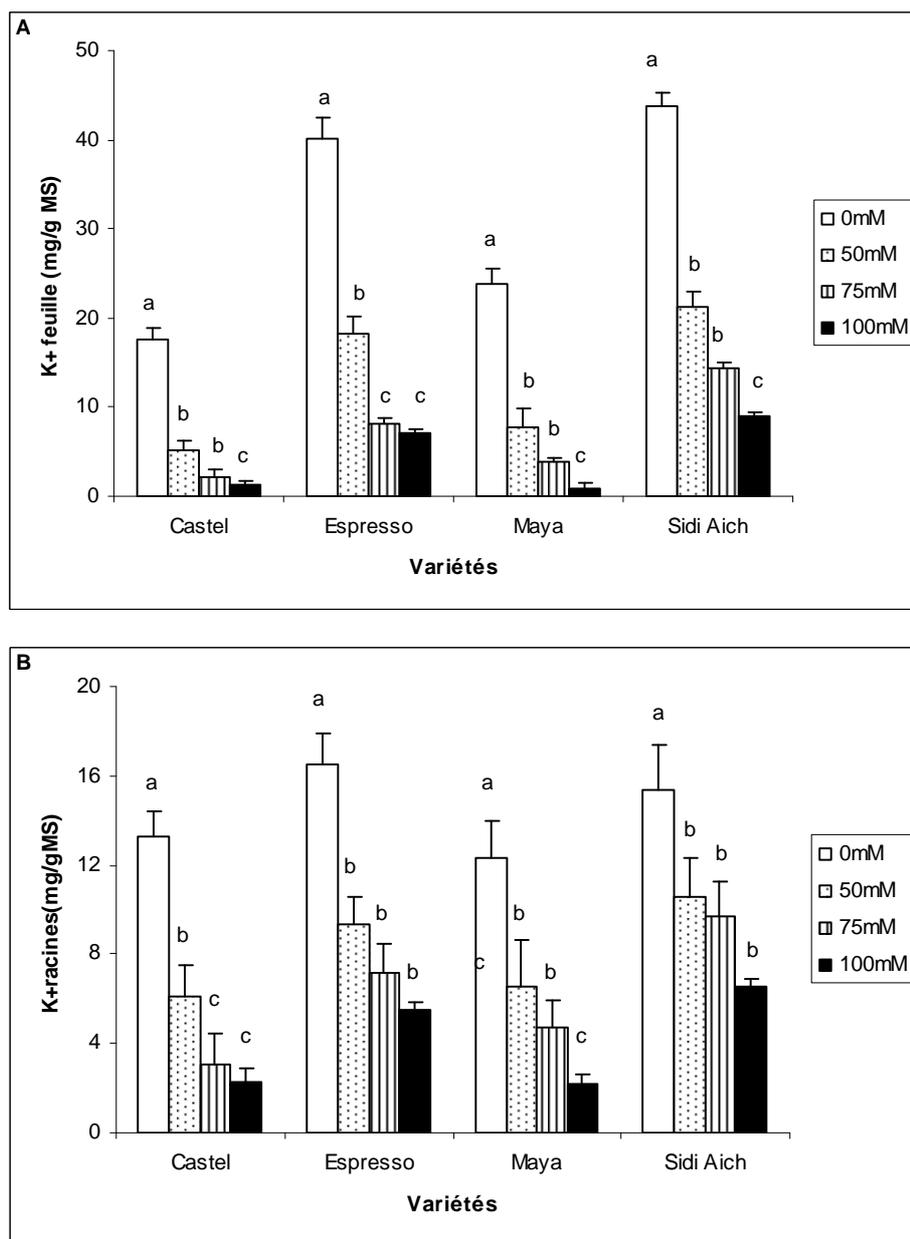
Lorsque le stress est de 50 mM, les teneurs en  $\text{Na}^+$  foliaires augmentent de 58% et 63% respectivement chez Sidi Aich et Espresso, alors que chez les variétés Castel et Maya une augmentation de 74% a été observée. Mêmes observations pour les racines, des augmentations de 41%, 49%, 57% et 79% ont été enregistrées chez Sidi Aich, Espresso, Maya et Castel respectivement.

Ces teneurs évoluent plus en présence de 100 mM NaCl, pour atteindre dans les feuilles des teneurs de 83 mg/g MS, 77 mg/g MS, 59 mg/g MS et 49 mg/g MS respectivement chez Maya, Castel, Espresso et Sidi Aich. Cette augmentation est constatée également dans les racines, des teneurs de l'ordre de 51 mg/g MS, 49 mg/g MS, 39 mg/g MS et 32 mg/g MS ont été enregistrées chez Maya, Castel, Espresso et Sidi Aich.

Tous traitements confondus, ce sont les variétés Castel et Maya qui ont accumulées les plus fortes teneurs en  $\text{Na}^+$  dans les feuilles et dans les racines.

L'analyse de la variance a révélé un effet très hautement significatif ( $P \leq 0,001$ ) du sel sur les teneurs en  $\text{Na}^+$  dans les feuilles et les racines des 4 variétés étudiées. Des différences entre les variétés sont hautement significatives pour les racines et significatives pour les feuilles. L'interaction variété x salinité est significative pour les deux organes ( $p \leq 0,05$ ) (Annexe, Tab.21,22).

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole



**Figure 16 : Variations des teneurs en K<sup>+</sup> dans les feuilles (A) et dans les racines (B) des 4 variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl).** Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions. Les barres verticales (barre d'erreur) représentent les ESM. Pour chaque variété, les histogrammes suivies de la même lettre ne sont pas différents significativement (p < 0,05)

La figure 16 montre que les teneurs en potassium obtenues dans les feuilles et les racines des plants témoins sont plus élevées que celles obtenues chez les plantes stressées.

En l'absence de sel, ce sont les variétés Sidi Aich et Espresso qui accumulent les plus fortes teneurs en K<sup>+</sup> dans les feuilles (43,68 et 40,17 mg/gMS respectivement) et dans les racines (15,33 et 16,47 mg/g MS respectivement).

L'application de 50 mM NaCl a réduit d'une façon significative les teneurs en K<sup>+</sup> des feuilles et des racines des 4 variétés. En effet, dans les feuilles des réductions de 71%, 67%, 54% et

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

51% ont été enregistrées chez les variétés Castel, Maya, Espresso et Sidi Aich. Alors, que dans les racines, ces teneurs en  $K^+$  ont été moins affectées, des baisses de 31%, 43%, 46%, et de 53% ont été observées chez Sidi Aich, Espresso, Maya et Castel respectivement.

À 100 mM NaCl, cette baisse s'accroît considérablement aussi bien dans les feuilles que dans les racines (Fig.16). Les plus faibles teneurs en  $K^+$  ont été enregistrées chez les variétés Castel et Maya présentant des teneurs foliaires de 1,32 et 0,81mg/g et racinaires de 2,24 et 2,2 mg/gMS respectivement. Les variétés Espresso et Sidi Aich moins affectées par le sel, ont affichés des teneurs foliaires de 7,02 et 8,97 mg/gMS et racinaires 5,53 et 6,57 mg/g respectivement.

L'analyse de la variance a montré un effet très hautement significatif ( $P \leq 0,001$ ) du sel sur les teneurs en  $K^+$  des feuilles et des racines des 4 variétés étudiées. Les différences entre variétés et l'interaction variété x salinité sont hautement significatives (Annexe, Tab.23,24).

**Tableau 6 : Effet du stress salin sur le rapport de sélectivité  $K^+/Na^+$  dans les feuilles et les racines des 4 variétés de féverole soumises à différentes concentrations salines (0, 50, 75 et 100 mM NaCl).**

Variétés	NaCl	$K^+/Na^+$	$K^+/Na^+$
	(mM)	racines	Feuilles
Castel	0	3.20 <sup>a</sup>	2.24 <sup>a</sup>
	50	0.37 <sup>b</sup>	0.16 <sup>b</sup>
	75	0.07 <sup>c</sup>	0.03 <sup>c</sup>
	100	0.04 <sup>c</sup>	0.01 <sup>c</sup>
Espresso	0	2.45 <sup>a</sup>	4.50 <sup>a</sup>
	50	0.72 <sup>b</sup>	0.75 <sup>b</sup>
	75	0.25 <sup>c</sup>	0.17 <sup>c</sup>
	100	0.14 <sup>c</sup>	0.11 <sup>c</sup>
Maya	0	2.07 <sup>a</sup>	2.35 <sup>a</sup>
	50	0.46 <sup>b</sup>	0.19 <sup>b</sup>
	75	0.12 <sup>c</sup>	0.05 <sup>c</sup>
	100	0.04 <sup>d</sup>	0.009 <sup>d</sup>
Sidi Aich	0	2.22 <sup>a</sup>	3.79 <sup>a</sup>
	50	0.89 <sup>b</sup>	0.77 <sup>b</sup>
	75	0.44 <sup>c</sup>	0.33 <sup>c</sup>
	100	0.20 <sup>c</sup>	0.18 <sup>d</sup>

Les valeurs sur la même colonne pour chaque variété, suivies de la même lettre ne sont pas différentes significativement ( $p < 0,05$ ).

En l'absence de sel, les feuilles et les racines des 4 variétés maintiennent un haut ratio  $K^+/Na^+$  (Tab.6). Ce ratio tend à diminuer avec l'augmentation de la contrainte saline chez les 4 variétés étudiées, en raison d'une plus grande accumulation du sodium dans les feuilles et

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

---

racines. Cette baisse s'accroît à 100mM NaCl, pour atteindre des valeurs très faibles dans les deux organes, des variétés Castel et Maya. Toutefois, tous traitements confondus, ce sont les variétés Sidi Aich et Espresso qui présentent des ratios les plus élevés.

### Discussion

La présence du chlorure de sodium dans le milieu, entraîne une absorption accrue de sodium par les plantes. Les résultats obtenus montrent que l'accumulation de Na<sup>+</sup> est supérieure dans les feuilles comparativement aux racines chez les 4 variétés. Toutefois, cette accumulation est plus importante chez les variétés Castel et Maya que chez les variétés Sidi Aich et Espresso. Cette variabilité dans la distribution de Na<sup>+</sup> au niveau des différents organes des plantes laisse indiquer que les variétés étudiées sont de types inclusifs. En effet, chez les plantes inclusives les flux de sodium sont essentiellement ascendants, et le sel est accumulé dans les parties aériennes au niveau des vacuoles (Levigneron *et al.*, 1995 ; Borsani *et al.*, 2003).

Des corrélations significatives et négatives entre la teneur en sodium et la matière sèche produite montrent que la diminution de cette dernière correspond à une augmentation de teneur en sodium des plantes. En effet, les variétés Espresso ( $r^2 = -0,56^*$ ) et Sidi Aich ( $r^2 = -0,58^*$ ) ont accumulé les plus faibles teneurs en Na<sup>+</sup>, elles sont les moins affectées par la salinité, ce qui est en accord avec les résultats de Tejera *et al.*, (2005) et Munns et Tester (2008) qui ont signalé, que les génotypes tolérants au sel accumulent moins de Na<sup>+</sup> dans les feuilles que les génotypes sensibles.

Les résultats obtenus indiquent que la présence de sel dans le milieu affecte l'absorption du potassium dans les deux organes chez les 4 variétés comparativement au témoin. Ces résultats sont en accord avec Murillo-Amador *et al.*, (2006) chez *Vigna unguiculata* et par Ben Salah *et al.* (2011) chez *Medicago ciliaris* qui ont noté une forte baisse des teneurs en K<sup>+</sup> en présence de NaCl. Cette diminution pourrait être expliquée par une compétition entre le Na<sup>+</sup> et le K<sup>+</sup> pour les mêmes sites de fixation apoplasmiques (Haoula *et al.*, 2006).

Les teneurs foliaires et racinaires K<sup>+</sup> sont moins affectées chez les variétés Espresso et Sidi Aich. Cette caractéristique est retrouvée généralement chez les espèces où la teneur élevée en K<sup>+</sup> est corrélée avec la tolérance au sel (Tal, 1986). Hamrouni *et al.*, (2011) suggèrent que l'efficacité d'absorption et d'utilisation du K<sup>+</sup> qui agit comme un osmoticum, est capitale dans l'adaptation au stress salin.

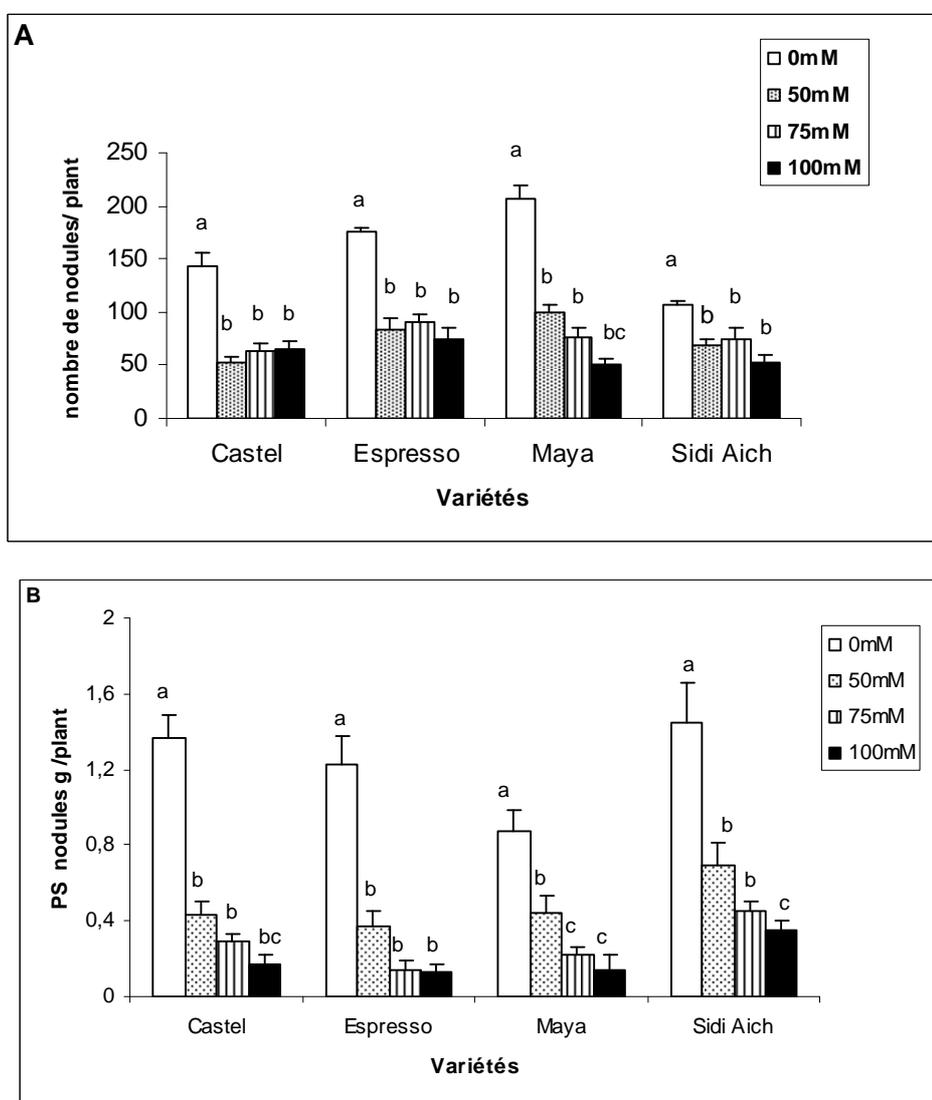
## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

Les résultats du rapport de sélectivité  $K^+/Na^+$ , ont montré qu'en l'absence de sel, ce rapport est plus élevé dans les feuilles que dans les racines. En revanche, ce ratio diminue dans les deux organes des quatre variétés suite à l'augmentation de la salinité, indiquant ainsi que la teneur en  $Na^+$  surpasse toujours celle du  $K^+$ , suite à une forte compétition entre ces deux cations (Murillo-Amador *et al.*, 2006).

### 3.2.6. Caractères symbiotiques

#### - Nombre et poids sec des nodules

La figure 17 montre que le stress salin induit une diminution du nombre et du poids sec des nodules des quatre variétés testées. Toutefois, cette diminution est plus importante au niveau des poids sec des nodules.



**Figure 17 : Variations du nombre (A) et du poids sec des nodules (B) chez les quatre variétés soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl). Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions. Les barres verticales (barre d'erreur) représentent les ESM. Pour chaque variété, les histogrammes suivies de la même lettre ne sont pas différents significativement ( $p < 0,05$ ).**

Un total maximal de nodules formés est observé chez le témoin Maya (207,4 nodules/plant) avec un poids sec moyen de 0,87g/plant tandis que le nombre moyen de nodules comptés chez le témoin Sidi Aich est de 107, 2 nodules / plant pour un poids sec moyen de 1,45g/plant.

La nodulation est sévèrement affectée par la salinité. Une diminution à la fois du nombre et du poids sec des nodules chez les quatre variétés est observée dès l'apport de 50 mM de NaCl (Fig.17). La diminution du nombre de nodules est enregistrée chez les 4 variétés comparativement au témoin, avec des réductions maximales à 100 mM NaCl de 50%, 54%, 57% et 75% chez Sidi Aich, Castel, Espresso et Maya respectivement.

Les résultats obtenus montrent que le nombre moyen de nodules chez les variétés Sidi Aich Espresso et Castel par plant s'accroît en passant d'une concentration saline à une autre. Cependant, cette augmentation ne présente aucune différence significative ( $P \geq 0,05$ ).

La présence de sel dans le milieu réduit fortement les poids sec des nodules, atteignant à 100 mM NaCl, des pourcentages de réductions maximales de 75%, 83%, 87% et 89% chez Sidi Aich, Maya, Castel et Espresso respectivement.

Tous traitements confondus, c'est la variété Maya qui a formé le plus grand nombre de nodules (108,55 nodules / plant) tandis que la variété Sidi Aich le plus faible (75,60 nodules / plant). En revanche, les meilleurs poids sec nodulaires sont enregistrés chez la variété Sidi Aich soit 0,73g/ nodule, contre 0,41 g/nodule chez la variété Maya.

L'analyse de la variance montre que la présence de NaCl dans le milieu entraîne une baisse très hautement significative du nombre et du poids sec des nodules ( $p \leq 0,001$ ) chez toutes les variétés. L'effet variété et l'interaction variété x salinité sont très hautement significatifs dans le cas du nombre de nodules et significatif ( $p \leq 0,05$ ) pour le poids sec des nodules (Annexe, Tab.25,26).

## **Discussion**

L'effet dépressif du stress salin se traduit par une réduction du nombre et du poids sec des nodules chez les 4 variétés.

Cet effet sur la nodulation chez *Vicia faba* a été aussi rapporté par Delgado *et al.*, (1993), Gaballah et Gomaa (2005), et Bibi *et al.*,(2012) qui ont noté une diminution du nombre et du poids sec des nodules en présence de faibles concentrations en sel dans le milieu.

## **Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

---

Nos résultats rejoignent aussi ceux obtenus par Bouhmouch *et al.*, (2005), qui ont observé sur deux cultivars de haricot, en présence de 25mM NaCl une diminution de 50% et de 94% du nombre et du poids sec des nodules respectivement. Ces auteurs attribuent la diminution du poids sec à une réduction du nombre et de la taille des nodules.

Saadallah *et al.*, (2001) et Ben Salah *et al.* (2011) indiquent que la diminution du nombre et de la croissance nodulaire sont associées à une inhibition de l'initiation et la formation de nouveaux nodules suite au stress salin. Ce dernier peut réduire les sites potentiels d'infection résultant d'une inhibition de l'émergence et de l'élongation des poils absorbants et de la croissance du système racinaire, et par conséquent une faible colonisation des rhizobia (Delgado *et al.*, 1994 ; El Nady et Bellal, 2005 ; Fahmi *et al.*, 2011).

Chez les 4 variétés, ce résultat (Fig.17) peut trouver également son explication, dans l'échec du processus de nodulation suite à une inhibition de la courbure des poils absorbants et de la formation du cordon d'infection. En effet, Zahran et Sprent (1986) ont signalé que dans le cas de *Vicia faba* L., la courbure du poil absorbant et la colonisation bactérienne ont été réduites en présence de 100 mM de Na Cl, tandis que la proportion des poils absorbants contenant des cordons d'infection a été réduite de 30%.

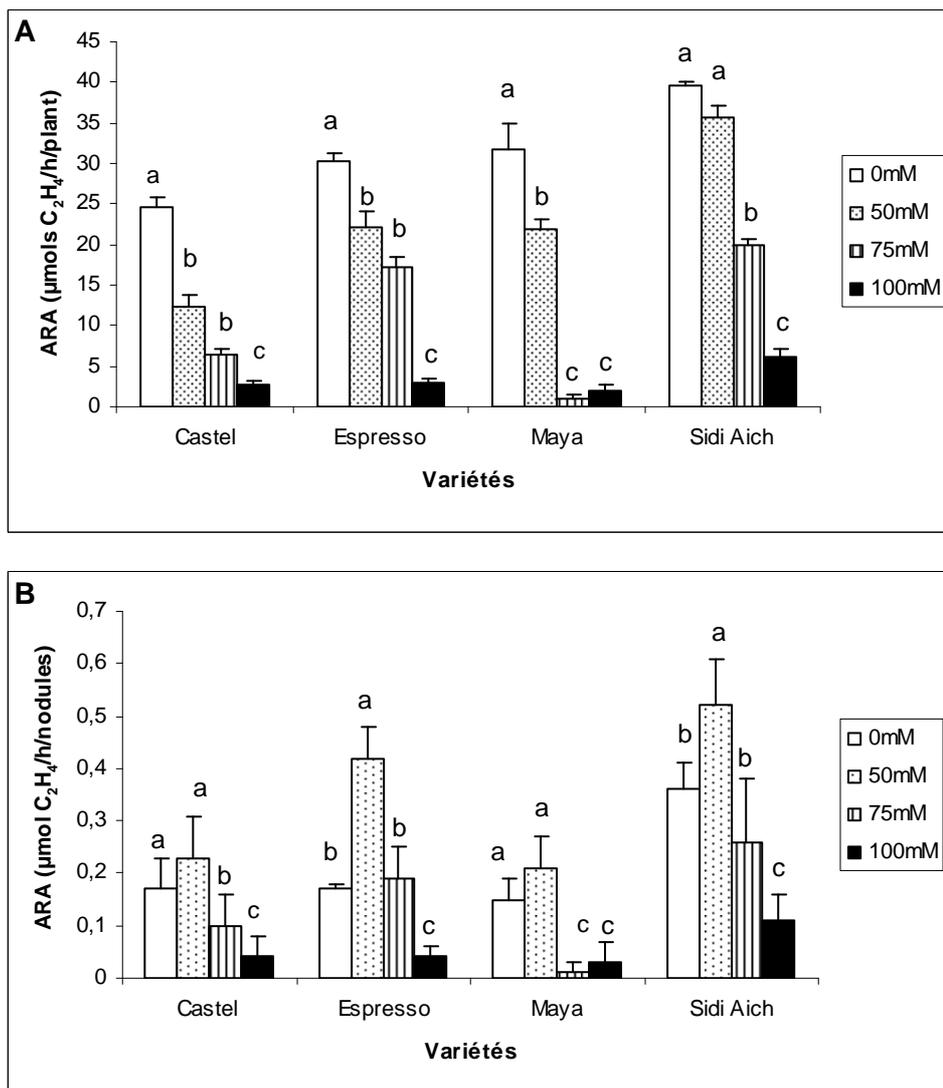
Les résultats obtenus (Fig.17) montrent une réduction du poids sec plus importante que celle du nombre de nodules chez les 4 variétés testées, indiquant ainsi que l'inhibition du sel ne concerne pas uniquement le processus de la nodulation mais également sur la croissance nodulaire.

### ***-Activité réductrice d'acétylène (ARA)***

Les résultats illustrés dans la figure 18A montrent que l'activité réductrice d'acétylène par plante diminue significativement pour les quatre variétés avec l'augmentation du degré de salinité.

Chez les plants témoin sans sel, l'activité réductrice d'acétylène la plus élevée est enregistrée chez la variété Sidi Aich avec  $39,5 \mu\text{mols C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$ , alors que la plus faible est observée chez la variété Castel avec  $24,5 \mu\text{mols C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$ .

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole



**Figure 18 : Variations de l'ARA/plante (A) et de l'ARA/nodule (B) chez quatre variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl).** Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions. Les barres verticales (barre d'erreur) représentent les ESM. Pour chaque variété, les histogrammes suivies de la même lettre ne sont pas différents significativement ( $p < 0,05$ ).

La présence de sel dans l'eau d'irrigation (50 mM NaCl) entraîne une baisse de l'activité nitrogénasique par plante de 26%, 30% et 49% chez les variétés Espresso, Maya et Castel respectivement. La variété Castel semble être la plus affectée par cette concentration, contrairement à la variété Sidi Aich moins sensible, l'ARA/plante ne présente aucune différence significative avec le témoin ( $p \geq 0,05$ ).

À 100 mM NaCl, l'activité nitrogénasique est fortement réduite pour toutes les variétés comparativement au témoin, des taux de réductions de 83%, 88%, 89% et 93% ont été enregistrés respectivement chez Sidi Aich, Castel, Espresso et Maya.

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

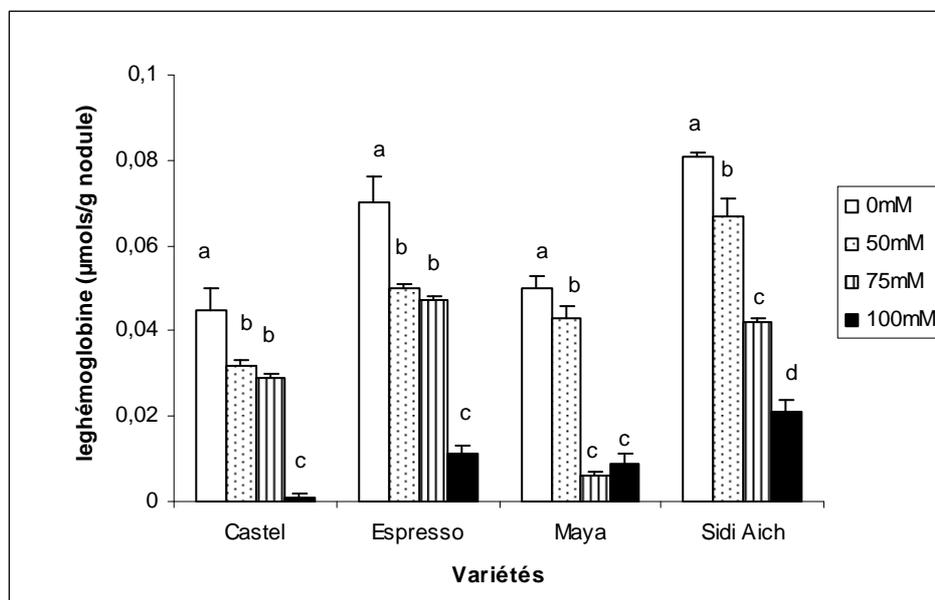
Des variations importantes de l'ARA nodulaire sont également observées (Fig.18) en présence de sel. Les variétés Espresso et Sidi Aich montrent des ARA nodulaire plus importantes en présence de 50mM NaCl, avec 0,42 et 0,52  $\mu\text{mols C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ nodules}^{-1}$  respectivement. Par contre, cette activité ne présente pas de différence significative entre le témoin et le traitement 75mM NaCl. L'activité nitrogénasique des nodules chez les variétés Castel et Maya, est similaire chez le témoin et en présence de 50mM NaCl avec 0,23 et 0,21  $\mu\text{mols C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ nodules}^{-1}$ .

En présence de 100mM NaCl, l'ARA/nodule diminue de 80% chez Castel, de 76% chez Espresso et Maya et de 69% chez Sidi Aich.

L'analyse de la variance montre que la présence de NaCl dans le milieu entraîne une baisse très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de l'activité réductrice d'acétylène par plant et par nodule chez toutes les variétés étudiées. L'effet variété et l'interaction variété x salinité sont également très hautement significatifs (Annexe, Tab.27,28).

### -Teneurs en leghémoglobine

Les teneurs en leghémoglobine diminuent significativement pour les quatre variétés avec l'augmentation du degré de salinité comparativement au témoin (Fig. 19).



**Figure 19 : Variation des teneurs en leghémoglobine chez quatre variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM NaCl).** Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions. Les barres verticales (barre d'erreur) représentent les ESM. Pour chaque variété, les histogrammes suivies de la même lettre ne sont pas différents significativement ( $p < 0,05$ ).

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

---

Les variétés Sidi Aich et Espresso enregistrent les plus fortes teneurs en leghémoglobine (0,08 et 0,07  $\mu\text{mols/g}$  nodule respectivement), suivies des variétés Maya et Castel (0,05 et 0,04  $\mu\text{mols/g}$  nodule respectivement).

En condition de stress salin (50mM NaCl), des baisses significatives de 14%, 16%, 28% et 28% ont été enregistrées chez Maya, Sidi Aich, Espresso et Castel respectivement.

À 75 mM NaCl, les variétés Sidi Aich et Castel semblent être les plus affectées, elles enregistrent respectivement des baisses de 48% et 88% par rapport aux témoins respectifs. Alors que les variétés Castel et Espresso maintiennent les mêmes teneurs que celles observées à 50 mM NaCl (Fig. 19).

Lorsque le stress est de 100 mM NaCl, la teneur en leghémoglobine est négligeable chez la variété Castel puisqu'une réduction de 97% est enregistrée par rapport au témoin. Une réduction de 84%, 82% et 74% est également notée chez Espresso, Maya et Sidi Aich.

Tous traitements confondus c'est la variété Sidi Aich qui maintient la plus forte teneur en leghémoglobine ( $5,31.10^{-2}$   $\mu\text{mols/g}$  nodule) suivie de la variété Espresso ( $4,48.10^{-2}$   $\mu\text{mols/g}$  nodule), Maya ( $2,86.10^{-2}$   $\mu\text{mols/g}$  nodule) et Castel ( $2,71.10^{-2}$   $\mu\text{mols/g}$  nodule).

L'analyse de la variance montre que la présence de NaCl dans le milieu entraîne une baisse très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) des teneurs en leghémoglobine des 4 variétés testées. L'effet variété et l'interaction variété x salinité sont également très hautement significatifs (Annexe, Tab.29).

### Discussion

La salinité induit une diminution de l'activité nitrogénasique chez toutes les variétés avec l'augmentation du degré de salinité. Toutefois, une variabilité de réponses a été observée en présence de sel.

La sensibilité de la fixation symbiotique au sel a été signalée par plusieurs auteurs et chez de nombreuses espèces *Vicia faba* (Delgado *et al.*, 1994; Cordovilla *et al.*, 1999 ); *Phaseolus vulgaris* (Khadri *et al.*, 2007) ; *Medicago ciliaris* (Ben Salah *et al.*, 2011). La baisse de la fixation d'azote observée chez nos 4 variétés pourrait trouver son explication dans la diminution de la différenciation des cellules de rhizobia en bactéroïdes (Bolanos *et al.*, 1993) et/ou dans l'inhibition de l'activité de la nitrogénase sous l'effet du sel ( Bolanos *et al.*, 2006 ; Khadri *et al.*, 2007).

La limitation de la fixation symbiotique de l'azote pourrait être due également à la diminution des photosynthétats fournis par les feuilles pour les nodules (Delgado *et al.*, 1994 ; Garg et

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

---

Singla, 2004 ; Lopez *et al.*, 2008) et/ou à la réduction des substrats pour la respiration des bactéroïdes (Serraj *et al.*, 1994). Ceci est démontré par les corrélations positives et significatives obtenues entre l'activité réductrice d'acétylène et les teneurs en chlorophylle totale chez Castel ( $r^2 = 0,88^{**}$ ), Maya ( $r^2 = 0,88^{**}$ ), Sidi Aich ( $r^2 = 0,57^{**}$ ) et Espresso ( $r^2 = 0,52^{**}$ ).

Des résultats obtenus, nous relevons qu'à la concentration 50 mM NaCl une relation inversement proportionnelle entre le taux de nodulation et l'activité réductrice d'acétylène traduisant une compensation de la nodulation par une meilleure activité nitrogénasique. En effet, lorsque le nombre de nodule est réduit, la portion de photosynthétats allouée par la plante à la symbiose est plus importante, ce qui permet aux bactéroïdes d'avoir une meilleure activité nitrogénasique (Streeter, 1988).

La réduction de la fixation d'azote est associée également à une diminution des teneurs en leghémoglobine, plus importante chez les variétés Castel et Maya. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Sheokands *et al.*, (2000) qui ont noté chez le pois chiche une baisse plus importante de l'ARA accompagnée d'une forte réduction des teneurs en leghémoglobine sous l'effet de 80 mM NaCl. Pladys et Rigaud (1985) attribuent cette diminution des teneurs en leghémoglobine à une protéolyse, conduisant ainsi à une sénescence accélérée des nodules (Mugdal *et al.*, 2010). Ceci se manifeste par des changements structuraux tels que la réduction de la taille, de la zone méristématique et de l'espace intercellulaire du nodule ainsi que la dégradation du symbiosome (Sheokands *et al.*, 2000). Des corrélations positives et significatives entre l'ARA et les teneurs en leghémoglobine sont notées chez Castel ( $r^2 = 0,81^{**}$ ), Maya ( $r^2 = 0,81^{**}$ ), Espresso ( $r^2 = 0,94^{**}$ ) et Sidi Aich ( $r^2 = 0,97^{**}$ ) montrant ainsi l'étroite relation existante entre l'ARA et la leghémoglobine. En effet, chez le lupin tolérant au sel, la fixation d'azote est maintenue à des niveaux appréciables en raison de la faible réduction des teneurs en leghémoglobine (Fernández-Pascual *et al.*, 1996).

Les travaux de Serraj *et al.* (1994) et de Soussi *et al.* (1998) ont attribué la réduction de l'activité nitrogénasique à une diminution de la respiration des nodules suite à une baisse de la conductance nodulaire à l'O<sub>2</sub>.

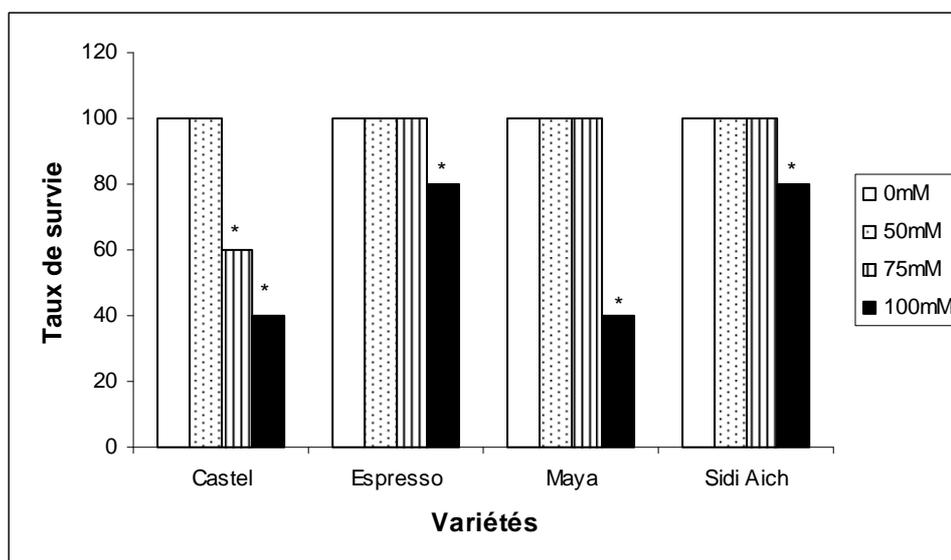
La comparaison des moyennes a permis de classer les variétés selon l'activité nitrogénasique indiquée par l'ARA comme suit : **Castel** □ **Maya** □ **Espresso** □ **Sidi Aich**. En effet, la variété Sidi Aich s'est montrée la moins affectée par le sel, suivie de la variété Espresso. Ce

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

qui semble confirmer, du point de vue tolérance, la supériorité de ces deux espèces par rapport aux deux autres. Une tolérance qui s'est traduite par une meilleure production de matière sèche. Ces constatations sont confirmées par des corrélations significatives et positives entre la fixation d'azote et la matière sèche produite obtenues chez Castel ( $r^2 = 0,91^{**}$ ), Maya ( $r^2 = 0,76^{**}$ ), Espresso ( $r^2 = 0,80^{**}$ ) et Sidi Aich ( $r^2 = 0,83^{**}$ ).

### 3.2.7. Détermination de la capacité de survie

Après 8 semaines de stress, le pourcentage de survie est déterminé chez les 4 variétés étudiées. Les résultats obtenus indiquent que la capacité de survie des plants diminue avec le sel. Cependant, cet effet dépressif du sel dépend de la concentration en NaCl et de la variété (Fig. 20).



**Figure 20 : Variation du taux de survie chez quatre variétés de féverole soumises à un stress salin (0, 50, 75 et 100 mM).**

En effet, pour toutes les variétés, ce taux est maximal chez les plants témoins et en présence de 50 mM et 75 mM NaCl, sauf pour la variété Castel. Nos résultats indiquent que le taux de mortalité des plantes devient significatif chez la variété Castel à partir de la concentration 75mM NaCl ou il atteint 40% par rapport au témoin, alors que pour les autres variétés aucune mortalité n'a été observée. En revanche, la concentration de 100 mM NaCl a pu discriminer le degré de sensibilité des variétés, un taux de mortalité de 20% chez les variétés Sidi Aich et Espresso contre 60% chez les variétés Maya et Castel.

## **Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

---

Selon la capacité de survie des 4 variétés soumises à des concentrations de 100 mM NaCl, nous pouvons classer ces dernières en deux groupes :

- le premier groupe constitué des variétés Espresso et Sidi Aich moins affectées par le sel, caractérisées par un taux de survie de 80%.
- le deuxième groupe composé des variétés Maya et Castel, plus sensibles qui enregistrent un taux de survie de 40%.

### **Discussion**

Nos résultats montrent que la capacité de survie des variétés de féverole dépend de la concentration du milieu en NaCl et de la variété. La mortalité des plantes est d'autant plus précoce que la concentration du milieu en NaCl est élevée. La comparaison des variétés sur la base de leur capacité de survie en milieu salin fait ressortir une sensibilité particulière des variétés Castel et Maya. En effet, des symptômes de jaunissement et de nécroses ont été relevés chez toutes les variétés, mais ils sont plus accentués chez les variétés Maya et Castel. Slabu *et al.* (2009) montrent que ces chloroses et tâches nécrotiques seraient dus à une toxicité des ions  $\text{Cl}^-$  accumulés à des niveaux excédant la capacité de compartimentation dans la vacuole. Selon Abdelly (1997), l'accumulation appoplasmique des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  serait le paramètre le plus impliqué dans le flétrissement et la mortalité de certaines espèces de *Medicago* soumises au stress salin. En effet des résultats précédants, ce sont les variétés Castel et Maya qui ont accumulé les plus fortes teneurs en  $\text{Na}^+$  (Fig. 20).

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Murillo-Amador *et al.*, (2006) sur des génotypes de *Vigna unguiculata* qui montrent que les génotypes sensibles (37,5% de survie) et modérément sensibles (75% de survie ) au sel, sont celles qui accumulent le plus d'ions  $\text{Na}^+$  dans leurs feuilles.

La mortalité des plants observée chez nos variétés pourrait être expliquée également par une perturbation de l'alimentation hydrique et d'une inhibition du métabolisme (Flowers et Yeo, 1981).

### **3.2.8. Les composantes du rendement**

Les résultats obtenus montrent que l'augmentation de la salinité induit une diminution des composantes du rendement des quatre variétés testées (Tab.7).

**Tableau 7 : Composantes du rendement des 4 variétés de féverole, soumises à différentes concentrations en NaCl (0mM, 50mM, 75mM et 100 mM NaCl).**

Variétés	NaCl (mM)	Graines/ gousse	Gousses/ Plant	Poids 100 grains (g)
Castel	0	3.00±0.16 <sup>a</sup>	22.8±3.58 <sup>a</sup>	43.78±1.74 <sup>a</sup>
	50	2.54±0.13 <sup>a</sup>	11.2±1.83 <sup>b</sup>	37.39±0.66 <sup>a</sup>
	75	1.5±0.62 <sup>ab</sup>	4.4±1.11 <sup>c</sup>	25.12±2.97 <sup>b</sup>
	100	0.86±0.12 <sup>b</sup>	1.2±0.71 <sup>d</sup>	14.46±1.85 <sup>c</sup>
Espresso	0	3.4±0.21 <sup>a</sup>	27±1.56 <sup>a</sup>	48.13±3.31 <sup>a</sup>
	50	3.00±0.16 <sup>a</sup>	13.8±1.65 <sup>b</sup>	43.42±2.03 <sup>a</sup>
	75	3.08±0.20 <sup>a</sup>	11±0.58 <sup>b</sup>	33.87±3.65 <sup>ab</sup>
	100	1.94±0.70 <sup>b</sup>	6.60±0.39 <sup>c</sup>	27.70±5.33 <sup>b</sup>
Maya	0	3.92±0.13 <sup>a</sup>	28.2±1.56 <sup>a</sup>	57.36±1.07 <sup>a</sup>
	50	3.16±0.19 <sup>a</sup>	8.60±1.02 <sup>b</sup>	27.43±3.08 <sup>b</sup>
	75	2.77±0.18 <sup>a</sup>	4.80±0.58 <sup>c</sup>	22.86±2.99 <sup>b</sup>
	100	0.60±0.17 <sup>b</sup>	2.40±0.35 <sup>c</sup>	3.43±0.43 <sup>c</sup>
SidiAich	0	2.96±0.21 <sup>a</sup>	27.2±2.99 <sup>a</sup>	74.58±2.80 <sup>a</sup>
	50	2.44±0.07 <sup>b</sup>	16,3±0.58 <sup>b</sup>	48.34±5.87 <sup>b</sup>
	75	2.06±0.14 <sup>b</sup>	12.60±0.59 <sup>b</sup>	45.15±2.49 <sup>b</sup>
	100	2.16±0.19 <sup>b</sup>	8.40±0.50 <sup>c</sup>	40.23±2.09 <sup>b</sup>

Les résultats sont représentés par les valeurs moyennes ± l'ESM. Les valeurs sur la même colonne pour chaque variété, suivies par la même lettre ne sont pas différentes significativement ( $p < 0,05$ ).

**- Le nombre moyen de graines par gousse**

Le nombre moyen de graines des variétés Espresso et Maya n'est pas affecté par les concentrations 50mM et 75mM NaCl, aucune différence significative ( $p \geq 0,05$ ) n'a été observée entre ces traitements et le témoin (Tab.7). En revanche, chez la variété Sidi Aich ce nombre diminue dès 50 mM NaCl, pour atteindre une baisse maximale à 100 mM NaCl de 27% par rapport au témoin. L'effet du sel se fait sentir à 75 mM chez la variété Castel, où son nombre moyen de graines chute de 50% par rapport au témoin.

Lorsque le stress est de 100 mM NaCl, des baisses de 42%, 71% et 84% sont enregistrées respectivement chez Espresso, Castel et Maya.

## **Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

---

### ***- Le nombre de gousses par plante***

En l'absence de sel, nos 4 variétés forment le plus grand nombre de gousses soit 22,8, 27, 27,2 et 28,2 gousses/ plant chez Castel, Espresso, Sidi Aich et Maya respectivement (Tab.7).

Lorsque le stress est de 50 mM NaCl, le nombre de gousses chute de 69%, 50%, 48% et 40% chez les variétés Maya, Castel, Espresso et Sidi Aich respectivement.

Cette baisse s'accroît avec 100 mM NaCl chez les 4 variétés. En effet, le plus faible nombre de gousses est enregistré respectivement chez les variétés Castel et Maya avec seulement 1,2 et 2,4 gousses/ plant contre 6,6 et 8,4 gousses/plant chez Espresso et Sidi Aich respectivement.

L'analyse de la variance montre un effet très hautement significatif ( $p \leq 0,001$ ) du sel sur le nombre moyen des graines/gousse et le nombre de gousses/ plant chez les 4 variétés. L'effet variété et l'interaction variété x salinité sont significatifs ( $p \leq 0,05$ ) pour les deux paramètres. (Annexe, Tab.30,31).

### ***- Le poids de 100 graines***

Les résultats obtenus montrent que le poids de 100 graines diminue significativement pour les 4 variétés en présence de sel (Tab.7). À 50 mM NaCl, une réduction de 52% et 37% est observée chez Maya et Castel. Ces taux de réductions ne présentent pas de différences significatives avec ceux obtenus à 75mM NaCl. En revanche, le poids de 100 graines de la variété Espresso n'a pas été affecté par 50 mM NaCl.

En présence de 100 mM NaCl, des baisses maximales de 66% et 84% ont été observées chez les variétés Castel et Maya respectivement, contre une baisse de 42% et 46% chez Espresso et Sidi Aich respectivement.

L'analyse de la variance montre un effet très hautement significatif ( $p \leq 0,001$ ) du sel sur le poids de 100 graines chez les 4 variétés. L'effet variété et l'interaction variété x salinité sont également très hautement significatifs (Annexe, Tab.32).

## **Discussion**

La tolérance au sel est généralement déterminée en terme de croissance ou de rendement en réponse à l'accroissement de la salinité dans le milieu de culture (Maas *et al.*, 1996).

Nos résultats relatifs aux 4 variétés de féverole soumises à différentes concentrations salines, montrent que les composantes du rendement sont affectées par la salinité. Ils sont similaires à ceux rapportés dans la littérature par Al-Tahir et Al-Abdusalam (1997), Katerji *et al.* (2002),

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

---

Gabbalah et Gomaa (2005) et Bibi *et al.*, (2012) qui ont noté sur *Vicia faba* une diminution des composantes du rendement sous l'effet du stress salin.

Les résultats indiquent que le nombre de gousses est plus affecté par le sel que le nombre de grains et le poids de 100 graines. À l'exception de la variété Maya, où le poids de 100 graines est également fortement réduit à 100 mM NaCl.

De Pascale et Barbier (1997) ont également montré sur *Vicia faba* une baisse de 48% du nombre de gousses et de 67% du rendement en grain, attribuant ainsi cette baisse à une réduction du poids et du nombre de grain. Par ailleurs, Al-Tahir et Al-Abdusalam (1997) ont montré sur la même espèce que la salinité affecte le rendement et le nombre de grain mais n'affecte pas le poids du grain. Des corrélations effectuées entre le poids de 100 graines et le nombre de gousses/ plant ainsi que le nombre de graines et le rendement en grains, montrent que chez les variétés Sidi Aich ( $r^2= 0, 87^{**}$ ,  $r^2= 0,50^*$  respectivement) et Maya ( $r^2= 0,90^{**}$ ,  $r^2= 0,84^*$  respectivement) la réduction du rendement est liée à la diminution du nombre de gousses et du nombre de grains. Alors que chez la variété Espresso, seule une corrélation de ( $r^2= 0, 55^*$ ) a été notée entre le nombre de gousses et le poids de 100 graines. Tandis que le poids de 100 graines de la variété Castel semble être corrélé avec le nombre de grains ( $r^2= 0, 48^*$ ).

Katerji *et al.*, (2002) attribuent la réduction du rendement en grains chez *Vicia faba* sous l'effet du stress salin à une diminution du nombre de fleurs formant les gousses, au nombre de gousses et au nombre de graines par gousse.

Nos résultats indiquent que la réduction du poids de 100 graines pourrait être liée à une diminution de l'approvisionnement des graines en photosynthétats (Ahmad *et al.*, 2005 ; Mohsen *et al.*, 2013). En effet, nos résultats montrent que le stress salin a induit une réduction de la surface foliaire et des teneurs en pigments photosynthétiques, ce qui se traduit par une baisse de l'offre des photoassimilats aux gousses, affectant le remplissage des graines.

Mohamed et El Kramany (2005) suggèrent que la salinité accélère la maturation des graines, limitant ainsi la période de développement des graines et le remplissage des gousses, ce qui réduit le poids des 100 graines. Le rendement en grains des variétés Sidi Aich et Espresso est moins affecté par le sel, elles affichent des réductions ne dépassant pas les 50%. Tandis que les variétés Maya et Castel plus sensibles au sel, enregistrent des baisses de 82% et 66% respectivement (Tab.7).

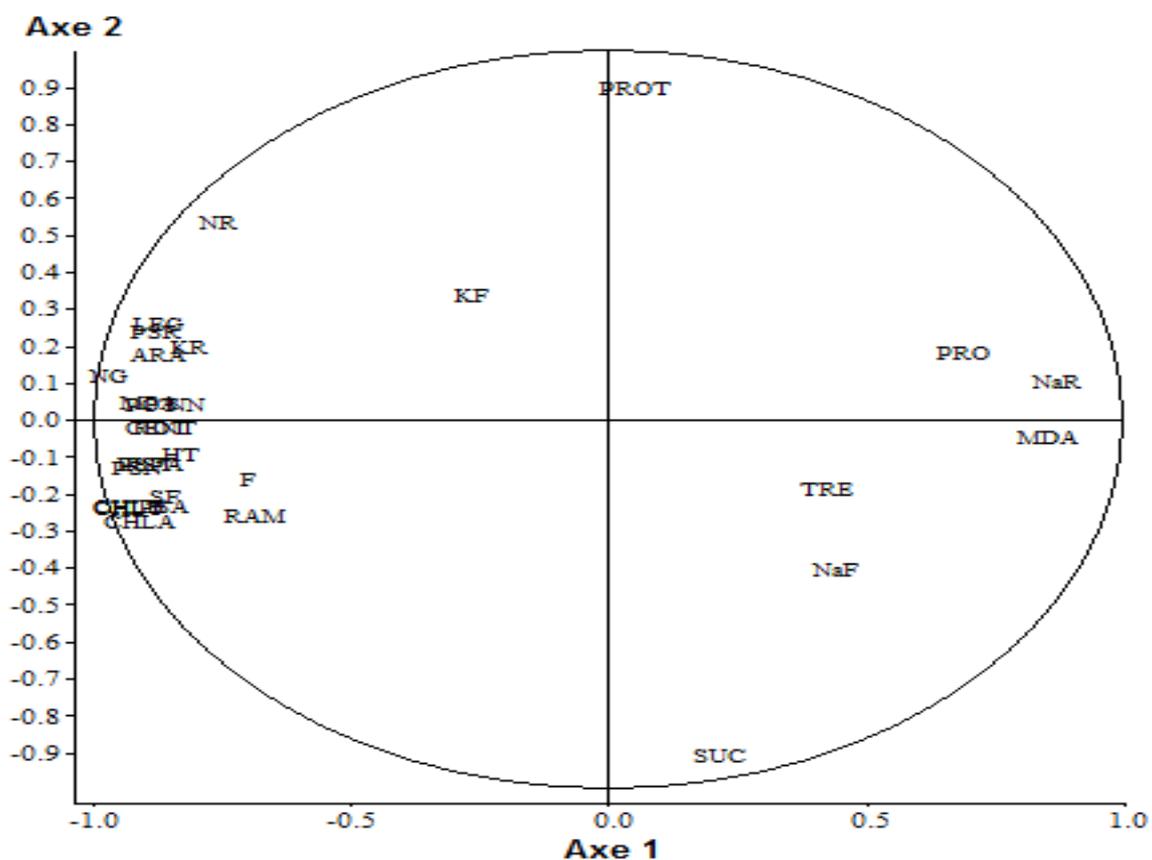
Munns *et al.*, (2006) ont indiqué que la salinité induit des réductions de la surface foliaire et de la photosynthèse, qui ont pour effet la réduction de la croissance et le rendement des

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

cultures. Des corrélations significatives et positives ont été obtenues entre le poids de 100 graines et la matière sèche produite chez Espresso ( $r^2= 0, 64^{**}$ ), Maya ( $r^2= 0, 85^{**}$ ), Sidi Aich ( $r^2= 0, 83^{**}$ ) et Castel ( $r^2= 0, 80^{**}$ ).

### 3.3. Analyse en composantes principales (ACP)

Afin de déterminer la nature et le degré de divergence entre les quatre variétés de féverole vis-à-vis de la tolérance au stress salin, une analyse en composantes principales (ACP) et une classification hiérarchique ont été effectuées sur les différents paramètres étudiés.

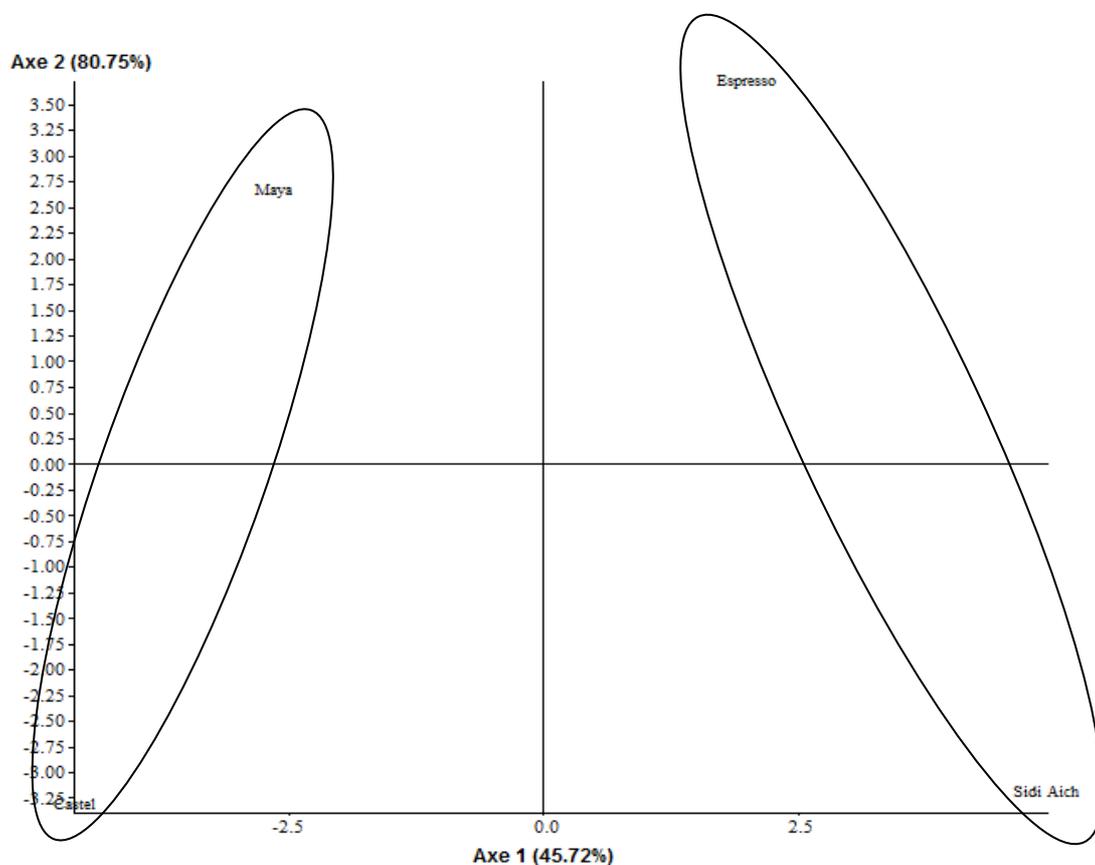


**Figure 21 : Analyse en composantes principales représentant le cercle des corrélations entre les différents paramètres en fonction des quatre niveaux de traitement salin (0mM, 50 mM, 75mM et 100 mM NaCl).**

Seuls les deux premiers axes de l'ACP (Figure 21) expriment 71,10% de la variabilité. L'axe I (facteur 1) a absorbé 62.4% de la variation, cet axe associe les paramètres suivants: HT (Hauteur des plantes), SF (Surface foliaire), TRE (Teneur relative en eau), RAM (Nombre de ramifications), F (Nombre de feuilles), PSN (Poids sec des nodules), NN (Nombre de nodules), MPA (Potentiel hydrique foliaire),

## Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole

RDT (poids de 100 graines), CHTOT (Chlorophylle totale), CHLB (Chlorophylle b), CHLA (Chlorophylle a), PST (Poids sec total), PSA (Poids sec de la partie aérienne), PSR (Poids sec de la partie racinaire), ARA (Activité réductrice d'acétylène), NR (Activité nitrate réductase), MDA (Teneurs en malondialdèhyde), LEG (Teneurs en leghémoglobine), PRO (Teneurs en proline), KR (Teneurs en  $K^+$  dans les racines), NaF (Teneurs en  $Na^+$  dans les feuilles), NaR (Teneurs en  $Na^+$  dans les racines) et le NG ( Nombre de gousses). Ces dernières variables participent à 62% de la formation de l'axe 1. L'axe 2 qui a expliqué 9,2% de la variation, définit les variables SUC (Teneurs en sucres), PROT (Teneurs en protéines) et KF (Teneurs en  $K^+$  dans les feuilles), qui ont contribué à 72.5% de la variation (Figure).



**Figure 22: Représentation graphique de la distribution spatiale des quatre variétés de féverole dans le plan 1-2 d'une analyse en composantes principales sous les différents niveaux de salinité.**

La projection des points moyens des quatre variétés étudiées sur le plan défini par les axes 1 et 2 a montré leur réponse au stress salin en fonction des paramètres étudiés (Fig.22). Suivant l'axe 1, deux regroupements plus homogènes, d'une part entre la variété Maya et Castel et d'autre part, entre la variété Espresso et Sidi Aich. Ces derniers confirment le même comportement de tolérance ou de sensibilité au stress salin chez chaque couple de variétés

## **Chapitre II : Effet du stress salin sur la germination, la croissance, la symbiose et le rendement de 4 variétés de féverole**

---

homogènes. En effet, une opposition nette est observée entre la variété Maya et Espresso, ainsi qu'entre la variété Castel et Sidi Aich par rapport à l'axe 2.

### **Conclusion**

L'effet du NaCl sur la germination, la croissance, le développement des nodules, la fixation symbiotique de l'azote et les composantes du rendement, a été étudié chez quatre variétés de féverole, Castel, Maya, Espresso et Sidi Aich. Ces paramètres ont été évalués pour déterminer leur niveau de tolérance vis-à-vis du stress salin.

Le test de germination permet de classer les quatre variétés en deux groupes significativement différents en comparant leur taux de germination moyen. Le premier groupe formé des variétés Castel, Espresso et Maya, tolérantes au sel, et le deuxième groupe constitué de la variété Sidi Aich moyennement tolérante.

Les résultats de la production de matière sèche aérienne et racinaire a scindé les 4 variétés étudiés en deux groupes : un groupe à croissance très affectée, constitué des variétés Maya et Castel et un autre groupe à croissance moins affectée, formé par Sidi Aich et Espresso. Ce classement est appuyé et affiné par l'indice de sensibilité relative au sel.

La teneur en proline augmente avec les concentrations du chlorure de sodium. Les variétés Sidi Aich et Espresso accumulent les plus fortes teneurs, ce qui semble confirmer la tolérance de ces variétés à la salinité. L'accumulation de proline serait impliquée dans les mécanismes de l'ajustement osmotique.

L'analyse comparative des teneurs en Na<sup>+</sup> indique que les variétés Sidi Aich et Espresso accumulent les plus faibles teneurs dans leurs feuilles. Le classement basé sur ce critère est identique à celui basé sur la production de matière sèche.

La capacité de survie des 4 variétés soumises à un stress sévère (100 mM NaCl), montre que les variétés Espresso et Sidi Aich moins affectées par le sel, sont caractérisées par un taux de survie de 80% et les variétés Maya et Castel, plus sensibles enregistrent un taux de survie de 40%.

**CHAPITRE III**  
ISOLEMENT ET CARACTERISATION  
PHENOTYPIQUE DES SOUCHES DE *Rhizobium*  
EXTRAITES DE NODOSITES DE 4 VARIETES  
DE FEVEROLE

## **Chapitre III Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.**

### **Introduction**

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse est une relation complexe nécessitant des conditions optimales pour sa réalisation. En effet, les facteurs environnementaux affectent tous les aspects de la fixation de l'azote atmosphérique, en particulier l'acidité, la température et la salinité (Zahran, 2001).

Pour le bon fonctionnement de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse, une bonne synergie entre les deux partenaires symbiotiques et les facteurs édapho-climatiques du milieu est indispensable. Il est donc nécessaire d'identifier en premier lieu les rhizobia autochtones nouvellement isolées puis sélectionner ceux qui peuvent survivre et maintenir une haute performance symbiotique sous les différentes contraintes de l'environnement.

Dans cette optique, nous avons extrait des souches de *Rhizobium* à partir des nodosités de quatre variétés de féverole Castel, Maya, Espresso et Sidi Aich soumises à différents traitements salin (0mM, 50mM, 75mM et 100mM NaCl) dans le but de les caractériser sur le plan phénotypique. Cette caractérisation, nous permettra d'une part, d'estimer leur diversité, et d'autre part, d'évaluer leur degré de tolérance vis-à-vis de la salinité et d'autres facteurs abiotiques. La diversité des souches est estimée par le biais de la taxonomie numérique.

La sélection de souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* capables de fonctionner dans ces conditions constitue un objectif à atteindre afin d'améliorer la fixation symbiotique d'azote chez la féverole, par le biais de l'inoculation.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Matériel**

#### **2.1.1. Matériel végétal**

Nous avons retenu comme matériel végétal les 4 variétés de féverole (*Vicia faba* L. *minor*) Sidi Aich, Maya, Espresso et Castel (précédemment décrites).

## **Chapitre III : Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.**

---

### **2.1.2. Les souches bactériennes**

Les souches bactériennes ont été extraites des nodosités des 4 variétés de féveroles soumises à différents traitements salin (0mM, 50mM, 75mM et 100 mM NaCl).

### **2.1.3. Milieux de culture**

Pour la culture et la conservation des souches de *Rhizobium*, nous avons utilisé le milieu Yeast Extract Mannitol YEM (Vincent, 1970) dont la composition est la suivante :

Mannitol.....	10g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O.....	0,2g
Extrait de levure.....	0,4g
NaCl.....	0,1g
H <sub>2</sub> O qsp .....	1000ml

Ajuster le pH à 7 avec KOH ou HCl N/10  
Stériliser à 120°C pendant 20mn.

Les milieux de culture solides (YEMA) sont obtenus par addition de 15g/L d'Agar-Agar à la composition de base (YEM).

## **2.2. Méthodes**

### **2.2.1. Extraction, isolement et purification des souches**

Les nodules ont été prélevés à la fin de l'application du traitement salin, au début de la floraison. Les techniques adoptées pour l'extraction et l'isolement des bactéries sont celles décrites par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994).

#### ***- Stérilisation des nodules et extraction***

L'extraction est réalisée dans des conditions d'asepsie à partir d'un nodule dont la surface est préalablement stérilisée. Le nodule est immergé pendant 30 secondes dans de l'éthanol à 95% puis transférer immédiatement dans une solution de chlorure mercurique (HgCl<sub>2</sub> à 0,1%) pendant 1 minute, et rincé dans 8 bains successifs d'eau distillée stérile. Cette stérilisation superficielle des nodules a pour but de limiter la contamination des milieux de culture par d'autres microorganismes externes ou intimement liés aux tissus superficiels des nodules. Le nodule ainsi traité est écrasé en présence de 2 à 3 gouttes d'eau physiologique stérile, pour libérer les bactéroïdes qu'il renferme.

## **Chapitre III : Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.**

---

### **- Isolement et purification**

Le broyat est ensemencé dans des boîtes de Pétri contenant du milieu YEMA additionné d'une solution aqueuse de rouge Congo à 0.25%. Dans ces conditions, la plupart des contaminants absorbent fortement le colorant et forment des colonies rouges alors que les souches de *Rhizobium* ne le font que rarement (Vincent, 1970).

Après 2 à 3 jours d'incubation à 28°C les colonies bactériennes, présumées appartenir au genre *Rhizobium*, sont isolées et purifiées par repiquages successifs, sur milieu YEMA. Ces colonies sont reconnaissables, par leur incapacité à absorber du rouge Congo, leur aspect gommeux, et translucide (Sanogho, 1977).

### **2.2.2. Conservation des souches de *Rhizobium***

Les souches de *Rhizobium* sont conservées au congélateur dans des cryotubes contenant du milieu de cryoconservation dont la composition est la suivante :

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,3g
Sodium citrate trisodique.....	0.05 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0.01 g
Glycerol.....	25g
H <sub>2</sub> O qsp .....	100ml

Ajuster le pH à 7 avec KOH ou HCl N/10  
Stériliser à 120°C pendant 20mn.

### **2.2.3. Authentification des isolats**

Les caractéristiques culturelles, morphologiques ou physiologiques des rhizobia ne permettent pas de les distinguer des autres bactéries telluriques (Vincent, 1970). Leur reconnaissance et leur classification sont basées sur leur aptitude à infecter et à noduler des plantes hôtes spécifiques (Sanogho, 1977). Pour l'authentification des isolats bactériens, nous avons eu recours au test de l'inoculation.

### **2.2.3.1. Désinfection des graines**

Les graines de féverole sont désinfectées avec une solution d'éthanol à 95% pendant 30 secondes puis trempées durant 1 minute dans une solution aqueuse de chlorure mercurique ( $\text{HgCl}_2$  à 0,1%). Après plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile, les graines sont mises en germination pendant 48h à 27°C, à l'obscurité dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau distillée stérile.

### **2.2.3.2. Culture et inoculation des plantules de féverole**

Après germination, les plantules sont transférées dans des pots (200 cm<sup>3</sup>) contenant un mélange de sable de rivière et de terreau (2V/V) préalablement tamisé. Le sable de rivière est lavé à plusieurs reprises à l'eau courante, séché, puis mélangé avec du terreau. Le tout est stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

Les pots sont placés à température ambiante sous un éclairage additionnel de 8000 lux avec un photopériodisme de 16 heures de jour et 8 heures de nuit. Après 5 jours, les plantules sont inoculées avec 5mL d'une suspension cellulaire âgée de 48 h ( $10^8$  cellules/mL) de chaque isolat obtenue en milieu YEMB. Deux essais par souche ont été utilisés. Après un mois de développement, les plantes sont déterrées, puis les racines sont soigneusement lavées à l'eau courante afin de vérifier la présence ou non de nodosités.

Afin de vérifier la stérilité de notre substrat, nous avons utilisé des pots témoins non inoculés.

### **2.2.4. Détermination des caractéristiques des souches**

Pour la détermination du profil phénotypique des souches authentifiées, nous avons utilisé la méthodologie préconisée par l'Américain Society of Microbiology (Smibert et Krieg 1984). Cette diversité est estimée par la comparaison des caractéristiques morphologiques (caractères culturels et cellulaires), des caractéristiques biochimiques (recherche des enzymes liées à la respiration, liées à l'activité cellulolytique, phosphatasique, uréase, utilisation des substrats carbonés et azotés), et des caractéristiques physiologiques (tolérance au pH, température, salinité et aux métaux lourds). La tolérance au sel a été également exploitée pour la sélection des souches tolérantes.

#### **2.2.4.1. Caractéristiques culturelles**

Une étude macroscopique est réalisée sur les colonies obtenues sur le milieu YEMA additionné du rouge Congo à 0,25% après 48 à 72 h d'incubation à 28°C.

L'évaluation de la croissance bactérienne à une  $\lambda = 620$  nm est déterminée après incubation des cultures à 28°C pendant 48-72h sous agitation. Une mesure du pH des cultures a été aussi déterminée.

#### **2.2.4.2. Caractéristiques cellulaires**

La coloration de Gram permet de diviser les bactéries en deux groupes : Gram positif et Gram négatif selon la différence de la composition biochimique de leurs parois (Marchal *et al.*, 1987). Les cultures sont examinées au microscope photonique pour déterminer le type de Gram, la forme des cellules, le mode d'association et la pureté de la culture. La coloration au vert de malachite a été utilisée pour déterminer la présence ou non de spores (Leclerc *et al.*, 1983).

#### **2.2.4.3. Caractéristiques biochimiques**

##### ***- Recherche de l'activité oxydase par la méthode de Kovacs***

La recherche de l'oxydase, revient à rechercher la dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui est le cytochrome C oxydase, qui à son tour intervient dans la phosphorylation oxydative, en utilisant l'oxydase comme réactif (Lambin, 1969).

##### ***- Recherche de l'activité catalase***

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies stricts et anaérobies facultatives, cette enzyme empêche l'accumulation de l'eau oxygénée  $H_2O_2$  à l'intérieur de la cellule dont la présence sera létale (Marchal *et al.*, 1987). La présence de la catalase se traduit par la formation de bulles d'oxygène après réaction des souches avec de l'eau oxygénée à 10 volumes.

##### ***-Recherche de l'activité nitrate réductase***

L'enzyme nitrate réductase B catalyse la réaction de réduction des nitrates en nitrites, les nitrates peuvent être réduits jusqu'au stade azote ( $N_2$ ) dans le cas de la nitrate réductase A

### **Chapitre III : Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.**

---

(respiration nitraté). Les souches sont ensemencées dans un bouillon nitraté, pendant 48h à 28°C. Au terme de l'incubation, deux réactifs sont ajoutés dans chaque tube : un réactif nitrate réductase 1 (NR1) et nitrate réductase 2 (NR2). L'apparition d'une coloration rouge indique la réduction des nitrates en nitrites. Un résultat négatif nécessite l'addition d'une pincée de poudre de zinc. Un tube inchangé indique que les nitrates ont été réduits jusqu'au stade azote (N<sub>2</sub>) (Meyer *et al.*, 1984).

#### **- Recherche de l'activité cellulolytique**

Cette activité est recherchée sur un milieu de base contenant du carboxy-méthyl-cellulose (CMC). Après incubation des souches pendant 5 jours à 28°C, les boîtes sont pulvérisées à l'aide d'une solution de NaCl 1M et laissées à température ambiante pendant 30 minutes. L'apparition de zones claires autour des colonies est un résultat positif indiquant la présence de cellulase (Hendricks *et al.*, 1995).

#### **- Activité de solubilisation des phosphates**

La phosphatase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse des phosphates esters en un phosphate inorganique libre (Glew et Heath, 1971). Pour déterminer l'activité phosphatasique, les souches ont été ensemencées sur milieu Sperber (1959), dans des boîtes de Pétri, pendant 72h à 28°C. La présence d'un halo clair autour des colonies indique la présence de l'enzyme phosphatase.

#### **- Test de l'hydrolyse de l'urée**

Les souches sont ensemencées sur milieu YEMA, contenant 2% d'urée et 0.012g/L de rouge de phénol (indicateur de pH) (Jarvis *et al.*, 1977). L'hydrolyse de l'urée est indiquée par l'apparition d'une coloration rouge indigo alors qu'une coloration jaunâtre indique une réaction négative.

### **2.2.4.4. Caractéristiques physiologiques**

#### **-Effet du pH**

Des bouillons YEMB sont préparés et ajustés à différents pH (4, 5, 7, 8 et 9) avec des solutions de NaOH ou HCl. Après ensemencement des cultures et incubation à 28°C sous agitation pendant 48 à 72h ; la croissance est évaluée par la présence ou l'absence de trouble bactérien par rapport à un témoin non ensemencé.

**- Effet de la température**

Pour estimer l'effet des températures extrêmes sur la croissance de nos souches, ces dernières ont été ensemencées dans des bouillons YEMB et incubé à différentes températures : 10°C, 18°C, 30°C et 40°C sous agitation. La croissance est évaluée par la présence ou l'absence de trouble bactérien par rapport à un témoin non ensemencé.

**- Tolérance des souches au sel (NaCl)**

Pour déterminer la tolérance des souches authentifiées au sel, nous avons utilisé le milieu M79 (Fred et Waksman, 1932) additionné de concentrations croissantes de NaCl (500, 700, 800, 1000 et 1200 mM). Après incubation sous agitation pendant 72h à 28°C, la tolérance des souches au NaCl est estimée par la mesure de la croissance, par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 620 nm.

**2.2.4.5. Résistance aux métaux lourds**

La résistance aux métaux lourds est déterminée par la mise en culture des souches sur milieu YEMA additionné d'un indicateur de pH le bleu de bromothymol à 1%, et de différents métaux lourds à savoir : CuCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> et Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>. La concentration des métaux est de 100 µg/mL. Cet indicateur de pH (6-7,6), vert à la neutralité vire rapidement au jaune ou bleu en cas d'acidification ou d'alcalinisation en réponse à une croissance bactérienne.

**2.2.4.6. Détermination du profil d'utilisation des substrats carbonés**

Les souches ont été testées pour leur aptitude à utiliser une gamme de sucre diversifiée : xylose, fructose, galactose, maltose, glucose, lactose, sorbitol, saccharose, mannose, esculine, mésoinositol, gélatine, amidon, glycérol, cellobiose, fructose, éthanol.

**2.2.4.7. Détermination du profil de l'utilisation des substrats azotés**

Nous avons utilisé le milieu YEMA où l'extrait de levure est substitué par l'un des acides aminés suivants: proline, asparagine, tyrosine, thréonine, histidine, glycine et phénylalanine.

### **Chapitre III : Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.**

---

D'autres composés azotés ont été également utilisés à savoir :  $\text{NH}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

La détermination du profil de l'utilisation des substrats carbonés et des acides aminés ont été réalisés dans des plaques de microtitration à 96 puits. Les puits contenant du milieu YEMA semi solide, sont ensemencés à l'aide de suspension bactérienne obtenue après incubation de 48 h à 28°C. Nous avons utilisé un indicateur de pH, le bleu de bromothymol à 1 %. Tout virage coloré du bleu de bromothymol, que se soit vers le jaune ou le bleu est traduit comme réaction positive, donc l'absence de virage coloré est lue pour sa part comme réaction négative, pour chaque test, un témoin non ensemencé est prévu.

#### **2.3. Traitement numérique des résultats**

Les différents isolats sont désignés par un code constitué de 2 lettres et un chiffre, (exemple CO1). La première lettre C, E, M, ou S correspond aux variétés Castel, Espresso, Maya et Sidi Aich. La seconde lettre, O, A, B ou C désigne le traitement salin correspondant respectivement à 0mM, 50mM, 75mM ou 100mM, et enfin un chiffre désignant le numéro de la souche.

La présente analyse s'est basée sur 41 caractères phénotypiques. La première phase du traitement numérique des profils phénotypique est la détermination du coefficient de similitude entre les souches. Ces coefficients de similitude ont permis d'établir une matrice de similitude à l'aide du logiciel UPGMA (Unweighted Pair group Using Arithmetic Average) qui attribue à tous les caractères pris en considération la même valeur taxonomique. Sur la base de cette matrice, un dendrogramme a été construit à l'aide du logiciel MVSP.

### **3. Résultats et Discussion**

#### **3.1. Authentification des isolats**

Ce test a été effectué afin de confirmer l'appartenance des souches extraites des nodosités des plants de féverole (*Vicia faba* L. *minor*) au genre *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*. L'extraction réalisée sur des broyats des nodosités des quatre variétés de féverole a permis d'isoler 22 souches (Tab.8). L'infectivité de chaque souche est appréciée par la formation de nodules sur les racines de la légumineuse hôte d'origine (Somasegaran et Hoben, 1994). Après un mois de culture, les résultats d'authentification sont consignés dans le Tableau 8.

**Chapitre III : Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.**

**Tableau 8 : Résultats du test de l'authentification des souches extraites de nodosités des 4 variétés de féverole.**

Variétés	Souches	Nodulation
<b>Castel</b>	<b>CO1</b>	+
	<b>CA1</b>	+
	<b>CB1</b>	+
	<b>CB2</b>	-
	<b>CC1</b>	+
<b>Espresso</b>	<b>EO2</b>	+
	<b>EA2</b>	+
	<b>EB1</b>	+
	<b>EC2</b>	-
	<b>EC1</b>	+
<b>Sidi Aich</b>	<b>SO3</b>	+
	<b>SA1</b>	+
	<b>SB1</b>	+
	<b>SC2</b>	-
	<b>SB2</b>	-
	<b>SC3</b>	+
<b>Maya</b>	<b>MO2</b>	+
	<b>MB1</b>	-
	<b>MA2</b>	+
	<b>MB3</b>	+
	<b>MC1</b>	+
	<b>MC2</b>	-

+ : Présence de nodules, - : Absence de nodules.



**Figure 23 : Photographies d'un plant de féverole nodulé après le test d'authentification in situ.**

Sur les 22 isolats testés, nous avons enregistré un taux d'infectivité de l'ordre de 72% soit 16 isolats capables d'infecter et de noduler la féverole (Tab.8) (Fig.23). Ces isolats sont de ce fait authentifiés comme des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*, ces résultats sont conformes aux travaux de Jordan (1982).

Les plants inoculés avec les souches CB2, EC2, SC2, SB2, MB1 et MC1, n'ont pas été infectives, aucune nodulation n'est apparue après 4 semaines de développement. Ce résultat laisse indiquer que ces souches pourraient probablement être des contaminants survenus lors de nos manipulations.

### **3.2. Caractéristiques des souches retenues**

La caractérisation phénotypique a été menée sur 16 isolats authentifiés comme des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* nodulants la féverole. Elle a porté sur l'étude des:

#### **3.2.1. Caractéristiques culturelles en milieu solide**

Les souches testées forment sur le milieu YEMA des colonies visibles après 48 et 72 h d'incubation à 28°C. La majorité des souches ont formé des colonies circulaires à bords réguliers, de diamètre allant de 5 mm pour la souche formant les plus grands clones (SA1) 0,8mm pour les souches formant les plus petits clones (CC1, CO1, EO2).

### **Chapitre III : Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.**

---

La couleur des colonies observée est variable (blanche, crème ou rose claire), avec un centre rouge ou orange due à une absorption légère de rouge Congo. Nos résultats montrent la présence des souches à aspect mucoïde : SB1, SC1, EC1, SO3 et CB1 (Tab.9). Les caractéristiques culturales et morphologiques des 16 souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* que nous avons retenu sont en accord avec les données de la littérature (Vincent, 1980, Jordan, 1984).

La majorité des souches testées présentent des colonies à élévation convexe, une surface lisse brillante à texture globalement visqueuse due à l'excrétion de polysaccharides. Quant à leur opacité, la plupart de nos cultures sont translucides, à l'exception des souches (EA2, MO2, et MB3) qui sont opaques. Ces derniers caractères étant en relation avec la libération à l'extérieur des cellules des polysaccharides extracellulaires responsables de l'aspect mucoïde des colonies des souches de *Rhizobium*. Ces polymères saccharidiques, faiblement fixés à la surface cellulaire et organisés en gangue muqueuse entourant vaguement la cellule (Becker et Puhler, 1998), sont distincts des polysaccharides capsulaires qui forment quant à eux une structure régulière fortement liée à la surface cellulaire, la capsule (Elkan, 1992).

Certaines souches (CC1 et MB1) ont montré après 3 à 5 jours d'incubation une tendance à décolorer le milieu du rouge initialement pour devenir bleu violacé. Ce virage du rouge Congo qui est un indicateur de pH (zone de virage pH 3,0 - pH 5,2) indique que ces souches sont fortement acidifiantes.

**Chapitre III : Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.**

**Tableau 9: Caractéristiques culturale et cellulaire des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* sur milieu YEMA après incubation à 28°C pendant 72h.**

Souches	Forme de colonie	Diamètre	Couleur	Opacité	Élévation	Surface	Consistance	Coloration de Gram
CA1	CBR	1.2mm	Crème	translucide	CON	S	V	-
CB1	AM	1.2mm	Blanche	translucide	CON	S	V	-
CC1	CBR	0.8mm	Blanche	translucide	CON	S	V	-
CO1	CBR	0.8mm	Crème	translucide	CON	S	V	-
EA2	CBR	1.3mm	Blanche	Opaque	CON	S	V	-
EB1	CBR	1mm	Rose Claire	translucide	CON	S	G	-
EC1	AM	1mm	Rose Claire	translucide	CON	S	V	-
EO2	CBR	0.8mm	Crème	translucide	CON	S	V	-
MA2	CBR	3mm	Crème	translucide	CON	S	G	-
MB3	CBR	1mm	Rose Claire	Opaque	CON	S	G	-
MC1	CBR	1mm	Crème	translucide	CON	S	V	-
MO2	CBR	1mm	Crème	Opaque	CON	S	V	-
SA1	CBR	5mm	Crème	translucide	CON	S	V	-
SB1	AM	2mm	Crème	translucide	CON	S	EL	-
SC3	AM	1mm	Blanche	translucide	CON	S	V	-
SO3	AM	1.2mm	Rose Claire	translucide	CON	S	V	-

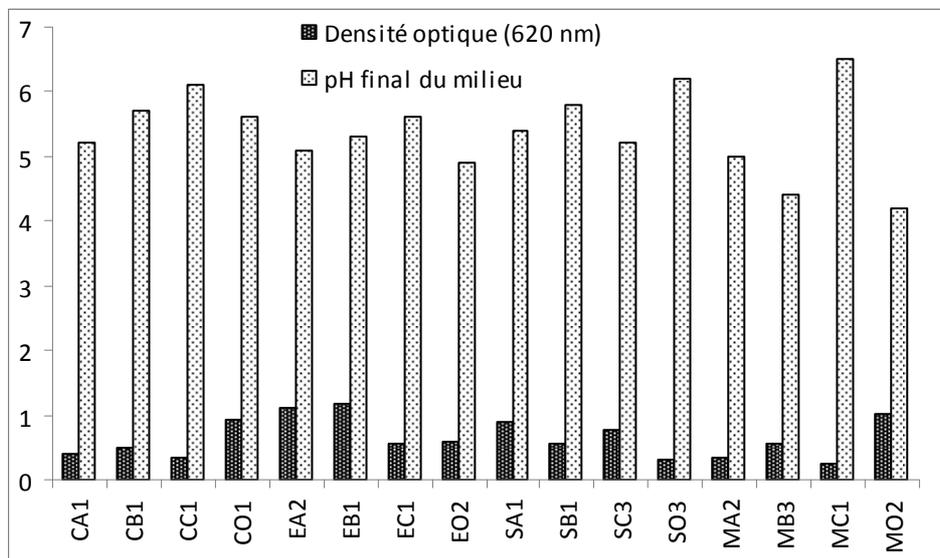
**CBR** : Circulaire à bord régulier, **AM** : Aspect mucoïde, **CON** : Convexe, **S** : Lisse brillante, **V** : Visqueuse, **G** : Gommeuse, **EL** : Élastique, **(-)** : Gram négatif.

### 3.2.2. Caractéristiques culturelles sur milieu liquide

Les résultats obtenus sur milieu liquide YEMB ont montré un trouble après 48 h d'incubation à 28°C à l'exception de la souche MA2 qui a présenté un trouble au bout de 72 h.

### Chapitre III : Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.

Les densités optiques des souches examinées varient de 0,26 à 1,17 avec une moyenne du soucier de 0,64. Les plus faibles DO sont enregistrées pour les souches MC1 et SO3 par contre les plus élevées sont observées pour les souches EB1 et EA2 (Fig.24).



**Figure 24 : Variations des densités optiques et du pH final du milieu de culture des différentes souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* .**

Les résultats obtenus montrent que les souches isolées de la variété Espresso enregistrent en moyenne les meilleures DO = 0,85 avec un pH qui varie de 4,9 à 5,1 tandis que les plus faibles sont observées chez les souches isolées des variétés Castel et Maya, avec en moyenne une DO= 0,54 avec un pH moyenne 5,6 et 5,2 respectivement (Fig.24).

Le niveau de croissance que peut atteindre une souche sur un milieu de culture ne dépend pas seulement de son temps de génération mais aussi de sa compétence saprophytique vis-à-vis de celui-ci. C'est-à-dire de sa capacité à utiliser au mieux les nutriments présents dans le milieu de culture (source d'énergie et/ou de carbone, source d'azote, facteurs de croissance, etc.). Á ce titre les souches MO2, EB1 et EA2 présentent la plus grande compétence saprophytique pour le milieu YEMB avec les plus grandes DO (Fig.24). Á l'opposé, la souche MC1 présente la plus faible compétence saprophytique vis-à-vis du milieu. Cette croissance réduite en milieu YEMB pourrait résulter d'une inadéquation entre les caractéristiques physiques, physico-chimiques du milieu (pH, Aw, composition ionique, etc.) et le métabolisme de ces souches (Breedveld *et al.*, 1993b).

### **Chapitre III : Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.**

---

Les résultats indiquent, qu'après 3 jours d'incubation, la croissance de l'ensemble des souches testées semble s'être achevée puisque les densités optiques enregistrées au 5<sup>ème</sup> jour d'incubation sont sensiblement similaires. Seule la souche MA2 a montré une élévation de la densité optique entre le 3<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour d'incubation indiquant ainsi que le cycle de croissance de cette souche est plus long.

En général, le pH du milieu des cultures bactériennes après 5 jours d'incubation montre que toutes les souches ont acidifié le milieu. Le pH varie entre 4,2 pour la souche MO2 et 6,5 pour MC1 avec un pH moyen du soucier de 5,38 (Fig.24).

Ce caractère acidogène de la croissance des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* a déjà été signalé par Graham (1992). L'acidification est due à l'accumulation dans le milieu de protons et de déchets métabolique divers (Ayanaba *et al.*, 1983).

#### **3.2.3. Caractéristiques cellulaires**

Toutes les souches testées se présentent sous forme de bâtonnets à extrémités arrondies, les cellules sont isolées ou associées en paires. Le test de la double coloration a révélé l'appartenance de nos souches à la catégorie des Gram négatifs. Le test de la coloration au vert de malachite a montré qu'aucune souche testée n'a montré la présence de spores.

#### **3.3. Caractéristiques biochimiques**

La croissance de nos souches sur milieu YEMA réparti en gélose inclinée, indique que toutes les souches prolifèrent en surface, ce qui indique que les souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* sont aérobies stricts (Vincent, 1980 ; Jordan, 1984).

Les tests biochimiques ont révélé que toutes les souches sont oxydase et catalase positives (Tab. 10). En effet, les rhizobia sont définis comme étant des microorganismes aérobies utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons (Vincent, 1970). Cette respiration présente le rendement énergétique le plus important suite au potentiel redox élevé de l'oxygène. Elle est caractérisée par des cytochromes oxydases, transporteurs d'électrons terminaux qui réagissent directement avec l'oxygène (Singleton, 1999).

Toutes nos souches ont montré une activité catalase positive, cette enzyme est synthétisée par la plupart des bactéries aérobies, élimine le peroxyde d'hydrogène produit au cours du métabolisme aérobie (Larpen, 1997).

### **Chapitre III : Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.**

---

Les résultats obtenus montrent que 37,5% des souches testées (SO3, SB1, MA2, MB3, EB1 et CA1) réduisent le nitrate en nitrite par l'enzyme nitrate réductase (Tab.10). Il s'agit d'une réduction assimilatrice du nitrate (Solomonson et Barber, 1990).

Le reste des souches (62,5%) réduisent le nitrate, ou le nitrite en produits gazeux (principalement en azote moléculaire et/ou en oxyde nitreux). Il s'agit de la dénitrification, processus important dans l'agriculture puisqu'il entraîne une perte de l'azote assimilable du sol (Chamber-Perez et Serrano, 1991).

Chez *Rhizobium japonicum*, cette activité a été démontrée à la fois dans les nodules et lorsque les souches sont cultivées en présence de nitrates. Alors que les souches *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* et *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*, en démontrent une activité que lorsque le milieu est pourvu de nitrates (Streter et Devine, 1983).

Ormeno-Orillo *et al.*, (2012) ont montré que *Rhizobium tropici* pouvait utiliser le nitrate comme seule source d'azote par réduction assimilatrice du nitrate. Les travaux de Horshani *et al.*, (2011) ont démontré sur le modèle *Medicago truncatula*- *Sinorhizobium meliloti* que l'activité nitrate réductase est nécessaire au maintien d'un état énergétique élevé dans le nodule permettant la fixation de l'azote. En effet, dans la nodosité fixatrice d'azote, une partie de l'ATP est générée par le biais d'une respiration cyclique (respiration nitrate-N0).

La mise en évidence de la capacité des *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* à hydrolyser l'urée a été initialement décrite par Jarvis *et al.*, (1977) en utilisant le rouge de phénol comme indicateur de pH. Après incubation à 28°C pendant 72h, 13 souches/ 16 ont alcalinisé le milieu indiquant ainsi la dégradation de l'urée et la libération des ions ammoniums. Par contre, les souches CA1, EC1, et MC1, ne possèdent pas l'enzyme uréase (Tab.10).

L'aptitude à hydrolyser l'urée et à réduire les nitrates est une caractéristique écologiquement importante dont il faut tenir compte dans la sélection des souches. En effet, un excès de nitrate dans le sol peut exercer un effet inhibiteur sur l'adsorption des rhizobia à la surface des racines (Sherwood *et al.*, 1984) affectant ainsi leur capacité infective et effective (Arrese-Igor *et al.*, 1997).

**Tableau 10 : Caractéristiques biochimiques des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*.**

<b>Enzymes</b> <b>Souches</b>	<b>Oxydase</b>	<b>Catalase</b>	<b>Phosphatase</b>	<b>Nitrate réductase</b>	<b>Uréase</b>	<b>Cellulase</b>
<b>CA1</b>	+	+	-	+	-	+
<b>CB1</b>	+	+	-	+	+	+
<b>CC1</b>	+	+	+	+	+	+
<b>CO1</b>	+	+	+	+	+	+
<b>EA2</b>	+	+	+	+	+	+
<b>EB1</b>	+	+	+	+	+	+
<b>EC1</b>	+	+	+	+	-	-
<b>EO2</b>	+	+	+	+	+	+
<b>MA2</b>	+	+	+	+	+	+
<b>MB3</b>	+	+	-	+	+	+
<b>MC1</b>	+	+	+	+	+	+
<b>MO2</b>	+	+	-	+	+	+
<b>SA1</b>	+	+	-	+	+	+
<b>SB1</b>	+	+	+	+	+	-
<b>SC1</b>	+	+	-	+	+	+
<b>SO3</b>	+	+	-	+	-	-
<b>Pourcentage de positivité</b>	100	100	56,25	100	81,25	81,25

+: activité enzymatique positive; -: activité enzymatique négative

Le test de solubilisation du phosphate montre que 56,25 % des souches examinées solubilisent le phosphate inorganique sous forme tricalcique (Tab.10). Cette solubilisation s'est traduite par la présence d'un halo autour des colonies. Cette activité s'est montrée chez toutes les souches extraites des nodosités de la variété Espresso ainsi que les souches SB1, CC1, CO1, MA2 et MC1. Nos résultats sont en accord avec ceux de AliKhani *et al.*, (2006) et

### **Chapitre III : Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.**

---

Xi *et al.*, (2009) qui ont montré un potentiel de solubilisation du phosphore chez *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*. Ces bactéries augmentent la disponibilité du phosphore pour les plantes soit par minéralisation des phosphates organiques par l'action des phosphatases (Halder et Chakrabarty, 1994) ou bien par la dissolution des phosphates inorganiques par l'action des acides organiques (Abd-Allah, 1994). L'action des acides organiques tels que l'acide citrique, succinique et oxalique est attribuée à leur propriété chélatante qui permet la formation des complexes stables avec les ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  (Abd-Allah, 1994).

La plupart des souches ont montré une activité cellulolytique positive, à l'exception des souches isolées des nodosités de la variété Sidi Aich (SB1 et SO3) et la EC1 isolée des nodosités de la variété Espresso (Tab.10). Cette activité s'est traduite par l'apparition d'un halo jaune orange sur un fond rouge autour des colonies.

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Morales *et al.*, (1984) et Saleh-Rastin *et al.*, (1991) qui ont mis en évidence la présence de cette activité chez la majorité des souches de *Rhizobium*, notamment *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*. Mateos *et al.* (2001) ont montré une activité positive chez *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* se traduisant par une dégradation localisée et complète de la paroi du poil absorbant, permettant ainsi la pénétration des rhizobia.

#### **3.4. Détermination des caractères physiologiques**

##### ***- Effet de la température***

La plupart des souches examinées sont capables de croître à des températures de 18°C, et de 35°C (Tab.11). En revanche, seules les souches CO1, EC1 et MB3 (18,75%) ont été capables de croître à 10°C et seulement 6 des 16 souches examinées (37,5%) ont pu proliférer à 40°C. Aucune des souches isolées des nodosités de la variété Sidi Aich n'a été capable de proliférer à 10°C (Tab.11).

**Chapitre III : Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.**

**Tableau 11 : Résultats de croissance des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* après 72h d'incubation à différentes températures.**

Températures (°C) Souches	10	18	35	40
CA1	-	+	+	-
CB1	-	+	+	-
CC1	-	+	+	+
CO1	+	+	+	-
EA2	-	+	+	-
EB1	-	+	+	+
EC1	+	+	+	+
EO2	-	-	+	-
SA1	-	+	+	-
SB1	-	+	+	-
SC3	-	+	+	+
SO3	-	+	+	+
MA2	-	+	+	-
MB3	+	+	+	+
MC1	-	+	+	-
MO2	-	+	+	-
<b>Pourcentage de positivité</b>	18,75	93,5	100	37,5

+ : croissance, - : absence de croissance

La température est un facteur déterminant pour la survie et la persistance des rhizobia dans les sols (Pueppke, 1986). Ce facteur joue également un rôle clé pour le niveau de compétitivité des souches notamment en modulant leur mobilité donc leur réponse chimiotatique. Nos résultats indiquent que les souches examinées sont dans l'ensemble sensibles aux températures extrêmes d'incubation. Ce comportement de nos souches est en accord avec les données de la littérature. Comme toutes les bactéries du sol, les rhizobia sont des organismes mésophiles dont la croissance est inhibée par l'élévation ou la diminution de la température d'incubation (Vincent, 1981 ; Jordan, 1984).

### **Chapitre III : Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.**

---

La plupart des rhizobia se développent entre 28 et 30°C et sont généralement incapables de se multiplier à 37°C et en dessous de 10°C (Graham, 1992). Inversement, des souches de rhizobia capables de s'adapter à de fortes températures pouvant atteindre 45°C ont été décrites (Karanja et wood, 1988), ces souches étant devenues non infectives par perte de leurs plasmides symbiotiques. Une température élevée des sols pourrait donc contribuer à la présence de souches non infectives dans les sols, produire un retard dans la nodulation ou limiter celle-ci à la partie profonde du sol, où les températures sont moindres (Hernandez-Armenta *et al.*, 1989).

#### ***-Effet du pH***

Il ressort du test de l'effet du pH sur la croissance de nos souches, que l'acidification et l'alcalinisation du milieu ne constituent pas des freins à leur prolifération. En effet, plus de 93 % des souches examinées se sont montrées capables de proliférer à des pH 5, 8, 7 et 9 (Tab.12). En revanche, en présence d'un pH 4 seulement 37 % ont pu s'y développer.

Les souches extraites des nodosités de la variété Sidi Aich semblent se distinguer des autres souches testées, puisqu'aucune d'entre elles n'a pu se développer à ce pH. Les souches testées ont montré une tolérance plus élevée vis à vis de l'alcalinisation du milieu que de son acidification.

**Chapitre III : Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.**

**Tableau 12 : Résultats de croissance des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* après 72 d'incubation à 28°C et à différents pH testés**

pH Souches	4	5	7	8	9
CA1	-	+	+	+	+
CB1	-	+	+	+	+
CC1	-	+	+	+	+
CO1	+	+	+	+	+
EA2	+	+	+	+	+
EB1	-	+	+	+	+
EC1	+	+	+	+	+
EO2	-	+	+	+	+
SA1	-	+	+	+	+
SB1	-	+	+	+	+
SC3	-	-	+	+	+
SO3	-	+	+	+	+
MA2	+	+	+	+	+
MB3	+	+	+	+	+
MC1	-	+	+	+	-
MO2	-	+	+	+	+
MC2	+	+	+	+	+
<b>Pourcentage de positivité</b>	37,5	93,5	100	100	93,5

+ : croissance, - : absence de croissance

L'acidité du sol affecte tous les aspects de la symbiose, depuis la survie des souches dans le sol jusqu'aux processus d'infection, de nodulation et de fixation d'azote. Ceatano-Anolles *et al.*, (1989) ont montré que l'acidité perturbait particulièrement l'adhésion des bactéries à la surface des poils racinaires, lors de la phase d'infection.

**- Tolérance des souches au sel**

Les souches extraites des nodosités des 4 variétés de féverole ont montré des sensibilités différentes au sel. La figure 25 montre que toutes les souches sont capables de croître en présence de 500 mM NaCl. Comparativement aux autres souches, les meilleures DO ont été

### **Chapitre III : Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.**

---

enregistrées par les souches MA2 et SA1 (DO= 0,33), par contre les plus faibles ont été observées chez CB1 et SB1 avec une DO de 0,22. Par rapport au témoin, les meilleures performances ont été enregistrées par CA1, MB2 et MA2. Ces souches ont montré en présence de sel une croissance plus importante que celle observée chez le témoin. La plupart des souches ont proliféré à 700mM NaCl, à l'exception de la souche MB3 qui n'a montré aucune croissance même après 72h d'incubation.

L'augmentation de la concentration en sel a induit une diminution de la croissance chez nos souches. En effet, à 800 mM NaCl, seulement 43% des souches ont pu proliférer, elles sont représentées par les souches EA2, EB1, EC1, SA1, SB1, SO3 et MA2. En revanche, les souches extraites des nodosités de la variété castel, sont plus sensibles, aucune d'entre elles n'a pu croître en cette concentration.

Comparativement au témoin, seules 3 souches / 16 ont montré une croissance à 1000mM NaCl et aucune croissance n'a été relevée à 1200mM NaCl.

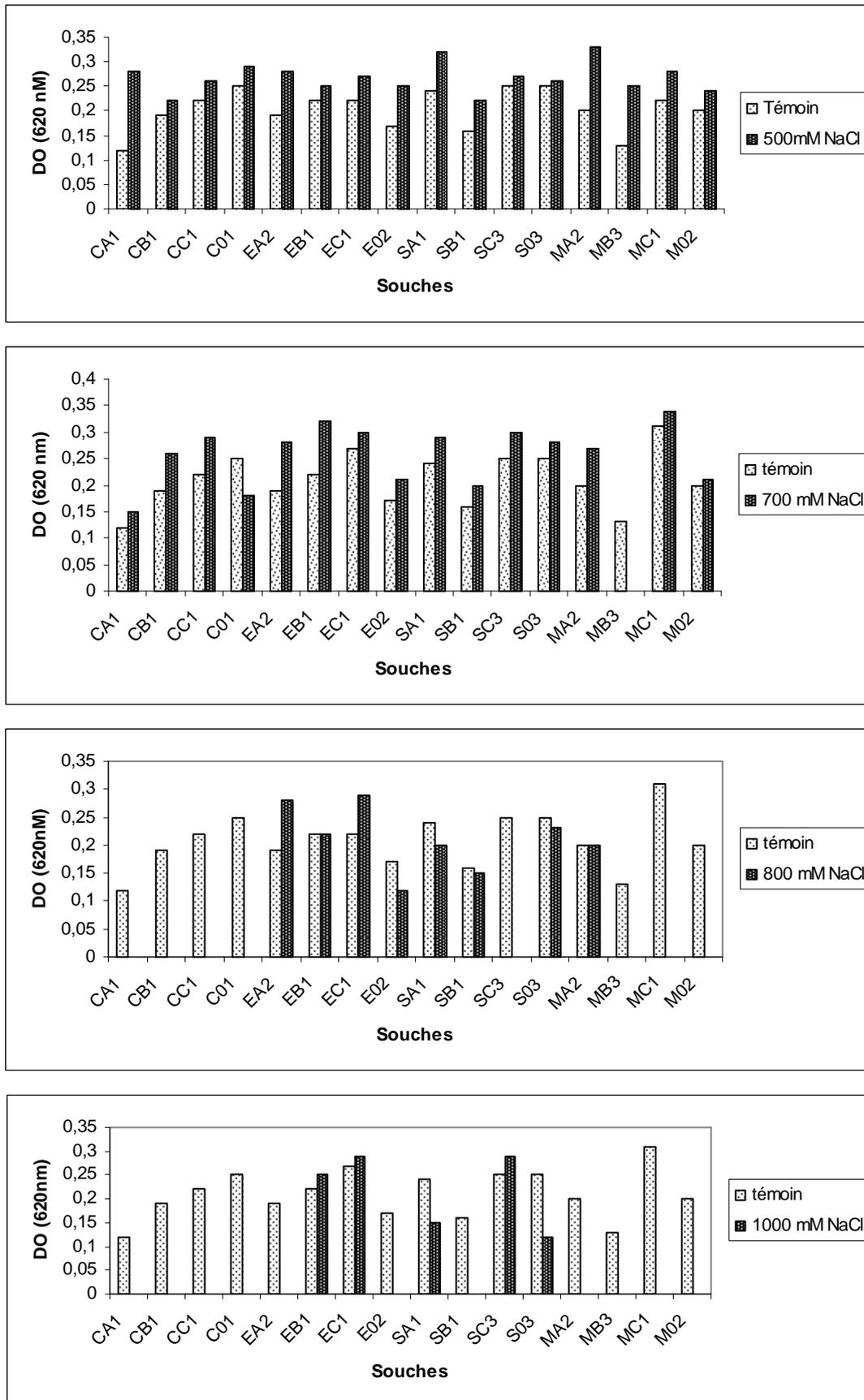
En effet, en présence de sel toutes les phases de la croissance bactérienne sont affectées, la phase de latence se retrouve plus allongée ; le temps de génération dédouble et la phase exponentielle est moins importante (Pocard *et al.*, 1987).

Par rapport aux données de la littérature qui considèrent que la limite de tolérance des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* à la salinité n'excéderait pas 400 mM NaCl (Zahran, 1999), nos souches se caractérisent donc par un niveau de tolérance particulièrement élevé.

Les limites de tolérance à la salinité entre les rhizobia peuvent varier considérablement d'une espèce à une autre (Rai, 1983) et même entre les souches de la même espèce (Kassem *et al.*, 1985). Des travaux réalisés par Boncompagni *et al.*, (1999) ont montré que *Sinorhizobium meliloti* peut croître à des concentrations variant de 300 à 700 mM NaCl. En effet, les cellules exposées aux concentrations élevées au sel accumulent souvent des osmolytes organiques protecteurs tels que les acides aminés comme la proline, la bétaine, l'ectoïne et le glutamate ou des carbonhydrates comme le tréhalose, le saccharose et autres afin de maintenir la turgescence de la cellule et de limiter les dégâts causés par le sel (Smith *et al.*, 1988).

La tolérance au sel qui caractérise nos souches pourrait être liée au taux de salinité du sol d'isolement. En effet, elles ont été extraites des nodosités des plantes ayant subi un stress salin pendant la croissance végétative. Meperki *et al.*, (1997) ont rapporté que l'existence de souches tolérantes à la salinité dans les sites salins peut être une indication d'une adaptation au stress osmotique qui est du à l'augmentation de la concentration d'ions et à la variation de l'humidité du sol durant les périodes sèches.

**Chapitre III : Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.**



**Figure 25 : Tolérance des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* aux concentrations 500 mM, 700 mM, 800mM et 1000mM NaCl.**

### 3.5. La résistance des souches aux métaux lourds

Nos résultats indiquent une sensibilité des souches au mercure puisque 50% seulement d'entre elles sont aptes à proliférer en sa présence (Fig. 26).

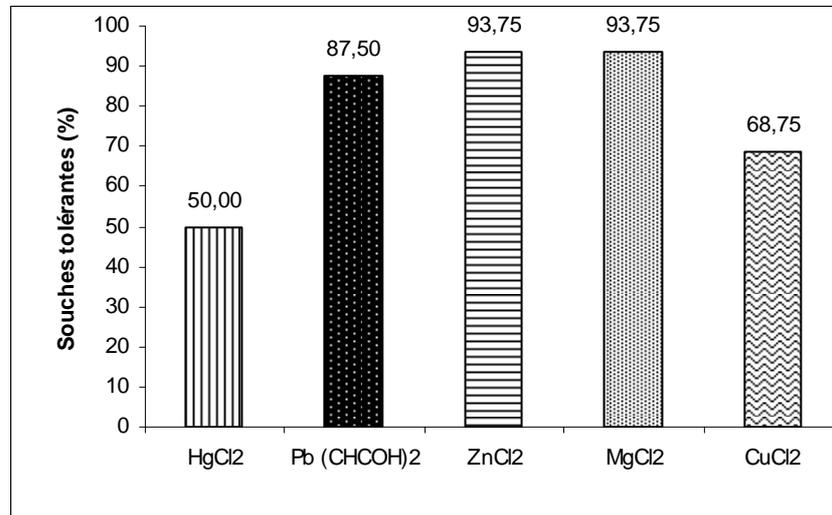


Figure 26 : Résistance des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* aux métaux lourds.

Les souches extraites des nodosités de la variété Maya semblent se distinguer des autres souches testées, puisqu'aucune d'entre elles n'a pu se développer en présence de ce métal. Par contre, toutes les souches isolées de la variété Sidi Aich ont pu s'y développer. Les souches CC1, C01, EB1 et EC1, se sont montrées résistantes également vis-à-vis du mercure.

Le zinc, le plomb et le chlorure de magnésium sont à l'inverse les métaux lourds les moins nocifs pour nos souches puisque plus de 87% prolifèrent en leur présence. Alors qu'une sensibilité pour le cuivre a été observée seulement chez MC1, EO2, EB1 et CC1. Nos résultats sont en accord avec Biro et al. (1995) et Zahran (1999) qui rapportent la sensibilité des souches *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* aux métaux lourds. En effet, leur présence dans le milieu peut entraîner un dysfonctionnement du métabolisme cellulaire des rhizobia et par conséquent le nombre et la survie de ces bactéries dans les sols contaminés peuvent être sévèrement affectés (Gusmao-lima *et al.*, 2005).

La sélection des souches tolérantes aux métaux lourds présente un grand intérêt pratique lors de l'inoculation des souches de *Rhizobium* dans les sols affectés par les métaux lourds.

### 3.6. Profil d'utilisation des substrats carbonés

Les microgaleries ont été utilisées pour évaluer l'aptitude de nos souches à assimiler chacun des 15 substrats comme seule source de carbone (Fig. 27). Les résultats obtenus montrent que les souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* sont capables d'utiliser une large gamme de substrats carbonés incluant les polyols, les disaccharides et les monosaccharides.

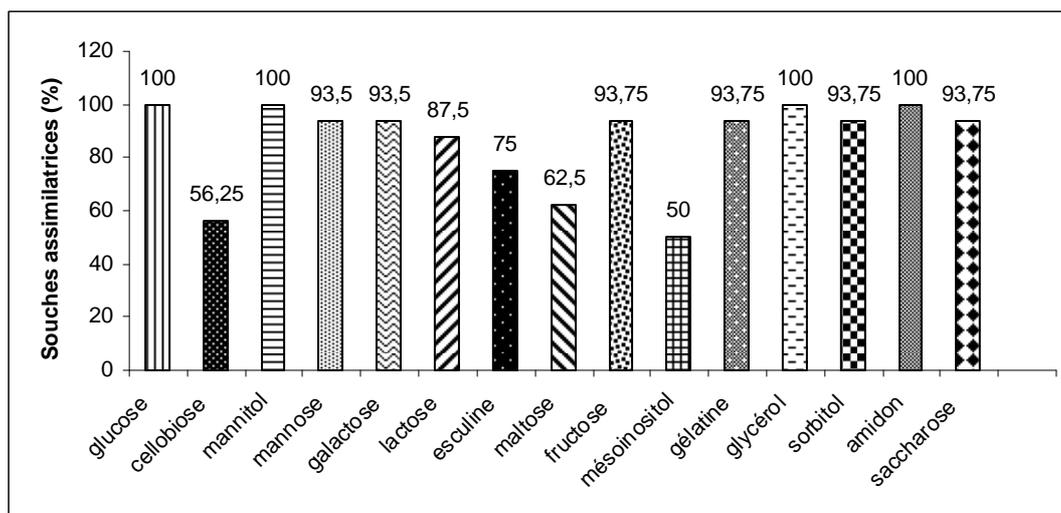


Figure 27 : Pourcentages des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* assimilatrices des substrats carbonés

Nos résultats indiquent une préférence de nos souches vis-à-vis des polyols, 97% sont capables d'assimiler le mannitol, le glycérol et le sorbitol. Cependant 50% seulement des souches ont métabolisé le meso-inositol. Les souches extraites des nodosités de la variété Castel semblent se distinguer des autres souches testées, puisque aucune d'entre elles n'a pu assimiler ce polyol.

La plupart des souches testées sont capables d'assimiler des sucres complexes comme l'amidon et la gélatine. Par contre, les disaccharides (cellobiose, maltose) sont faiblement métabolisés par les souches testées (Fig.27).

Cette préférence de nos souches vis-à-vis des polyols est en accord avec les données de la littérature qui considère que les polyols sont la forme de substrats carbonés / énergétiques préférentielle des rhizobia (Stowers, 1985). Comme l'atteste par ailleurs l'utilisation systématique du mannitol, dans les milieux de culture destinés à ce groupe bactérien. Nos

### Chapitre III : Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.

résultats sont en accord avec ceux obtenus par Wielbo *et al.*, (2007) qui montrent la capacité de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* à utiliser une large gamme de substrats carbonés.

Les mêmes auteurs ont trouvé une corrélation statistiquement significative entre la capacité à métaboliser un large spectre de substrats et la compétitivité pour la nodulation ce qui laisse indiquer que les propriétés métaboliques pourraient être un trait essentiel pour la détermination de la compétitivité des rhizobia.

#### 3.7. Profil d'utilisation des substrats azotés

Les résultats obtenus montrent que les souches examinées sont capables de croître en présence de la majorité des acides aminés testés (Fig.28). L'asparagine est métabolisée par toutes les souches, par contre la glycine est assimilée que par 9 souches/16. Les souches qui n'ont pas assimilé la glycine sont EO2, EC1, SA1, MB1 et MO2.

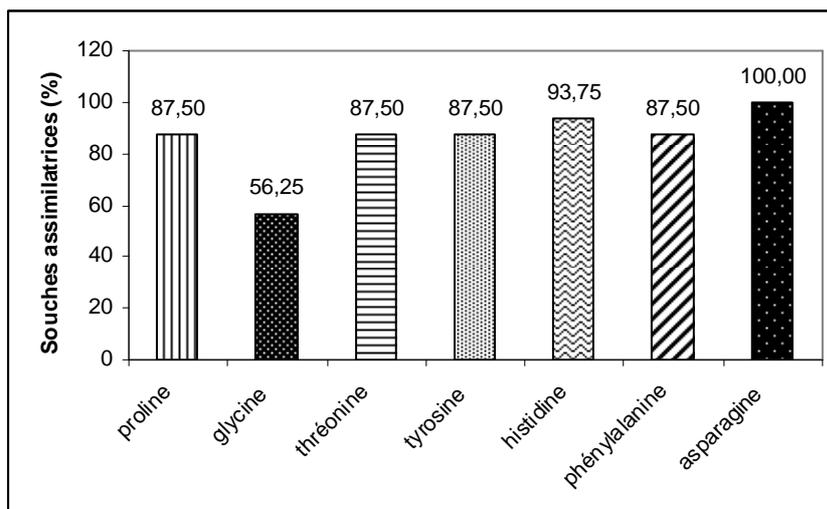
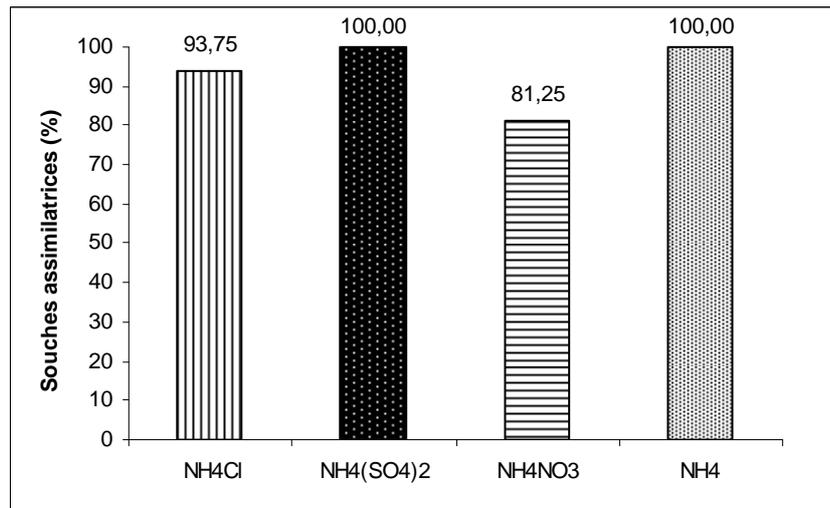


Figure 28: Pourcentages des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* assimilatrices des acides aminés

Les souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* utilisent de nombreux acides aminés comme source de carbone, d'énergie et d'azote. Cette capacité d'utilisation des acides aminés retrouvé dans les exsudats racinaires contribuerait à leurs compétitivité pour la nodulation (Wielbo *et al.*, 2007).

Toutes les souches examinées sont capables de proliférer en présence de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et  $\text{NH}_4$ , 93,75% des souches avec  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et 81,25% avec  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Fig.29).



**Figure 29: Pourcentages des souches assimilatrices de substrats azotés minérales**

Nos résultats sont en accord avec ceux de Patriarca *et al.*, (2002) qui ont démontré que les rhizobia sont capables d'assimiler le  $\text{NH}_4^+$ . Les bactéries assimilent l'ammoniac en incorporant un groupement amine soit au 2-oxoglutarate, soit au glutamate, pour former respectivement du glutamate ou de la glutamine. Le glutamate fournit ainsi l'azote nécessaire à la synthèse de la L-alanine et L-aspartate, tandis que la glutamine est le donneur d'azote de la synthèse des purines et des pyrimidines et des acides aminés, histidines et tryptophane (Singleton, 1999).

### **3.8. Traitement numérique des résultats**

L'analyse numérique englobe la comparaison des caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques entre les souches prises deux à deux. Cette méthode d'analyse est utilisée comme une première méthode de caractérisation et de regroupement de différentes souches non encore identifiées (Zhang *et al.*, 1991).

L'analyse numérique des profils phénotypiques des souches testées a permis la construction d'un dendrogramme qui résume graphiquement leur degré de similitude et leur homologie phénotypique (Fig.30).

L'examen de ce dendrogramme indique que les souches testées soumises à l'analyse se subdivise dès la distance phénotypique de 0.50 (A) en deux groupes distincts :

- Un groupe renfermant la souche SA1 qui se révèle très différentes des autres souches de l'autre groupe.

### Chapitre III : Isolement et caractérisation phénotypique des souches de *Rhizobium* extraites des nodosités de 4 variétés de féverole.

- Un groupe renfermant toutes les autres souches analysées qui se révèlent à ce niveau de clusterisation très apparentées.

Ce deuxième groupe se subdivise à son tour à une distance de 0.60 (B) en deux groupes :

\*Un groupe renfermant les souches E02, EC1, SC3 et CC1.

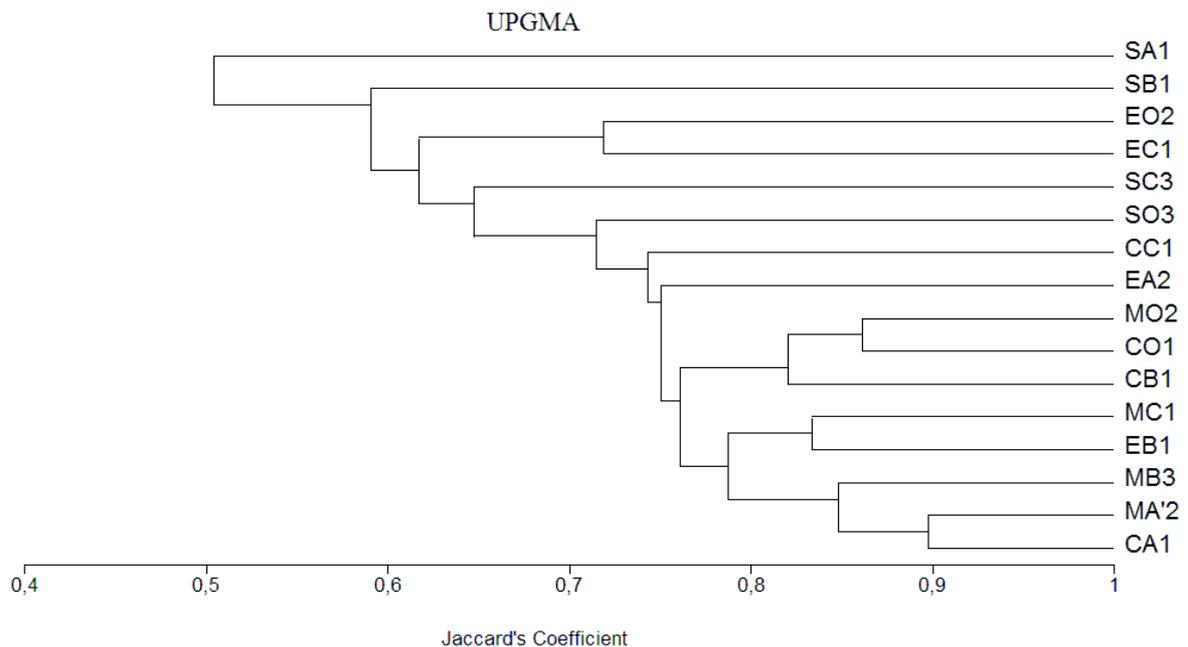
\*Un autre groupe comportant toutes les autres souches et la souche Rlv USDA2435.

Ce dernier groupe se subdivise à son tour à une distance de 0.750 (C).

Cette dernière subdivision indique que les souches sont phénotypiquement bien individualisées, alors qu'elles font partie de la même espèce et isolées d'un même sol.

Les quatre souches de la variété Maya sont les plus homogènes puis qu'elles sont regroupées dans des phénons (C) qui font partie de la même branche du dendrogramme.

En effet, ce niveau de clusterisation pourrait être expliqué par une variabilité de réponse des souches pour l'assimilation des substrats carbonés, pour la tolérance pH=4, pour la résistance aux métaux lourds et le degré de tolérance au NaCl.



**Figure 30 : Dendrogramme UPGMA montrant la distribution des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* en fonction du niveau de similitude (Jaccard) de leurs profils phénotypiques (l'échelle figurant en bas de la figure représente le coefficient de similitude de Jaccard)**

## **Conclusion**

Les caractéristiques culturales, morphologiques, biochimiques et physiologiques des 16 souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* que nous avons retenu sont en accord avec les données de la littérature.

Sur le plan biochimique, la majorité de nos souches sont capables d'utiliser une large gamme de substrats carbonés et azotés. Les souches testées réduisent les nitrates, dégradent la cellulose et hydrolysent l'urée, mais seulement la moitié d'entre elles solubilisent les phosphates.

Sur le plan physiologique, nos souches sont relativement sensibles à l'abaissement et à l'élévation de la température d'incubation. Par contre, elles semblent être tolérantes à la salinité, la totalité des souches prolifèrent à 700mM NaCl. Elles montrent une tolérance plus élevée vis à vis de l'alcalinisation du milieu que de son acidification.

L'analyse numérique de leurs profils phénotypiques indique que les souches sélectionnées par les 4 variétés de féveroles soumises à différentes concentrations en sel sont très diversifiées.

# **CONCLUSION GENERALE**

### Conclusion générale

Dans ce travail, l'effet du NaCl sur la germination, la croissance, le développement des nodules, la fixation symbiotique de l'azote et les composantes du rendement, a été étudié chez quatre variétés de féverole. L'objectif étant de contribuer à la mise au point d'un test de sélection pour l'amélioration de la féverole sous contrainte saline.

L'étude de la réponse des plantes à la salinité, nécessite d'analyser la variabilité des caractères discriminants pour la tolérance au sel. En effet, certains caractères discriminent nettement entre le comportement des 4 variétés, sous stress sévère (100 mM NaCl), d'autres le sont sous faible stress (50 mM NaCl). Les résultats obtenus pour l'ensemble des caractères mesurés montrent que les quatre variétés réagissent différemment et ne présentent pas le même degré de sensibilité au chlorure de sodium.

Les résultats de la germination montrent que les graines des variétés Espresso, Maya et Castel, n'ont pas été affectées par le stress salin à des concentrations inférieures et égales à 250 mM NaCl. Contrairement à la variété Sidi Aich qui présente une sensibilité à partir de 150 mM NaCl. Sa faculté germinative diminue en effet, avec l'augmentation de la concentration saline pour s'annuler à 250 mM NaCl.

Le test de germination a permis de classer les quatre variétés de féverole en deux groupes significativement différents en comparant leur taux de germination moyen. Le premier groupe est formé des variétés Castel, Espresso et Maya, tolérantes au sel, et le deuxième groupe formé de la variété Sidi Aich moyennement tolérante.

Le stress salin exerce chez les quatre variétés un effet dépressif sur tous les paramètres de croissance. Le degré de sensibilité ou de tolérance dépend de la variété et de l'intensité du stress. Il en ressort que la croissance en hauteur, le nombre de feuilles/plant des 4 variétés sont moins affectés par le sel que la surface foliaire. Les résultats de la production de matière sèche aérienne et racinaire a permis de scinder les 4 variétés étudiés en deux groupes :

Un groupe à croissance très affectée par le sel constitué de Maya et Castel et un autre groupe à croissance moins affecté, formé par Sidi Aich et Espresso. Ce classement est appuyé et affiné par l'indice de sensibilité relative au sel.

La relation entre la tolérance à la germination et les autres stades de croissance n'est pas apparente, puisque la variété Sidi Aich par exemple, trouvée sensible à ce stade, a manifesté une bonne tolérance au stade plante, par une production de matière sèche plus importante en milieu salé. De ces résultats, il ressort que le test de germination n'est pas très discriminant pour la tolérance à la salinité chez la féverole.

## Conclusion générale

---

Cette supériorité de la production de matière sèche pourrait trouver son explication dans le fait que les pigments chlorophylliens des variétés Espresso et Sidi Aich ont été les moins affectés par le sel. Ces deux variétés ont pu au moins préserver leur appareils photosynthétiques des dommages causés par les ions toxiques  $\text{Cl}^-$ , leurs permettant ainsi de maintenir leur capacité photosynthétique.

Des résultats précédents, nous pouvons conclure que les variétés Sidi Aich et Espresso sont capables de tolérer des concentrations d'environ 75 mM NaCl avec une préservation de biomasse égale à 50% par rapport au témoin. Cette concentration pourrait constituer une limite de tolérance et un critère de sélection pour la féverole.

La teneur en proline augmente avec les concentrations du chlorure de sodium. Les variétés Sidi Aich et Espresso accumulent les plus fortes teneurs, ce qui semble confirmer la tolérance de ces variétés à la salinité. De ce fait, l'accumulation de la proline serait impliquée dans les mécanismes de l'ajustement osmotique et serviraient aussi comme osmoprotecteurs. Cet élément peut être considéré comme un marqueur biochimique du degré de tolérance et par conséquent pourrait être utilisé dans les programmes de sélection.

Nos résultats montrent que quel que soit la concentration saline dans l'eau d'irrigation, nos variétés ont maintenu un niveau d'hydratation proche de celui des plants témoins. Ceci peut être expliqué par l'efficacité de l'ajustement osmotique effectuée par ces deux variétés.

Les variétés étudiées présentent les caractéristiques ioniques des plantes incluses qui sont capables d'absorber, d'exporter et d'accumuler  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  dans leurs parties aériennes. Par ailleurs, les variétés Castel et Maya accumulent plus d'ions  $\text{Na}^+$  dans leurs feuilles et dans leurs racines que les autres variétés. Elles enregistrent un taux de survie de 40%, à 100 mM NaCl alors que le double (80% de survie) est notée chez les variétés Sidi Aich et Espresso. De ce fait, ce caractère pourrait servir comme critère de sélection pour les variétés étudiées.

Le sel induit une diminution de la nodulation et de la fixation symbiotique d'azote. La comparaison des moyennes a permis de classer les variétés selon l'activité nitrégénase exprimée par l'ARA comme suit : Castel  $\square$  Maya  $\square$  Espresso  $\square$  Sidi Aich. Ce résultat confirme la supériorité des variétés Sidi Aich et Espresso moins affectées par le sel que les autres variétés. Cependant, la complexité du test fait de lui un critère de sélection difficile à exploiter.

Pour l'ensemble des variétés, l'activité nitrate réductase est moins affectée par le sel que la fixation d'azote. En effet, les variétés Sidi Aich et Espresso assimilent plus de nitrates que les autres variétés. Ceci justifie, leur production de matière sèche supérieure à celle observée chez

## Conclusion générale

---

les autres variétés, notamment à 100 mM NaCl. Ce paramètre serait aussi difficile à exploiter comme critère de sélection

Pour, le poids de 100 graines, nos résultats montrent que ce paramètre est également discriminant pour la tolérance au sel puisque les variétés Sidi Aich et Espresso moins affectées en comparaison aux variétés Castel et Maya plus affectées.

L'analyse en composantes principales sous les différents traitements salins fait ressortir deux groupes, l'un tolérant au sel comprenant les variétés Sidi Aich et Espresso, l'autre concernant les variétés Castel et Maya sensibles au sel. En effet, les variétés Sidi Aich et Espresso présentent des teneurs en pigments chlorophylliens moins affectées par le sel, une meilleure production de matière sèche, des teneurs en Na<sup>+</sup> plus faibles dans les feuilles, une meilleure capacité de survie, des teneurs en proline plus élevées et un meilleur rendement. De ce fait ces caractères aisés à exploiter pourront servir de critère de sélection pour la tolérance au sel chez la féverole.

Les caractéristiques culturales, morphologiques, biochimiques et physiologiques des 16 souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* que nous avons retenues sont en accord avec les données de la littérature.

L'analyse numérique de leurs profils phénotypiques montre que les souches sélectionnées par les 4 variétés de féveroles soumises à différentes concentrations en sel sont très diversifiées. Cette diversité nous permet toutefois de sélectionner avec précision les bonnes souches pour tout essai d'inoculation selon les exigences recommandées et selon les conditions édapho-climatiques (stress salin, pH, excès de nitrate, etc.). Ainsi, dans le but de favoriser la fixation symbiotique de l'azote et d'améliorer la production durable de cette culture sous contrainte ; nous proposons les souches EB1, EC1 et SC3. Elles sont très tolérantes à la salinité, au pH, possèdent une nitrate réductase et résistantes aux métaux lourds testés. Cependant, il est nécessaire de confirmer ces résultats par un test de séquençage de l'ARN 16S.

En perspective d'une mise au point d'un test de sélection, il serait nécessaire de vérifier que la capacité de tolérance au NaCl obtenue lors de nos essais en serre est la même en plein champ. En parallèle, soumettre ces tests à un plus grand nombre de variétés issues d'une sélection adaptée au mieux à nos conditions édapho-climatiques.

Par ailleurs, il serait intéressant d'exploiter les variétés Sid Aich et Espresso dans des zones moins exposées aux conditions de salinité. Leur cultures sera soutenue, par une inoculation avec des souches tolérantes au sel, dans le but de favoriser la fixation symbiotique de l'azote et par conséquent d'améliorer la production durable de cette culture sous contrainte.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

- Abd-Allah MH (1994) Use of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar viceae phosphatases. *Biot. Fertil. Soils* 8(2) : 16-21.
- Abdelly C (1997) Mécanismes d'une association de luzernes spontanées et de halophytes pérennes en bordure de sebkha. Thèse de doctorat d'État Es-Sciences naturelles : Université Tunis II, Faculté des Sciences de Tunis (Tunisie) p.125.
- Abdul Qados AMS (2011) Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.) *J. of the Saudi Soc. of Agri. Sci.* 10(1): 7-15.
- Abdul Qados AMS, Moftah AE (2015) Influence of silicon and nano-silicon on germination, growth and yield of faba bean (*Vicia faba* L.) under salt stress conditions. *American Journal of Experimental Agriculture*, 5 (6): 509-524.
- Ahmed AE, Adlan MAM, Hukhtar NO (2005) Effect of plant growth promoting bacterium (*Azospirillum brasilense*) and *Bradyrhizobium* on growth, yield and nitrogen fixation of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Gezira. J. Agric. Sci.* 3: 137-147.
- Ahemad M, Khan MS (2011) Functional aspects of plant growth promoting rhizobacteria: Recent advancements. *Insight Microbiol.* 1: 39-54.
- Alem C, Labhilili M, Brahmi K, Jlibene M, Nasrallah N, Filali-Maltouf A (2002) Adaptations hydrique et photosynthétique du blé dur et du blé tendre au stress salin, *CR Biologies* 325 : 1097-1109.
- Alikhani HA, Saleh-Rastin N, Antoun H (2006) Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant Soil* 287: 35-41.
- Al Sherif EA (2009) *Melilotus indicus* (L.) All, a salt-tolerant wild leguminous herb with high potential for use as forage crop in salt-affected soils, *Flora*. 204: 737-746.
- Al-Sobhi OA, Al-Zaharani HS Al-Ahmadi SB (2006) Effect of salinity on chlorophyll and carbohydrate contents of *Calotropis procera* seedlings. *Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences)* 7 : 11427H.
- Al-Tahir OA, Al-Abdusalam MA (1997) Growth of *faba bean* (*Vicia faba* L.) as influenced by irrigation water salinity and time of salinization, *Agric. Water. Manag.* 34: 161-167.
- Alvarez-Martinez ER, Valverde A, Ramirez-Bahena MH (2009) The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating *Vicia* from different continents reveals their common phylogenetic origin and suggests the distribution of *Rhizobium leguminosarum* strains together with *Vicia* seeds. *Arch. of Microbiol.* 191: 659–668.
- Amini F, Ehsanpour AA (2005) Soluble proteins, carbohydrates and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> changes in two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars under in vitro salt stress. *Am. J. Biochem. & Biotechnol.* 1: 212-216.

## Références bibliographiques

---

- Ané JM, Kiss GB, Riely BK, Penmetsa RV, Oldroyd GE, Ayax C, Lévy J, Debelle F, Baek JM, Kalo P (2004) *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* 303: 1364–1367.
- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Poly-phenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 24: 1–15
- Arrese-Igor C, Minchin FR, Gordon AJ, Nath AK (1997) Possible causes of the physiological decline in soybean nitrogen fixation in the presence of nitrate. *J. Exp. Bot.* 48: 905–13.
- Ashraf M, Harris P (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci.* 166: 3-6.
- Aubert G (1976) Les sols sodiques en Afrique du Nord. *Ann. Inst. Nat.Agron.* Alger, VI: 185-196.
- Ashraf M, McNeilly T (2004) Salinity tolerance in Brassica oilseeds. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2: 157-174.
- Ayanaba A, Asanuma S, Munns N (1983) An Agar plate method for rapid screening of *Rhizobium* for tolerance to acid-aluminum stress. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47: 255-257.
- Azcon-Bieto J (1983) Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. *Plant Physiol.*, 73: 681-686.
- Bala N, Sharma PK, Lakshminarayana NA (1990) Nodulation and nitrogen fixation by salinity in symbiosis with tree legumes. *Agric. Ecosys.Environ.* 33: 33-46.
- Balandreau J, Dommergues Y (1971) Mesure in situ de l'activité nitrogénasique. *C. R. Acad. Sci. Paris*, Série D, 273 :2020-2023.
- Barr M, East AK, Leonard M, Mauchline TH, Poole PS (2008) In vivo expression technology (IVET) selection of genes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* A34 expressed in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Letters*, 282 (2):219-227.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water- stress studies. *Plant Physiol.* 39: 205-207.
- Bayuelo-Jimenez JS, Debouck DG, Lynch JP (2003) Growth, gas exchange, water relations and ion composition of *Phaseolus* species grown under saline conditions. *Field. Crops. Res.* 80: 207-222.
- Bayuelo-Jiménez JS, Jasso-Plata, Ochoa I (2012) Growth and Physiological Responses of *Phaseolus* Species to Salinity Stress. *Int. J. of Agron.* 527673: 13 pages.
- Becana M, Gogorcena Y, Aparicio-Tejo PM, Sánchez-Díaz M (1986) Nitrogen fixation and leghemoglobin content during vegetative growth of alfalfa. *J. Plant Physiol.* 123 : 117–125.

## Références bibliographiques

---

- Becker A, Pühler A (1998) Production of exopolysaccharides. In: Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas JJ, editors. The *Rhizobiaceae*. Dordrecht, The Netherlands: *Kluwer Acad. Publishers* : 97–118.
- Belkhodja M, Benkabilia M (2000) Proline response of *faba bean* (*Vicia faba* L.) under salt stress, *Egypt. J. of Agric. Res.* 78(1) : 185-195.
- Belkhodja M, Bidai Y (2004) Réponse de la germination des graines d'*Atriplex halimus* L. sous stress salin. *Revue sécheresse* 15:331-335 .
- Bellinger Y, Bensaoud A, Larher F (1989) Physiology breeding of winter cereals for stress environments. Colloque n°3, Montpellier, France.
- Ben Khaled L, Mote-Gomez A, Honrubia M, Oihabi A (2003) Effet du stress salin en milieu hydroponique sur le trèfle inoculé avec *Rhizobium*. *Agronomie* 23 : 571-580.
- Benamar B, Daguin F, Kaid-Harche M (2009) Effet du stress salin sur la germination et la croissance in vitro du pistachier (*Pistacia vera* L.). *C.R. Biol.* 332: 752-758.
- Benhassaine-Kesri G, Aid F, Demandre C, Kader JC, Mazliak P (2002) Drought stress affects chloroplast lipid metabolism in rape (*Brassica napus*) leaves. *Physiol. Plantarum* 115: 221-227.
- Ben Naceur M, Nailly M, Selmi M (1994) Effet d'un déficit hydrique survenant à différents stades de développement du blé sur l'humidité du sol, la physiologie de la plante et sur les composantes du rendement. *Medit* 2/99 : 53-60.
- Ben Salah I, Slatni T, Gruber M, Messadi D, Gandour M, Benzarti-Haouala M, Zribi K, Ben Hamed K, Perez-Alfocea F, Abdely C (2011) Relationship between symbiotic nitrogen fixation, sucrose synthesis and anti-oxidant activities in source leaves of two *Medicago ciliaris* lines cultivated under salt stress. *Env. Exp. Bot.* 70: 166-173.
- Berrada H, Fikri-Benbrahim K, (2014) Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. *Brit. Micr Res J* 4 (6): 613-639.
- Bernstein N, Läuchli A, Silk W (1993) Kinematics and dynamics of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) leaf development at various Na/Ca salinities. I. Elongation growth, *Plant Physiol.* 103: 1107-1114.
- Bibi A, Sadaqat HA, Tahir MHN, Akram HM (2012) Screening of sorghum (*Sorghum bicolor* Var Monech) for drought tolerance at seedling stage in polyethylene Glycol. *The J. of Ani. & Plant Sci.* 22(3): 671-678.
- Biro B, Bayoumi HEAF, Balazsy S, Kecskes M (1995) Metal sensitivity of some symbiotic N<sub>2</sub>-fixing bacteria and *Pseudomonas* strains. *Acta Biol. Hung.* 9-16.
- Blumwald E, Grover A, Good, AG (2004) Breeding for abiotic stress resistance: challenges and opportunities. « New directions for a diverse planet ». Dans Proceedings of the 4th

## Références bibliographiques

---

International Crop Science Congress, 26 September–1 October 2004, Brisbane, Australia. [CDROM]. Web site [www.cropscience.org.au](http://www.cropsscience.org.au)

- Bolaños L, Esteban E, de Lorenzo C, Fernández-Pascual M, de Felipe MR, Gárate A, Bonilla I (1994) Essentiality of boron for symbiotic di-nitrogen fixation in pea (*Pisum sativum*)-*Rhizobium* nodules. *Plant Physiol.* 104: 85 – 90.
- Bolaños L, Martín M, El-Hamdaoui A, Rivilla R, Bonilla I (2006) Nitrogenase inhibition in nodules from pea plants grown under salt stress occurs at the physiological level and can be alleviated by B and Ca. *Plant and Soil* 280: 135-142 .
- Boncompagni E, Osterås M, Poggi MC, Le Rudulier D (1999) Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family Rhizobiaceae and their roles in osmoprotection. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2072-2077.
- Borsani O, Valpuesta V, Botella MA (2003) Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. *Plant Cell, Tissue & Organ Cult.* 73: 101–115.
- Bouhmouch I, Mouhsine BS, Brhada F, Aurag J (2005) Influence of host cultivars and *Rhizobium* species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. *J. Plant Physiol.* 162: 1103- 1113.
- Bourgeois-Chaillou P, Guerrier G (1992) Salt responses in *Lycopersicum esculentum* Calli and whole plants. *J. Plant Physiol.* 140: 494-501.
- Bouteyre G et Loyer JY (1992) Salt affected soils and brackish waters in arid regions of the tropics and the Mediterranean: principle features, consequences for agriculture. L'aridité: une contrainte au développement. Caractérisation, réponses biologiques, stratégies des sociétés. pp. 69-80.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
- Brady NC et Weil RR (2002) The nature and properties of soils. 13<sup>th</sup> edn. Prentice Hall, Upper saddle river, NJ, USA.
- Breedveld MW, Miller KJ (1988) Cell surface  $\beta$ -glucans. In: The Rhizobiaceae : Molecular Biology of nodule plant Associated Bacteria. Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (Eds.) *Kluwer Acad. Publ.*, 81-96.
- Brewin NJ (2004) Plant Cell Wall Remodelling in the *Rhizobium*-Legume Symbiosis. *Critical Rev. in Plant Sci.* 24(4): 293-316.
- Broughton WJ, Jabbouri S, Perre X (2000) Keys to Symbiotic Harmony. *J. of bacteriol.* 182 (20): 5641-5652.
- Broughton WJ, Hernandez G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003) Beans (*Phaseolus spp.*). Model food legumes. *Plant and Soil* 252: 55–128.
- Bruning B, Rozema (2013) Symbiotic nitrogen fixation in legumes: Perspectives for saline agriculture. *Env. and Exp. Bot.* 92: 134–143.

## Références bibliographiques

---

- Cachorro P, Ortiz A, Barcelo AR Cerda A (1993) Lignin deposition in vascular tissues of *Phaseolus vulgaris* roots in response to salt stress and Ca<sup>2+</sup> ions. *Phyton* 33: 33-40.
- Caetano-Anollés G, Lagares A, Favelukes G (1989) Adsorption of *Rhizobium meliloti* to alfalfa roots: Dependence on divalent cations and pH. *Plant and Soil* 117:67-74.
- Calet C (1992) Les légumes secs, Apport protidique. *Cah. Nut. Diét.* 2: 99-108.
- Calu G (2006) Effet du stress salin sur les plantes : Comparaison entre deux plantes modèles *Arabidopsis thaliana* et *Thellungiella halophila*. Master I recherche biotechnologies : du gène à la molécule 2004-2006 14 pages.
- Calvet R (2003) Le sol : Propriétés et fonctions volume 2 : France Agricole Editions, 2003 - 511 pages.
- Carpenter JF, Crowe LM, Arakawa T (1990) Comparison of solute-induced protein stabilisation in aqueous solution and in the frozen and dried states. *J. Dairy Sci.* 73(12): 327–333.
- Cerning-Beroard J (1975) The use of invertase for determination of sucrose. Application to cereals, cereal products and other plant materials. *Cereal Chem.* 52: 431-438.
- Chalck P (1998) Dynamics of biologically fixed N in legume cereal rotations: a review. *Aust. J. Agric. Sci. Res.* 49:303-316.
- Cherbury B (1991) Les sols salés et leur réhabilitation. Etude bibliographique, ENSA Rennes, 124 p.
- Chen WX, Yan GH, Li JL (1988) Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38 : 392-397.
- Chen WX, Li GS, Qi YL, Wang ET, Yuan HL, Li JL (1991) *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus* *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 275-280.
- Chen H, Kuang D, Wang J (1995) Studies on selection and characterization of a stress tolerant sugarcane cell line. *Chin. J. Biotechnol.* 11(2): 93:99.
- Chen WM, Laevens S, Lee TM, Coenye T, De Vos P, Mergeay M, Vandamme P (2001) *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1729–1735.
- Chen TH, Murata N (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5(3): 250–257.
- Chinusammy V, Jagendorf A, Zhu JK (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci.* 45: 437-448.

## Références bibliographiques

---

- Ciseau (Centre d'Information Sur l'Eau Agricole et ses Usages) (2006) Conférence électronique sur la salinisation: Extension de la salinisation et Stratégies de prévention et réhabilitation. 12p.
- Clarke JM, Mc Caig TN (1982) Excised-leaf water retention capability as an indicator of drought resistance of Triticum genotypes. *Can. J. Plant Sci.* 62 : 571-578.
- Come D (1970) Les obstacles à la germination. Masson et Cie. 162 pp.
- Cordovilla M, Ligeró DP, Lluch C (1999) Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen assimilation in nodules of faba bean (*Vicia faba* L.). *Appl. Soil Ecol.* 11: 1-7 .
- Crepon K (2007) Journée féverole 2007, Bauvais. Recueil de communication.
- Crespi M, Frugier F (2008) De novo organ formation from a differentiated cell: root nodule organogenesis. *Sci. Signal.* 1(49): re11.
- Cubero JI (1973) Evolutionary trends in *Vicia faba*. *Theor. Appl. Genet.* 43: 59–65.
- Cuq JL, Leynaud-Rouaud C (1992) Les graines de légumineuses. In: Dupin H, Cuq JL, Malewiak C, Leynaud-Rouaud C, Berthier A. Alimentation et Nutrition humaine. Paris.
- Dajic Z (2006) Salt stress. In: Madhava Rao KV, Raghavendra AS, Janardhan Reddy K (ed) Physiology and molecular biology of salt tolerance in plant. *Springer*, Netherlands pp. 41-99.
- Davenport R, James RA, Zakrisson-Plogander A, Tester M, Munns R (2005) Control of sodium transport in durum wheat. *Plant Physiol.* 137: 807–818.
- Dean DR, Bolin J, Zheng L (1993) Nitrogenase metalloclusters : Structure, organisation and synthesis. *J. Bacteriol.* 175 : 6737-6744.
- Deane-Drummond CE (1986) A comparison of regulatory effects of chloride on nitrate uptake, and of nitrate on chloride uptake into *Pisum sativum* seedlings. *Physiol. Plant.* 66:115-126.
- De Lajudie P, Willems A, Pot B, Dewettinck D, Maestrojuan G, Neyra M, David Collins M, Dreyfus B (1994) Polyphasic Taxonomy of Rhizobia: Emendation of the Genus *Sinorhizobium* and Description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *IJSM* 44 (4): 715-733.
- Delgado MJ, Garrido JM, Ligeró F, Lluch C (1993) Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress. *Physiol. Plant.* 89, 824:829.
- Delgado MJ, Ligeró F, Lluch C (1994) Effect of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, *Faba bean*, common bean and soybeans plants. *Soil Biol. Biochem.* 26: 371-376.
- Denarié J, Debelle F, Prome JC (1996) Rhizobium lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Ann. Rev.*

## Références bibliographiques

---

*Biochem.* 65: 503-535.

- Dénarié J (2009) Les signaux des symbioses racinaires de la biologie moléculaire à l'agronomie. Séance solennelle de l'académie des sciences. Institut de France.
- De Pascale S, Barbieri G (1997) Effect of soil salinity and top removal on growth and yield of broadbean as green vegetable. *Sci. Hortic.* 71:147–165.
- Djordjevic MA (2004) *Sinorhizobium meliloti* metabolism in the root nodule : A proteomic perspective. *Proteomics* 4(7): 1859-1872.
- Doré C, Varoquaux F (2006) Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées. Cemagref, Cirad, Ifremer, inra, Collection savoir faire.
- Doyle JJ, Luckow MA (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.* 131: 900–910.
- Dreyfus B, Garcia JL, Gillis M (1988) Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 89-98.
- DSAAE (2013) Analyse statistique de l'évolution de la culture des principaux produits agricoles durant la période 2011-2013, Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural. Alger p.10
- Dubey RS, Rani M (1989) Salinity induced accumulation of free amino acids in germinating rice seeds differing in salt tolerance. *J. Agro. & Crop Sci.* 163: 236-247.
- Dubey RS, Singh AK (1999) Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolising enzymes in rice plants. *Biol. Plant.* 42: 233-239.
- Dubey RS, Pessarakli M (2001) Physiological Mechanisms of Nitrogen Absorption and Assimilation in Plants under Stressful Conditions. In: Handbook of Plant and Crop Physiology, 2nd Edition, Revised and Expanded (M. Pessarakli, Ed.). pp. 637-655, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Duc G, Bao S, Baum M, Redden B, Sadiki M, Suso M.J, Vishniakova M, Zong X (2010) Diversity maintenance and use of *Vicia faba* L. genetic resources. *Field Crops Res.* 115: 270-278.
- Eady RR (1986) Enzymology in free-living diazotrophs. In: Nitrogen fixation (Molecular Biology) Broughton WJ et Pühl A (Eds.), Clarendon press, Oxford. pp. 1-49.
- Easton LC, Kleidorfer S (2009) Effects of salinity levels and seed mass on germination in Australian species of *Frankenia* L. (Frankeniaceae). *Env. Exp. Bot.* 65: 345-352.
- El Hamdaoui A, Redondo-Nieto M, Rivilla R, Bonilla I, Bolanos L (2003) Effects of boron and calcium nutrition on the establishment of the Rhizobium leguminosarum-pea (*Pisum sativum*) symbiosis and nodule development under salt stress. *Plant, Cell & Env.* 26, (7) : 1003-1011.

## Références bibliographiques

---

- El-Hendawy S (2004) Salinity Tolerance in Egyptian Spring Wheat Genotypes. Ph.D. Thesis, Department für Pflanzenwissenschaften Technische Univ. München, Germany, pp. 2-3.
- El-iklil Y, Karrou M, Mrabet R, Benichou (2002) Effet du stress salin sur la variation de certains métabolites chez *Lycopersicum esculentum* et *Lycopersicum sheesm Eanii*. *Can. J. of Plant Sci.* 82: 177-183.
- Elkan GH (1992) Taxonomy of the rhizobia. *Can. J. Microbiol.* 38: 446-450.
- El Mekkaoui (1987) Contribution à l'étude de la tolérance à la salinité chez le blé dur –(*Triticum durum Desf.*) et l'orge (*Hordeum vulgare L.*) Diplôme de DEA Montpellier.
- El-Nady MF, Bellal EB (2005) Responses of faba bean (*Vicia faba L.*) plants to root nodule bacteria under salinity conditions. *J. Agric. Res.* 49: 245-253.
- El-Sayed Saffan S (2008) Effect of salinity and osmotic stresses on some economic plants. *Res. J. Agric. Biol. Sci.*, 4(2): 159-166.
- El Sayed HEA (2011) Influence of NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Treatments on Growth Development of Broad Bean (*Vicia Faba, L.*) Plant. *J. of Life Sci.* 5: 513-523.
- El-Tayeb MA (2006) Differential response of two *Vicia faba* cultivars to drought: Growth, pigments, lipid peroxidation, organic solutes, catalase and peroxidase activity. *Acta Agron. Hung.* 54: 25–37.
- Elzebroek T, Wind K (2008) Protein crops. In: Guide to cultivated plants. Plant production systems group, Crop and Weed Ecology Group, Wageningen University, Wageningen, Netherlands, pp, 226-262.
- Emerich C (1997) Nitrogénase : aspects biochimiques, moléculaires et génétiques. Dans « Assimilation de l'azote chez les plantes ». Moret-Gaudry JF (Ed.) INRA, Paris. pp. 63-177.
- Faghire M (2012) Rôle des microorganismes symbiotiques (cas des rhizobia) dans l'amélioration de la production agricole de *Phaseolus vulgaris* sous stress salin. Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech. 94 p.
- Fahmi AI, Nagaty HH, Eissa RA., Hassan MM (2011) Effect of salt stress on some nitrogen fixation parameters in *Faba bean*. *Pakistan J. Biol. Sci.* 14: 385-391.
- FAO (2007) The state of food and agriculture. FAO Agriculture series n° 38.
- Farissi M, Bouizgaren A, Faghire M, Bargaz A, Ghoulam C (2011) Agro-physiological responses of Moroccan alfalfa (*Medicago sativa L.*) populations to salt stress during germination and early seedling stages. *Seed Sci. Technol.* 39: 389-401.
- Farissi M, Aziz F, Bouizgaren A, Ghoulam C (2014) La symbiose Légumineuses-rhizobia sous conditions de salinité : Aspect agro-physiologique et biochimique de la tolérance. *IJISR* 11 (1): 96-104.

## Références bibliographiques

---

- Fernandez-Pascual M, De Lorenzo C, De Felipe MR, Rajalakshmi S, Gordon AJ, Thomas BJ, Minchin FR (2006) Possible reason for relative salt stress tolerance in nodules of white lupin cv. Multolupa. *J. Exp. Bot.* 47: 1709–1716.
- Fisher RA, Maurer R, (1978) Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses. *Aust. J. Agric. Res.* 29: 897-912.
- Fitter AH, Hay RKM (1987) *Environmental Physiology of Plants* (2<sup>nd</sup> ed.) Academic Press. London.
- Flexas J, Diaz-Espejo A, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbo M (2007) Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO<sub>2</sub> concentration around leaves. *Plant. Cell. Envir.* 30: 1284-1298.
- Flowers TJ, Troke PF, Yeo AR (1977) The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. of Plant Physiol.* 28: 89-121.
- Flowers TJ, Yeo AR (1981) Variability in the resistance of sodium chloride salinity within rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *New Phytol.* 88: 363-373.
- Flowers TJ (2003) Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 55:307-319.
- Foyer CH, Valadier MH, Migge A, Becker TW (1998) Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiol.* 117: 283-292.
- Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plantarum* 119 :355-364.
- Franche C, Lindstrom K, Elmerich C (2009) Nitrogen fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* 321: 35-59.
- Frank B (1889) Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. Deut. Bot. Ges.* 7: 332–346.
- Franssen HJ, Vijn I, Yang WC, Bisseling T (1992) Developmental aspects of the *rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol.* 19: 89-107.
- Fred EB, Baldwin IL, Mc Coy E (1932) *Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants*. University of Wisconsin Studies in Science 5.
- Fred EB, Waksman SA (1932) *Manitol Agar Laboratory Manual of General Microbiology*. McGraw-Hill, New York, NY, USA.
- Gadallah MAA (1999) Effects of proline and glycine betaine on *Vicia faba* response to salt stress. *Biol Plant* 4: 49-57.
- Gaballah MS, Gomaa AM (2005) Interactive effect of *Rhizobium* inoculation, sodium benzoate and salinity on performance and oxidative stress in two *Faba bean* varieties. *Inter. J. Agri. Bio.* 7: 495-498.

## Références bibliographiques

---

- Gaballah MS, Gomaa AM (2007) Performance of *Faba Bean* Varieties Grown under Salinity Stress and Biofertilized with Yeast. *J. of Applied Sci.* 4(1): 93-99.
- Gallais A, Bannerot H (1992) Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de sélection. Edition Quae 768 p. INRA Paris.
- Garg N, Singla R (2004) Growth, photosynthesis, nodule nitrogen and carbon fixation in the chickpea cultivars under salt stress. *Braz. J. Plant Physiol.* 16:137-146.
- Garg N, Aggarwal N (2011) Effects of interactions between cadmium and lead on growth, nitrogen fixation, phytochelatin, and glutathione production in mycorrhizal *Cajanus cajan* (L.) Mill sp. *J. Plant Growth Regul.* 30:286–300.
- Gaunt MW, Turner SL, Rigottier-Gois L, Lloyd-Macgilp SA (2001) Young Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *JP. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 2037-2048.
- Georgiev GI, Atkins CA (1993) Effects of salinity on N<sub>2</sub> fixation, nitrogen metabolism and Export and diffuse conductance of cowpea root nodules. *Symbiosis* 15: 239-255.
- Giraud E, Moulin L, Vallenet D, Barbe V, Cytryn E, Avarre JC, Jaubert M, Simon D, Cartieaux F, Prin Y, Bena G, Hannibal L, Fardoux J, Kojadinovic M, Vuillet L, Lajus A, Cruveiller S, Rouy Z, Mangenot S, Segurens B, Dossat C, Franck WL, Chang WS, Saunders E, Bruce D, Richardson P, Normand P, Dreyfus B, Pignol D, Stacey G, Emerich D, Verméglio A, Médigue C, Sadowsky M (2007) Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* 316(5829): 1307-1312.
- Glenn E, Brown JJ, Blumwald E (1999) Salt-tolerant mechanisms and crop potential of halophytes. *Crit. Rev. Plant.Sci.* 18 (2): 227- 255.
- Glew RH, Heath EC (1971) Studies on the extracellular alkaline phosphatase of *Micrococcus sodonensis*. I. Isolation and characterization. *J. of Biological Chemistry* 246: 15561 565.
- Gough C (2009) *Medicago truncatula*, un modèle pour l'étude des endosymbioses racinaires. *Biofutur* 298: 30-33.
- Graham PH (1992) Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* 38: 475–484
- Gratão PL, Prasad MNV, Cardoso PF, Lea PJ, Azevedo RA (2005) Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. *Braz. J. Plant Physiol.* 17:53-64.
- Grattan, SR, Grieve CM, (1998). Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Sci. Hortic.* 78: 127-157.
- Gravot A (2009) Les réponses de stress chez les végétaux. Polycopié. Université Rennes 1.

## Références bibliographiques

---

- Greenway H, Munns R (1980) Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 149-190.
- Grennan AK (2006) High Impact Abiotic Stress in Rice. An “Omic” Approach; *Plant Physiol.* 140: 1139–1141.
- Gusmao-Lima AI, Figueira E, de Almeida MP, Pereira IA (2005) Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae: glutathione as a detoxifying agent. *Can. J. Microbiol.* 51: 7-14.
- Graham PH, Sadowski MJ (2006) Root and Stem Nodule Bacteria of Legumes. *The Prokaryotes* 2006, pp. 818-841.
- Grime JP (1979) *Plant strategy and vegetation processes* Chichester, New York: John Wiley.
- Halbleib CM, Ludden PW (2000) Regulation of biological nitrogen fixation. *J Nutr. May* 130(5) :1081-4.
- Halder AK, Chakrabarty PK (1993) Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Folia Microbiol.* 38: 325–33.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 2. Clarendon Press, Oxford.
- Hamdy A (1999) Saline irrigation assessment for a sustainable use. Saline irrigation. Halophyte production and utilization. Projects n° 18 CT 96-0055: 152-162.
- Hamrouni L, Hanana M, Abdelly C, Ghorbel A (2011) Exclusion du chlorure et inclusion du sodium : deux mécanismes concomitants de tolérance à la salinité chez la vigne sauvage *vitis vinifera* subsp. *sylvestris* (var. sejnène) *Biotechnol. agronom. Soc. Environ.* 15(3): 387-400.
- Han HS, Lee KD (2005a) Plant growth promoting rhizobacteria. Effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 1:210-215.
- Haoula F, Ferdjani H, Ben El Hadj S, (2006) Effet de la salinité sur la répartition des cations (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Ca<sup>+</sup>) et du chlore (Cl<sup>-</sup>) dans les parties aériennes et les racines du ray-grass anglais et du chiendent. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 11 (13): 235-244.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK and Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463-499.
- Hassanein RA, Hashem HA, Khalil RR (2012) Stigmasterol treatment increases salt stress tolerance of *faba bean* plants by enhancing antioxidant systems. *POJ* 5(5): 476-485.
- Hassani A, Dellal A, Belkhodja, Kaid-Harche M (2008) Effet de la Salinité sur l'eau et certains osmolytes chez l'orge (*Hordeum Vulgare* L.). *Eur. J. of scientific Res.* 23(1): 61-69.
- Hardy WFR, Holsten R, Jackson E, Burns E (1968) The acetylene ethylene assay for nitrogen fixation: lab and field assay for nitrogen evaluation. *Plant Physiol.* 43: 1185-1207.

## Références bibliographiques

---

- Hauser F, Horie O (2009) A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high  $K^+/Na^+$  ratio in leaves during salinity stress. *Plant. Cell. Environment*. 33(4): 552-565.
- Hechenberger M, Schwappach B, Fischer WN, Frommer WB, Jentsch TJ, Steinmeyer K (1996) A family of putative chloride channels from Arabidopsis and functional complementation of a yeast strain with a CLC gene disruption. *J. Biol. Chem.* 271(52):33632-8.
- Heller JS, Kyriakidis A, Fong WF, Canellakis ES (1977) Orthinine decarboxylase antizyme is a normal component of uninduced H-35 cells and rat liver. *Eur. J. Biochem.* 81: 545-550.
- Henault C, Revellin C (2011) Inoculants of leguminous crops for mitigating soil emissions of the greenhouse gas nitrous oxide. *Plant and Soil* : 346 1-2.
- Hendricks CW, Doyle JD, Hugley B (1995) A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2016-2019.
- Hernandez-Armenta R, Wien HC, Eaglesham ARJ (1989) Carbohydrate Partitioning and Nodule Function in Common Bean after Heat Stress. *Crop science* 29(5): 1292-1297.
- Hopkins WG (2003) Physiologie végétale. Ed. de Boeck université. Paris. 514p.
- Horchani F, Prévot M, Boscarri A, Evangelisti E, Meilhoc E, Bruand C, Raymond P, Boncompagni E, Aschi-Smiti S, Puppo A, Brouquisse R (2011) Both Plant and Bacterial Nitrate Reductases Contribute to Nitric Oxide Production in *Medicago truncatula* Nitrogen-Fixing Nodules. *Plant Physiol.* 155: 1023-1036.
- Iqbal M, Ashraf M, Jamil A, Rehman S (2006) Does seed priming induce changes in the levels of some endogenous plant hormones in hexaploid wheat plants under salt stress? *Journal of Integrative Plant Biol.* 48: 181-189.
- INSID (2008) Les sols salins en Algérie , Juillet 2008, 7 pages.
- Itai C (1999) Role of phytohormones in plant responses to stresses. In: Lerner HR (eds) Plant Responses to Environmental Stresses. From phytohormones to genome reorganization. Marcel Dekker, New York – Basel. pp. 287-301.
- Ivanov S, Fedorova E, Bisseling T (2010) Intracellular plant microbe associations: secretory pathways and the formation of perimicrobial compartments. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13:372–377.
- Jabeen N, Ahmad R (2011) Foliar application of potassium nitrate affects the growth and nitrate reductase activity in sunflower and safflower leaves under salinity. *Not. Bot. Horti. Agrobot.* 39(2): 172-178.
- Jarvis BDW, Mc lean, TS, Robertson IGC, Fanning GR (1977) Phenetic similarity and DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand native legumes and *Rhizobium* strains from agricultural plants. *New Zealand J. Agric. Res.* 20: 42-52.

## Références bibliographiques

---

- Jarvis BDW, Downer HL, Young JPW (1992) Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*: 42: 93-96.
- Jarvis BDW, Van Berkum P, Chen WX, Nour S, Fernandez MP, Cleyet-Marrel JC, Gillis M (1997) Transfert of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 895-898.
- Jia W, Wang H, Zhang Ch, Zhang J (2002) Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *J. Exp. Bot.* 53: 2201-2206.
- Jiang Y, Huang B (2001) Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool-season grasses. *J. Exp. Bot.* 52:341-349.
- Jones HG, Jones MB (1989) Introduction: Some terminology and common mechanisms. In: Jones HG, Flowers TJ, Jones MB (ed.). *Plant Under Stress: Biochemistry, Physiology and Ecology and Their Application to Plant Improvement*, Cambridge University Press, Cambridge-New York, pp. 1-10.
- Jordan DC (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 136-139.
- Jordan DC (1984) Rhizobiaceae. In Krieg NR and Holt JG ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins, Co., Baltimore. pp. 234-245.
- Jordan, DC (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 136-139.
- Kanso S, Patel BKC (2003) *Microvirga subterranea* gen. nov., sp. nov., a moderate thermophile from a deep subsurface Australian thermal aquifer. *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.* 53: 401- 406.
- Karanja NK, Wood M (1988) Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya: Tolerance of high temperature and abiotic resistance. *Plant Soil.* 112: 15-22.
- Kassem M, Cappelano A, Gounot AM (1985) Effet du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficacité de *Rhizobium meliloti*. *Mircen Journal* 1: 63-75.
- Katerji N, Mastrorilli M, Hamdy A, Hoorn JW (2002) Water status and osmotic adjustment of broad-bean (*Vicia faba* L.) in response to soil salinity. *Acta Hort.* 573: 305-310.
- Kessiran MM (2003) Gestion de l'irrigation dans le milieu salin. Recueil des journées techniques sur la qualité des eaux du sud. Volume III, El Oued. Les 19 et 20 mai 2003.
- Khadri M, Tejera NA, Lluch C (2007) Sodium chloride-ABA interaction in two common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars differing in salinity tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 60: 211-218

## Références bibliographiques

---

- Khan MA, Ungar IA (1997) Effect of temperature regime on recovery of seed germination of halophytes from saline conditions. *Am. J. of Bot.* 84: 279-283.
- Khan NA (2003) NaCl-inhibited chlorophyll synthesis and associated changes in ethylene evolution and antioxidative enzyme activities in wheat. *Biol. Plantarum* 47(3): 437-440.
- Khan MA, Weber D J (2008) Ecophysiology of high salinity tolerant plants (tasks for vegetation science) (1st edn.) Amsterdam, The Netherlands: Springer.
- Khan MS, Zaidi M, Ahemad M, Oven M, Wani PA (2010) Plant growth promotion by phosphate solubilizing-fungi current perspective. *Arch. Agron. Soil Sci* 56: 73-98.
- Laguerre G, Louvrier P, Allard MR, Amarger N, (2003) Compatibility of Rhizobial Genotypes within Natural Populations of *Rhizobium leguminosarum* Biovar viciae for Nodulation of Host Legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(4) : 2276-2283.
- Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM (1996) The molecular-genetic of nitrogen assimilation into amino acids in higher plant. *Annual Review of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 47: 569-593.
- Lambin S (1969) Précis de microbiologie, tome 1. Technique de microbiologie. Edition Masson. 669 pages.
- Larpent-Gourgaud M, Larpent JP (1997) Memento technique de Microbiologie. Tec et Doc édition. 1039 pages.
- Läuchli A, Grattan SR (2007) Plant growth and development under salinity stress. In: Jenks et al., (ed) Advances molecular breeding toward drought and salt tolerant crops. *Springer* 1-32.
- Laumonier R (1979) Cultures légumières et maraichères. Tome III. Ed.Baillièrre.Paris.279 p.
- Lawlor DW (2002) Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: Stomatal metabolism and the role of ATP. *Annals Bot.* 89 : 871–885.
- Leclerc H, Gaillard JL, Simonet M (1983) : Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Ed. Doin 540 pages.
- Le Houerou HN (1993) Land degradation in mediterranean Europe: Can agroforestry be a part of the solution. *Agroforestry Systems* 21:43-61.
- Lepri E (2006) La salinisation causée par l'irrigation. Les notes d'analyse du CIHEM n° 13.
- Levigneron A, Lopez F, Vansuyt G, Berthomieu P, Fourcroy P, Casse-Delbart F (1995) Les plantes face au stress salin. *Cahiers Agricultures* 4(4) : 263-273.
- Levitt J (1980) Responses of plants to environmental stress. Vol II. *Academic Press London.New York*: 365-453.

## Références bibliographiques

---

- Lichtenthaler HK, Welburn AR (1983) Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. T.* 11: 591-592.
- Limpens E, Bisseling T (2003) Signaling in symbiosis. *Curr. opin. Plant Biol.* 6: 343-350.
- Lin Y, Cheng CL (1997) A chlorate-resistant mutant defective in the regulation of nitrate reductase gene expression in *Arabidopsis* defines a new *HY* locus. *Plant Cell* 9: 21-35.
- Lin DX, Wang ET, Tang H, He YR, Guan SH, Chen WX, (2008) *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea* *IJSEM* 58 (6): 1409-1413.
- Lindstrom, K (1989) *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 365-367.
- Lindström K, Murwira M, Willem A, Altier N (2010) The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in microbiology* 161 : 453-463.
- Löhnis F, Hansen R (1921) Nodule bacteria of leguminous plants. *J. Agr. Res.* 20 : 543-546.
- Lombardi T, Lupi B (2006). Effect of salinity on the germination and growth of *Hordeum secalinum* Schreber (Poaceae) in relation to the seed after ripening time. *Atti. Soc. Tosc. Sci. Nat. Mem.*113: 37-42.
- Long SR (2001) Genes and Signals in the *Rhizobium*-Legume Symbiosis. *Plant Physiol.* 125(1): 69-72.
- López M, Herrera-Cervera JA, Iribarne C, Tejera N A, Lluch C (2008) Growth and nitrogen fixation in *Lotus Japonicus* and *Medicago truncatula* under salt stress: nodule carbon metabolism. *J. Plant Physiol.* 165: 641-650.
- Lluch C, Tejera N, Herrera Cervera JA, Lopez M, Barranco Gresa JR, Palma FJ, Gozalvez M, Iribarne C, Moreno E, Oscana A (2007) Saline stress tolerance in legumes; *Lotus Newlett* 37(2):76-77.
- Maaouia-Houimli S, Denden M, Dridi-Mouhandes B, Ben Mansour-Gueddes S (2011) Caractéristiques de la croissance et de la production en fruits chez trois variétés de piment (*Capsicum annum* L.) sous stress salin. *Tropicultura* 29(2): 75-81.
- Maas EV (1996) Crop salt tolerance. In *Agricultural Salinity Assessment and Management*, Ed. K.K. Tanji, Am. Soc. Civil Eng., New York . pp. 262-304.
- Mahajan S, Pandey GK, Tuteja N (2008) Calcium and salt stress signaling in plants: Shedding light on SOS pathway. *Arch Biochem Biophys* 471: 146-158.
- Manchanda G, Garg N (2008) Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiol. Plant* 30: 595-618.
- Mane AV, Deshpande TV, Wagh VB, Karadge BA, Samant JS (2010) A critical review on physiological changes associated with reference to salinity. *Inter. J. Env. Sci.* 1: 1192-1216.

## Références bibliographiques

---

- Mashali A, Suarez DL, Nabhan H, Rabindra R (2005) Integrated management for sustainable use of salt-affected soils. Rome: FAO Soils Bulletin.
- Marchal N, Bourdan S, Richard CL (1987) Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed Doin, Paris, 432 pages.
- Marlet S, Job JO (2006) Processus et gestion de la salinité des sols. In : Tiercelin Jean-Robert (ed.), Vidal Alain (ed.). Traité d'irrigation. Paris : Lavoisier Tec et Doc, p. 797-822.
- Martinez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, Franco AA, Graham P, Pardo MA (1991) *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena sp.* trees *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 417-426.
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *rhizobium* recipes? *Trends Microbiol.* 17(10): 458-66.
- Mateos PF, Baker DL, Petersen M, Velázquez E, Jiménez-Zurdo JI (2001) Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium* legume symbiosis, *Can. J. Microbiol.* 47(6): 475-487.
- Maunoury N, Kondorosi A, Kondorosi E, Mergaert P (2008) Cell biology of nodule infection and development. In: James EK, Sprent JI, Dilworth MJ, Newton WE, eds. Nitrogen-fixing leguminous symbioses. New York, NY, USA: Springer-Verlag, 153-189.
- Maxted N (1995) An ecogeographical study of *Vicia* subgenus *Vicia*. Systematic and Ecogeographical Studies on Crop Genepools, vol. 8. IPGRI, Rome.
- McVicar R, Panchuk D, Brenzil C, Hartley S, Pearse P, Vandenberg A (2013) *Faba bean*. Gov. Saskatchewan, Agriculture, Crops.
- Messina MJ (1999) Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 439-450.
- Mermoud A (2006) Cours de physique du sol, Maitrise de la salinité du sol ; Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne.
- Mezni M, Bizid E, Hamza M (1999) Effets de la salinité des eaux d'irrigation sur la survie et la croissance de trois cultivars de luzerne pérenne (*Medicago sativa* L.). *Fourrages* 158: 169-178.
- Miransari, M, Smith DL (2009) Rhizobial lipo-chito oligosaccharides and gibberellins enhance barley (*Hordum* L.) seed germination. *Biotechnol.* 8:270-275.
- Misra N, Dwivedi UN (2004) Genotypic difference in salinity tolerance of green gram cultivars. *Plant Sci.* 166 (5) : 1135-1142.
- Mohamed MH, Kramany MF (2005) Salinity tolerance of some mungbean varieties. *J. Appl. Sci. Res.* 1 : 78-84.

## Références bibliographiques

---

- Mohsen AA, Ebrahim MKH, Ghoraba WFS (2013) Response of salt-stressed *Vicia faba* plant to application of ascorbic acid on the growth and some metabolites. *Iranian J. of Plant Physiol.* 4 (2): 957-976.
- Moradi F, Ismail AM (2007) Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. *Ann. of Bot.* 99(6): 1161-1173.
- Morales VM, Martinez-Molina E, Hubbell DH (1984) Cellulase production by *Rhizobium*. *Plant Soil*, 80 : 407-415.
- Moule C (1972) Plantes sarclées et diverses ; Phytotechnie spéciale; La maison Rustique, Paris, 251 p.
- Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C (2001) Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature*. 411: 948-950.
- Moussa HR (2004) Amelioration of Salinity-Induced Metabolic Changes in Soybean by Weed Exudates. *Int. J. Agr. Biol.* 6(3): 499-503.
- Mouri C, Benhassaini H, Bendimered FZ, Belkhodja M (2012) Seasonal variation of the content in proline and soluble sugars in oyat (*Ammophila arenaria* (L.) Link) growing in natural conditions of the Algerian western coast. *Acta Bot. Gallica.* 159:127–135.
- Mugdhal V, Madaan N, Mugdhal A (2010) Biochemical mechanisms of salt tolerance in plants. *Int. J. of Bot.* 6(2): 136-143.
- Munns R, Termaat A (1986) Whole-plant response to salinity. *Aust. J. Plant. Physiol.* 13: 143-160.
- Munns R, Schachtman D, Condon A (1995) The Significance of a Two-Phase Growth Response to Salinity in Wheat and Barley. *Functional Plant Biology.* 22(4): 561-569.
- Munns R, Hare RA, James RA, Rebetzke GJ (2000) Genetic variation for improving the salt tolerance of durum wheat. *Austral. J. of Agri. Res.* 51: 69–74.
- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 239-250.
- Munns R (2005) Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 167: 645-663.
- Munns R, James RA, Lauchli A (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.* 57: 1025-1043.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59: 651-681.
- Muratova V (1931) Common Beans (*Vicia faba*). *Bull. Appl. Bot. Genet. Plant Breed* 50: 1-298.
- Murillo-Amador B, Jones HG, Kaya C, Aguilar RL, Garcia-Hernandez JL, Troyo-Diequez E, Avila-serrano NY, Rueda-Pente (2006) Effects of foliar application of calcium nitrate on

## Références bibliographiques

---

growth and physiological attributes of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) grown under salt stress. *Env. and Exp. Bot.* 58:188-196.

Nachtergaele FO, Young A (2000) Land resource potential and constraints at regional and country levels. World Soil Resources Reports 90. Land and Water Development Division, FAO, Rome. Bot, A.J.,

Nair V and GA Turner (1984) Determination of the structure of the adduct from guanosine and glycidaldehyde. *Tetra. Lett.* 25(3): 247-250.

Newton WE (1993) Nitrogenases: Distribution, composition, structures and function. In : New Horizons in Nitrogen Fixation (Palacios R, Mora J, Newton WE, Eds.) *Kluwer Academic Publishers*. Dordrecht 5-18.

Niu, X., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. and Pardo, J.M. (1995) Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.* 109, 735-742.

Nultsh W, Miesch R (1998) Botanique générale, éd. De Boeck université, 602p.

Ober ES, Sharp RE (1994) Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. I. Requirement for increased levels of abscisic acid. *Plant Physiol.* 105: 981-987.

Oldroyd GE, Downie JA (2004) Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(7): 566-76.

Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 45: 119-144.

Ott T, van Dongen JT, Gunther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvardi MK (2005) Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol.* 15: 531-535.

Paquin R (1986) Effet de l'humidité du sol sur la teneur en proline libre et des sucres totaux de la luzerne enduree au froid et à la sécheresse. *Can. J. Plant*, 66, pp. 95-101.

Parida AK, Das AB, Sanada Y, Mohanty P (2004) Effects of salinity on biochemical components of the mangrove *Aegiceras corniculatum*. *Aquatic Botany.* 80: 77-87.

Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60: 324-349.

Patriarca EJ, Tatè R, Iaccarino M (2002) Key role of bacterial NH<sub>4</sub><sup>+</sup> metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 66: 203-222.

Perret X, Staehelin C, Broughton WJ (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64: 180-201.

## Références bibliographiques

---

- Pessarakli M (2010) Response of Green Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Terms of Dry Matter Production, Nitrogen Uptake, and Water Absorption under Salt Stress Conditions. In: Handbook of Plant and Crop Stress, 3rd Edition, Revised and Expanded (M. Pessarakli, Ed.), pp. 879-897, CRC Press, Taylor & Francis Publishing Company, Florida.
- Peters JW, Szilagyi RK (2006) Exploring new frontiers of nitrogenase structure and mechanism. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10 :101–108
- Pladys D, Rigaud J (1985) Senescence in French bean nodules: Occurrence of different proteolytic activities. *Physiol. Plant.* 63: 43-48.
- Pitann B, Kranz T, Zorb C, Walter A, Schurr U, Muhling KH (2011) Appoplastic pH and growth in expanding leaves of *Vicia faba* under salinity. *Env Exp Bot* 74:31-36.
- Pocard JA, Vincent N, Boncompagni E, Smith LT, Poggi MC, Le Rudulier D (1997) Molecular characterization of the bet genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34. *Microbiol.* 143: 1369-1379.
- Popova L, Stoinova Z, Maslenkova L (1995) Involvement of abscisic acid in photosynthetic process in *Hordeum vulgare* L. during salinity stress. *J. of Plant Growth Regulation* 14: 211-218.
- Proléa (2009) Féverole. [www.prolea.com](http://www.prolea.com).
- Pueppke SG (1986) Nodule distribution on legume roots. Specificity and response to the presence of soil. *Soil. Biol. Biochem.* 18: 601-606.
- Qadir M, Ghafoor A, Murtaza G (2001) Amelioration strategies for saline soils: a review *Land Degradation & Development* Volume 11(6): 501–521.
- Qiu QS, Guo Y, Quintero FJ, Pardo JM, Schumaker KS, Zhu JK (2003) Regulation of vacuolar Na/H exchange in *Arabidopsis thaliana* by the SOS pathway. *J. Biol. Chem.* 279:207–215.
- Rabie GH, Almadini AM (2005) Role of bioinoculants in development of salt-tolerance of *Vicia faba* plants under salinity stress. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 210–222.
- Rai R (1983) The salt tolerance of *Rhizobium* strains and lentil genotypes and lentil genotypes and the effect of salinity on aspects of symbiotic N-fixation. *J. Agric. Sci. Com.* 100:81-86.
- Rai R, Singh RP (1999) Effect of salt stress on interaction between lentil (*Lens culinaris*) genotypes and *Rhizobium* spp. Strains : Symbiotic N<sub>2</sub> fixation in normal and sodic soils. *Biol. Fertil. Soils* 29: 187-195.
- Ramirez-Bahena MH, Garcia-Fraile P, Peix A, Valverde A, Rivas R, Igual JM, Mateos, PF, Martinez-Molina E, Velazquez E (2008) Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926 AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 2484-2490.

## Références bibliographiques

---

- Räsänen LA (2002) Biotic and abiotic factors influencing the development of N<sub>2</sub>-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis*. Thèse de doctorat de l'université de Helsinki Finland, np. 255.
- Revelin C (2009) Les symbioses fixatrices d'azote, Colloque : Alliance au pays des racines ; [www.snhf.org](http://www.snhf.org).
- Rivas R, Sánchez M, Trujillo ME, Zurdo-Pineiro JL, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velazquez E (2003) *Xylanimonas cellulositytica* gen. nov., sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from a decayed tree (*Ulmus nigra*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 99-10.
- Rogel MA, Ormeno-Orrillo E, Romero EM (2011) Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst. and Applied Microbiol.* 34: 96-104.
- Robin P, Conejero G, Passam L, Salsac L (1983) Evaluation de la fraction métabolisable du nitrate par la mesure *in situ* de sa réduction. *Physiol. Vég.* 21(1): 115-122.
- Rouabhia AEK, Djabri L (2010) L'irrigation et le risque de pollution saline. Exemple des eaux souterraines de l'aquifère miocène de la plaine d'El Ma Labiod. *Larhyss Journal* 8: 55-67.
- Rozema J (1975) The influence of salinity, inundation and temperature on the germination of some halophytes and non halophytes. *Oecol. Plant.* 10: 341-353.
- Rus A, Yokoi S, Sharkhuu A, Reddy M, Lee BH, Matsumoto TK, Koiwa H, Zhu JK, Bressan, RA, Hasegawa PM (2001a). AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls (Na<sup>+</sup>) entry into plant root. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 14150:14155.
- Saadalah K, Drevon JJ, Haji M, Abdelly C (2001) Genotypic variability for tolerance to salinity of N<sub>2</sub>-fixing common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Agronomie* 21: 675- 682.
- Saïdi S, Ramírez-Bahena MH, Santillana N, Zuniga D, Alvarez-Martinez E, Peix A, Mhamdi R, Velazquez E. (2014) *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* in several continents. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 242-247.
- Salehi M, Salehi F, Poustini K, Heidari-Sharifabad H (2008) The effect of salinity on the nitrogen fixation in four cultivars of *Medicago sativa* L. in the seedling emergence stage. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 4:413-415.
- Saleh-Rastin N, Petersen M, Coleman S, Hubbell D (1991) Rapid plate assay for hydrolytic enzymes of *Rhizobium*, p. 188. In: D. Keister and P. Cregan (eds.). The rhizosphere and plant growth. *Kluwer Academic*. Dordrecht, The Netherlands.
- Sanogho S (1977) Contribution à l'étude de *rhizobium* de quelques espèces de légumineuses spontanées de la région de Bamako, (Mali). *Cah. ORSTOM, sér. Biol.* 2(7): 145-165.
- Sawada H, Ieki H, Kobayashi S, Oiyama H (1993) Grouping of tumorigenic *Agrobacterium* spp. based on Ti plasmid-related phenotypes. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 58: 244-252.

## Références bibliographiques

---

- Sawada H, Kuykendall LD, Young JM (2003) Changing concepts in the systematic of bacterial nitrogen-fixing legume symbiots. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49: 155-179.
- Schiels R, Burnett W (1960) Determination of protein bound carbohydrate in serum by a just modified anthrone method. *Anal. Chem.* 32: 885-886.
- Schrire B, Mackinder B, Lock M (2005) Legumes of the world. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 77: 75-99.
- Scott SJ, James RA, Williams WA (1984) Review of data analysis methods for seed germination. *Crop Sci.* 24:1192-1199.
- Serraj R, Roy G, Drevon JJ (1994) Salt stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and in their permeability to oxygen diffusion. *Physiol Plantarum* 91: 161-168.
- Serrano A, Chamber M (1990) Nitrate reduction in *Bradyrhizobium* sp (Lupinus) strains and its effects on their symbiosis with *Lupinus luteus*. *J. Plant Physiol*, 136: 240–246.
- Shalata A, Tal M (1998) The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*", *Physiol. Plantarum* 104(2): 169-174.
- Sheokand S, Malik S, Babber S (2000) Nodule structure and functioning in chickpea (*Cicer arietinum*) as affected by salt stress. *Biologia plantarum* 43(2): 269-273.
- Sherwood JE, Truchet GL, Dazzo FB (1984) Effect of nitrate supply on the in-vivo synthesis and distribution of trifollin A, a *Rhizobium trifolii*-binding lectin, in *Trifolium repens* seedlings. *Planta.* 162(6): 540-547.
- Shiraishi A, Matsushita N, Hougetsu T (2010) Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. *Appl. Microbiol* 33: 269–274.
- Singh RK, Malik N, Singh S (2013) Impact of rhizobial inoculation and nitrogen utilization in plant growth promotion of maize (*Zea mays* L.). *Bioscience* 5: 8-14.
- Singleton P (1999) Bactériologie 2ème cycle. Dunod .415 pages.
- Slabu C, Zorb C, Steffens D, Schubert S (2009) Is salt stress of *Faba bean* (*Vicia faba*) caused by Na<sup>+</sup> or Cl<sup>-</sup> toxicity?. *J. Plant. Nutr. Soil. Sci.* 172: 644-650.
- Slama F (2004) salinity and crop production, Center of Academic Publications, Tunisia, 163p.
- Smibert RM, Krieg NR (1984) General characterization. Dans "Manual of methods for general bacteriology", Gerhard P. (ed.) *American Society of Microbiol.*: 409-443.
- Smirnoff N (1995) Antioxidant systems and plant response to the environment. In "Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation" (N Smirnoff ed), *Bios Scientific*, Oxford, pp. 217-243.

## Références bibliographiques

---

- Smith LT, Pocard JA, Bernard T, Le Rudulier D (1988) Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 170(7) : 3142-3149.
- Smith PT, Comb BG (1991) Physiological and enzymatic activity of pepper seeds (*Capsicum annuum*) during priming. *Physiol. Plantarum* 82: 433-439.
- Solomonson LP, Barber MJ (1990) Assimilatory nitrate reductase: Functional properties and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 41: 225-253.
- Somasegaran P, Hoben HJ (1985) Methods in legume *Rhizobium* technology. Hawaii: Nifal Project; Mircen, 1985. 367p.
- Somasegaran P, Hoben HJ (1994) Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-*Rhizobium* technology. *Springer-Verlag*, New York: 332-341.
- Soussi M, Ocana A, Lluch C (1998) Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). *J. Exp. Bot.* 49: 1329-1337.
- Sprent JI, Zahran HH (1988) Infection, development and functioning of nodules under drought and salinity. In: Beck DP, Materon LA, eds. Nitrogen fixation legumes in Mediterranean agriculture. Dordrecht: Martinus Nijhoff: 145-151.
- Sprent JI (2001). Nodulation in legumes. London, UK: Royal Botanic Gardens Kew.
- Stowers MD (1985) Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 39: 89-108.
- Streeter JG, DeVine PJ (1983) Evaluation of nitrate reductase activity in *Rhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 521-524.
- Streeter J (1988) Inhibition of legume nodule formation and N<sub>2</sub> fixation by nitrate. *CRC Crit Rev. Plant Sci.* 7: 1-23.
- Subbarao GV, Johansen C (1994) Potential for genetic improvement in salinity tolerance in legumes: Pigeon Pea. In: Pessarakli, M. (ed.). Handbook of plant and crop stress, 581 - 595. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Sy A, Giraud E, Jourand P (2001) Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bacteriol* 183: 214-220.
- Szabolcs I (1989) Salt affected soils. Boca Raton: CRC Press.
- Taffouo VD, Meguekem L, Kenne M, Magnitsop A, Akoa A, Ourry A (2009) Salt stress effects on germination, plant growth and accumulation of metabolites in five leguminous plants. *Afr. Cro.Sci.Conf.* 9: 157-161.
- Tavakkoli E, Rengasamy P, McDonald G K (2010) High concentrations of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions in soil solution have simultaneous detrimental effects on growth of *faba bean* under salinity stress. *J. Exp. Bot.* 61(15): 4449-4459.

## Références bibliographiques

---

- Tejera NA, Soussi M, Lluch C (2005) Physiological and nutritional indicators of tolerance to salinity in chickpea plants growing under symbiotic conditions. *Env. Exp. Bot.* 58: 17-24.
- Terzo M, Rasmont P (2007) Les livrets de l'agriculture n°14 : abeilles sauvages, bourdons et autres insectes pollinisateurs. Ministère de la région Wallone. Direction générale de l'agriculture.
- Tester M, Davenport R (2003) Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of Botany* 91: 503–527.
- Tian CF, Wang ET, Wu LJ, Han TX, Chen WF, Gu CT, Gu JG, Chen WX (2008) *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *IJSEM* 58(12): 2871-2875.
- Timmers AC, Soupène E, Auriac MC, de Billy F, Vasse J, Boistard P, Truchet G (2000) Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 13(11): 1204-13.
- Tremblin G, Binet P (1984) Halophile et résistance au sel chez *Halopepelis amplexicaulis* (Vahl) *Ung. Oecol. Plant.* 5: 291-29.
- Trinchant JC, Boscari A, Spennato G, Van de Sype G, Le Rudulier D (2004) Proline betaine accumulation and metabolism in Alfalfa plants under sodium chloride stress. Exploring its compartmentalization in nodules. *Plant. Physiol.* 135: 1583-1594.
- Trujillo ME, Willems A, Abril A, Planchuelo AM, Rivas R, Ludena D, Mateos PF, Martinez-Molina E, Velazquez E (2005). Nodulation of *Lupinus* by strains of *Ochrobactrum lupine* sp. nov. *Appl Environ. Microbiol.* 71 : 1318–1327
- UNIP (2014) lettre de l'UNIP sur les productions et les marchés. 28 novembre 2014, n°394.
- Valverde A, Velazquez E, Santos FF, Vizcaino N, Rivas R, Mateos PF, Molina EM, Igual JM, Willem A (2005) *Phyllobacterium trifolii* sp. Nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1985-1989.
- Viégas RA, Silveira JAG (1999) Ammonia assimilation and proline accumulation in young cashew plants during long-term exposure to NaCl-salinity. *Braz. J. Plant Physiol.* 11:153-159.
- Vincent JM (1970) A manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP. Handbook n°15 – Blackwell scientific publishers, Oxford.
- Vincent JM (1980) Factors controlling the legume-*Rhizobium* symbiosis. In WE Newton, WH Orme-Johnson, eds, Nitrogen Fixation 11. University Park Press, Baltimore, MD, pp 103-109.
- Vinuesa P (2001) Genotypic characterization of rhizobia associated with tropical and temperate legumes of ecological and agronomic interest. [www.uni-marburg.de/~werner/rhizobial\\_diversity.htm](http://www.uni-marburg.de/~werner/rhizobial_diversity.htm).
- Wang W, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta.* 218: 1-14.

## Références bibliographiques

---

- Westoby M, Falster DS, Moles AT, Vesk PA, Wright IJ, (2002) Plant ecology strategies: some leading dimensions of variation between species. *Ann.Rev.Ecol.Syst.* 33: 125-159.
- Xie J, Knight JD, Leggett ME (2009) Comparison of media used to evaluate *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* for phosphate-solubilizing ability. *Can. J. Microbiol.* 55: 910-915.
- Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zhu J-K (2001) The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *The Plant Cell* 13: 2063-2083.
- Wielbo J, Marek-Kozaczuk M, Kubik-Komar A, Skorupska A (2007) Increased metabolic potential of *Rhizobium* spp. is associated with bacterial competitiveness. *Can. J. Microbiol.* 53: 957-967.
- Yokota A, Takahara K, Akashi K (2006) Physiology and Molecular Biology of Stress, Tolerance in Plants. Madhava Rao K, Raghavendra AS, Janardhan Reddy K (eds.), pp. 15-39.
- Yoshiba Y, Kiyosue T, Katagiri T, Ueda H, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Wada K, Harada T, Shinozaki K (1995) Correlation between the induction of a gene for  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J.* 7:751-760.
- Zaghouane O (1991) The situation of faba bean (*Vicia faba* L.) in Algeria. *Options Méditerranéennes. Série Séminaires* 10: 123-125.
- Zakhia F, De Lajudie P (2001) Taxonomy of rhizobia. *Agronomie.* 21 (6-7) : 567-576.
- Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Cleyet-Marel JC, Gillis M., Dreyfus B, de Lajudie P (2004) Characterisation of wild legume nodulating bacteria (BNL) in the infra-arid zone of Tunisia. *Syst. Appl. Microbiol.* 27(3): 380-395.
- Zahran HH, Sprent J (1986) Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair and nodulation of *Vicia faba* (L.) plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* 167: 303-309.
- Zahran HH (1999) Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(4): 968-89.
- Zahran, HH (2001) Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, Nitrogen fixation and biotechnology. *J. of Biotech.* 91: 143-153.
- Zaman-Allah M, Sifi B, Taief B, El Aouni MH (2008) Paramètres agronomiques liés à la tolérance au sel chez le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biot. Agron. Soc. Envir.* 13 : 113-119.
- Zhang X, Harper R, Karsisto M, Lindstrom K (1991) Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from root nodules of leguminous trees. *Int. J. Syst. Bact.* 41: 104-113.

## Références bibliographiques

---

- Zhang HX, Hodson JN, Willaims JP, Blumwald E (2001) Engineering salt-tolerant Brassica plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12832-12836
- Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Sci.* 6: 66-71
- Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol* 53: 247-273.
- Zhu JK (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:441–445.
- Zhu J, Fu X, Koo YD, Zhu JK (2007) An enhancer mutant of Arabidopsis salt overly sensitive 3 mediates both ion homeostasis and the oxidative stress response. *Mol. and Cell Biol.* 27: 5214-5224.
- Zid E, Grignon C (1991) Les tests de sélection précoce pour la résistance des plantes aux stress. Cas des stress salin et hydrique. L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides, AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris: 91-108.

# **ANNEXES**

## Annexes

### Tableau d'analyses de la variance des paramètres étudiés

Tableau 1 : pourcentage de germination cumulée

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	72607,143	6	12101,190	149,485	,000
B	7165,476	3	2388,492	29,505	,000
A * B	16192,857	18	899,603	11,113	,000
Erreur	4533,333	56	80,952		
Total	617500,000	84			
Total corrigé	100498,810	83			

*R* deux = ,955 (*R* deux ajusté = ,933)

Tableau 2 : hauteur de la plante

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	6185,638	3	2061,879	51,483	,000
B	3301,538	3	1100,513	27,478	,000
A * B	304,813	9	33,868	,846	,577
Erreur	2563,200	64	40,050		
Total	144793,000	80			
Total corrigé	12355,188	79			

*R* deux = ,793 (*R* deux ajusté = ,744)

Tableau 3 : surface foliaire

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	9887,138	3	3295,713	87,073	,000
B	1867,138	3	622,379	16,443	,000
A * B	1406,513	9	156,279	4,129	,000
Erreur	2422,400	64	37,850		
Total	53211,000	80			
Total corrigé	15583,188	79			

*R* deux = ,845 (*R* deux ajusté = ,808)

Tableau 4 : nombre de feuilles

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	2804,238	3	934,746	18,091	,000
B	3246,138	3	1082,046	20,942	,000
A * B	634,313	9	70,479	1,364	,223
Erreur	3306,800	64	51,669		
Total	95731,000	80			
Total corrigé	9991,487	79			

*R* deux = ,669 (*R* deux ajusté = ,591)

**Tableau 5 : nombre de ramifications**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	53,450	3	17,817	38,523	,000
B	53,350	3	17,783	38,450	,000
A * B	3,150	9	,350	,757	,656
Erreur	29,600	64	,462		
Total	436,000	80			
Total corrigé	139,550	79			

*R deux = ,788 (R deux ajusté = ,738)*

**Tableau 6: Poids sec de la partie aérienne**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	3041,231	3	1013,744	344,410	,000
B	76,573	3	25,524	8,672	,000
A * B	649,303	9	72,145	24,511	,000
Erreur	188,379	64	2,943		
Total	10529,968	80			
Total corrigé	3955,486	79			

*R deux = ,952 (R deux ajusté = ,941)*

**Tableau 7: Poids sec de la partie racinaire**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	167,075	3	55,692	96,046	,000
B	40,031	3	13,344	23,012	,000
A * B	42,966	9	4,774	8,233	,000
Erreur	37,110	64	,580		
Total	1587,583	80			
Total corrigé	287,183	79			

*R deux = ,871 (R deux ajusté = ,840)*

**Tableau 8 : poids sec total**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	4646,837	3	1548,946	432,613	,000
B	72,615	3	24,205	6,760	,000
A * B	918,661	9	102,073	28,509	,000
Erreur	229,148	64	3,580		
Total	19590,037	80			
Total corrigé	5867,262	79			

*R deux = ,961 (R deux ajusté = ,952)*

**Tableau 9 : rapport partie racinaire / partie aérienne**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	1,266	3	,422	20,899	,000
B	1,336	3	,445	22,064	,000
A * B	,469	9	5,210E-02	2,581	,013
Erreur	1,292	64	2,019E-02		
Total	28,049	80			
Total corrigé	4,363	79			

*R* deux = ,704 (*R* deux ajusté = ,634)

**Tableau 10 : Teneur en chlorophylle a**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	424,563	3	141,521	38,387	,000
B	54,471	3	18,157	4,925	,004
A * B	35,717	9	3,969	1,076	,392
Erreur	235,950	64	3,687		
Total	4415,167	80			
Total corrigé	750,701	79			

*R* deux = ,686 (*R* deux ajusté = ,612)

**Tableau 11 : Teneur en chlorophylle b**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	66,626	3	22,209	44,899	,000
B	1,902	3	,634	1,282	,288
A * B	5,131	9	,570	1,153	,340
Erreur	31,656	64	,495		
Total	722,142	80			
Total corrigé	105,315	79			

*R* deux = ,699 (*R* deux ajusté = ,629)

**Tableau 12: Teneur en chlorophylle totale**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	831,458	3	277,153	46,255	,000
B	51,154	3	17,051	2,846	,044
A * B	81,475	9	9,053	1,511	,163
Erreur	383,476	64	5,992		
Total	8672,441	80			
Total corrigé	1347,563	79			

*R* deux = ,715 (*R* deux ajusté = ,649)

**Tableau 13: Teneur en caroténoïdes**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	19,879	3	6,626	36,628	,000
B	1,242	3	,414	2,289	,087
A * B	1,725	9	,192	1,059	,405
Erreur	11,578	64	,181		
Total	285,658	80			
Total corrigé	34,424	79			

*R* deux = ,664 (*R* deux ajusté = ,585)

**Tableau 14 : Teneur en sucres solubles**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	25423,490	3	8474,497	3,646	,023
B	10073,898	3	3357,966	1,445	,248
A * B	3662,069	9	406,897	,175	,995
Erreur	74371,545	32	2324,111		
Total	1856065,034	48			
Total corrigé	113531,002	47			

*R* deux = ,345 (*R* deux ajusté = ,038)

**Tableau 15 : Teneur en protéines**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	117,311	3	39,104	7,140	,000
B	46,438	3	15,479	2,826	,046
A * B	15,089	9	1,677	,306	,970
Erreur	350,519	64	5,477		
Total	2217,377	80			
Total corrigé	529,358	79			

*R* deux = ,338 (*R* deux ajusté = ,183)

**Tableau 16 : Teneur en proline**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	5,715	3	1,905	46,260	,000
B	,992	3	,331	8,029	,000
A * B	1,002	9	,111	2,704	,010
Erreur	2,636	64	4,118E-02		
Total	31,276	80			
Total corrigé	10,345	79			

*R* deux = ,745 (*R* deux ajusté = ,686)

**Tableau 17 : Teneur en MDA**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	178,300	3	59,433	33,994	,000
B	29,331	3	9,777	5,592	,003
A * B	35,812	9	3,979	2,276	,042
Erreur	55,946	32	1,748		
Total	1354,358	48			
Total corrigé	299,389	47			

*R* deux = ,813 (*R* deux ajusté = ,726)

**Tableau 18 : Teneur relative en eau TRE**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	313,605	3	104,535	1,996	,134
B	121,674	3	40,558	,775	,517
A * B	282,540	9	31,393	,600	,788
Erreur	1675,648	32	52,364		
Total	161794,590	48			
Total corrigé	2393,467	47			

*R* deux = ,300 (*R* deux ajusté = -,028)

**Tableau 19 : Potentiel hydrique**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	22,487	3	7,496	778,618	,000
B	,138	3	4,603E-02	4,782	,005
A * B	,554	9	6,155E-02	6,394	,000
Erreur	,616	64	9,627E-03		
Total	79,791	80			
Total corrigé	23,795	79			

*R* deux = ,974 (*R* deux ajusté = ,968)

**Tableau 20 : Activité nitrate réductase**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	15422,438	3	5140,813	13,827	,000
B	8356,028	3	2785,343	7,492	,000
A * B	3047,446	9	338,605	,911	,522
Erreur	23794,474	64	371,789		
Total	134834,629	80			
Total corrigé	50620,387	79			

*R* deux = ,530 (*R* deux ajusté = ,420)

**Tableau 21 : Teneur en Na feuilles**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	140,698	3	46,899	87,199	,000
B	5,557	3	1,852	3,444	,028
A * B	15,401	9	1,711	3,182	,007
Erreur	17,211	32	,538		
Total	467,282	48			
Total corrigé	178,868	47			

*R deux = ,904 (R deux ajusté = ,859)*

**Tableau 22 : Teneur en Na Racines**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	41,015	3	13,672	113,166	,000
B	2,157	3	,719	5,951	,002
A * B	2,946	9	,327	2,709	,018
Erreur	3,866	32	,121		
Total	144,765	48			
Total corrigé	49,983	47			

*R deux = ,923 (R deux ajusté = ,886)*

**Tableau 23 : Teneur en K racines**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	2,221	3	,740	36,186	,000
B	,468	3	,156	7,634	,001
A * B	,619	9	6,881E-02	3,364	,005
Erreur	,655	32	2,045E-02		
Total	6,621	48			
Total corrigé	3,963	47			

*R deux = ,835 (R deux ajusté = ,757)*

**Tableau 24 : Teneur en K feuilles**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	3,504	3	1,168	30,914	,000
B	,760	3	,253	6,704	,001
A * B	1,188	9	,132	3,494	,004
Erreur	1,209	32	3,778E-02		
Total	10,922	48			
Total corrigé	6,661	47			

*R deux = ,818 (R deux ajusté = ,733)*

**Tableau 25 : Nombre de nodules**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	117473,050	3	39157,683	113,659	,000
B	16874,250	3	5624,750	16,326	,000
A * B	20669,450	9	2296,606	6,666	,000
Erreur	22049,200	64	344,519		
Total	865642,000	80			
Total corrigé	177065,950	79			

*R deux = ,875 (R deux ajusté = ,846)*

**Tableau 26 : Poids sec des nodules**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	15,131	3	5,044	99,206	,000
B	,406	3	,135	2,663	,055
A * B	,980	9	,109	2,141	,038
Erreur	3,254	64	5,084E-02		
Total	41,029	80			
Total corrigé	19,770	79			

*R deux = ,835 (R deux ajusté = ,797)*

**Tableau 27 : Activité réductrice d'acétylène (ARA)**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	12082,758	3	4027,586	477,332	,000
B	3071,027	3	1023,676	121,322	,000
A * B	1363,863	9	151,540	17,960	,000
Erreur	540,013	64	8,438		
Total	49739,656	80			
Total corrigé	17057,661	79			

*R deux = ,968 (R deux ajusté = ,961)*

**Tableau 28 : ARA nodulaire**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	,932	3	,311	73,981	,000
B	,781	3	,260	62,051	,000
A * B	,170	9	1,892E-02	4,509	,000
Erreur	,269	64	4,198E-03		
Total	6,171	80			
Total corrigé	2,152	79			

*R deux = ,875 (R deux ajusté = ,846)*

**Tableau 29 : Teneur en leghémoglobine**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	1,820E-02	3	6,066E-03	196,474	,000
B	5,764E-03	3	1,921E-03	62,232	,000
A * B	2,085E-03	9	2,316E-04	7,502	,000
Erreur	9,880E-04	32	3,087E-05		
Total	9,772E-02	48			
Total corrigé	2,704E-02	47			

*R deux = ,963 (R deux ajusté = ,946)*

**Tableau 30 : Nombre moyen de graines**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	43,266	3	14,422	24,158	,000
B	7,227	3	2,409	4,035	,011
A * B	12,836	9	1,426	2,389	,021
Erreur	38,207	64	,597		
Total	579,191	80			
Total corrigé	101,536	79			

*R deux = ,624 (R deux ajusté = ,536)*

**Tableau 31 : Nombre de gousses par plant**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	6802,938	3	2267,646	184,737	,000
B	243,938	3	81,313	6,624	,001
A * B	259,912	9	28,879	2,353	,023
Erreur	785,600	64	12,275		
Total	18285,000	80			
Total corrigé	8092,388	79			

*R deux = ,903 (R deux ajusté = ,880)*

**Tableau 32 : Poids de 100 grains**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
A	18168,378	3	6056,126	83,471	,000
B	3980,238	3	1326,746	18,287	,000
A * B	3484,110	9	387,123	5,336	,000
Erreur	4643,411	64	72,553		
Total	147050,484	80			
Total corrigé	30276,138	79			

*R deux = ,847 (R deux ajusté = ,811)*