

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE EL-HARRACH ALGER

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magistère en sciences agronomiques

Option : Amélioration de la résistance des plantes aux maladies

*Réponse physiologique de la fève (*Vicia faba minor*L.) au stress thermique*

Présenté par :

Melle NOUAR Samia

Directeur : Mr Ounane SM Maître de conférence (INA)

28/02/2007

Jury : Président : Mr Bouznad Z Professeur (INA) Examineurs:Mr Aidaoui A Professeur (INA) Mr Bellal MM Professeur (INA)

Table des matières

Remerciements . .	1
Résumé .	3
Abstract . .	5
ص خ لم . .	7
Introduction . .	9
Synthèse bibliographique .	15
I-La fixation biologique de l'azote atmosphérique: .	15
1-1- Le macrosymbiote: .	15
1-2-Le microsymbiote: .	16
1-3-La symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineus .	18
1-4-Le Processus d'infection: . .	20
1-5-Effet de la température sur l'infection et la nodulation: .	22
1-6-Effet de la température sur la fixation biologique de l'azote atmosphérique: .	24
1-7- Effet de la température sur le <i>Rhizobium</i> à l'état libre: .	24
II-L'assimilation de l'azote minéral du sol: . .	26
2-1- La nitrate réductase: .	27
2-2-La nitrite réductase: .	27
2-3- Effet de la température sur l'assimilation de l'azote du sol: .	28
III- Participation des deux activités à la nutrition azotée: . .	29
VI-La proline : .	30
4-1-Généralités : . .	30
4-2-Effet de la température sur l'accumulation de la proline : .	31
II-MATERIEL ET METHODES: .	33
II-1-Conditions de l'essai: . .	33
II-2- Dispositif expérimental: .	33

II-3-Description du dispositif de mesure de L'ARA: . .	35
II-4-Description du dispositif de mesure de L'ANR: . .	37
II-5- Description du dispositif du dosage des nitrates: . .	39
II-5-1-Préparation de l'échantillon: . .	39
II-5-2-Principe de la méthode de dosage: . .	39
II-6- Dosage de la proline: . .	40
II-7-La croissance bactérienne: . .	40
Résultats et discussions . .	45
1-Effet de la température sur l'assimilation des nitrates: . .	45
2-Effet de la température sur la teneur en nitrates des feuilles: . .	48
3-Evolution de l'assimilation et de la teneur en nitrates des feuilles: . .	49
4-Effet de la température sur l'activité réductrice d'acétylène (ARA): . .	51
5-Evolution de l'activité réductrice de l'acétylène et de l'activité nitrate réductase: . .	54
7-Evolution du nombre de nodules et de l'ARA: . .	56
8-Effet de la température sur la teneur en proline des feuilles: . .	58
9- Effet de la température sur la croissance bactérienne: . .	60
Conclusion: . .	65
Références bibliographiques . .	67
Annexes . .	79
Liste des abréviations . .	79
ANNEXE A : PROTOCOLE DE DOSAGE DE LA PROLINE: . .	80
ANALYSE DE LA VARIANCE: . .	82

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier vivement Monsieur Ounane Maître de conférence à l'Institut National Agronomique d'El-harrach, pour ses orientations, ses conseils précieux, ses critiques et sa compréhension qui m'ont toujours aidés à progresser.

Je tiens à exprimer mes remerciements et mon profond respect à Monsieur Bouznad professeur à l'Institut National Agronomique d'El-harrach, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury.

Mes vifs remerciements et mon profond respect et gratitude vont au professeur Bellal Directeur général de l'Institut National Agronomique d'El-harrach, pour avoir accepté de juger ce travail.

Tous mes remerciements et ma reconnaissance vont à Monsieur Aidaoui professeur à l'Institut National Agronomique d'El-harrach, pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens également à remercier Mr Mokabli Maître de conférence à l'Institut National Agronomique d'El-harrach, pour son aide et sa sympathie.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur Sellam Chargé de cours à l'Institut National Agronomique d'El-harrach, pour son aide dans la réalisation de l'analyse statistique.

Je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Résumé

Ce modeste travail nous a permis d'étudier l'effet du stress thermique sur la réponse physiologique de la féverole variété *GIZA 402* pendant ces trois stades phénologiques.

L'activité réductrice d'acétylène s'est montrée très sensible aux amplitudes thermiques suite au mauvais fonctionnement de la nitrogénase avec un pic de forte activité à 20 et 25°C.

A basses températures l'ANR est importante; alors qu'à températures croissantes elle diminue progressivement suite à la dénaturation de l'enzyme.

La croissance de notre souche estimée par la lecture de sa densité optique à 620 nm s'est révélée relativement sensible à l'abaissement (18°C) et à l'élévation de la température d'incubation (37°C).

L'effet du stress thermique sur l'accumulation de la proline, indicateur de stress et osmo-protéctant se traduit par une augmentation de sa concentration au niveau des feuilles à 2 et à 5°C au stade végétatif et floraison.

Mots clés : Stress thermique/ féverole /*Rhizobium leguminosarum* bv *vicia*/ Fixation de l'azote/ assimilation de l'azote/ enzymes/ proline/ densité optique.

Abstract

The present work permitted to study responses of biological nitrogen fixation, mineral nitrogen assimilation and other parameters to temperature stress on bean) *Vicia faba minor* L (. inoculated with *Rhizobium* which exist in soil. So, we studied the effect of the different temperature during 24h, applied to three states of the plant development.

Under the effect of temperature, we noted the increasing of nitrate reductase activity between 2 and 25°C, then decreasing at 30 and 35°C.

Nitrogen fixation is not important at low and high temperatures but present her optimum between 15 and 25°C for the three states of plant.

Proline is indicator of stress; present the optimum at 2°C in vegetativestate and at 5°C in flowering state.

The development of our strain is estimed with the optic density at 620 nm. She developed easily at 28°C but with most difficulty at 18 and 37°C .

Key words: Bean/ *Rhizobium leguminosarum* bv *vicia*/ Temperature stress/ Nitrogen fixation/ Nitrogen assimilation/ proline / optic density.

ص خ لم

التمتع بالصيف في هذه الجزيرة تتنوع إلى غير درجة الحرارة على فئات العربية حيث أن 05- وارتفاعها يقع على ثلاث مراحل من عدم.
السماح على مدار الساعة على كافة الأوقات لم يعد له أهمية فاعلمنا أما قممتنا التي من السهولة على من لا يرى إلى
أو لا يجد صعوبة من بعض رتبته فتربطه افتتحة.

أما في الأجزاء الثلاثة في كثير من الأحيان من 2- إلى 5- من جودنا أو أعلى من الجوانب التي لا يمكن أن نلاحظها في كثير من الأحيان
إن الأجزاء الخمسة من شعبة 19- وبمساحة من 16- و37- درجة مئوية.

كلمات المفاتيح:

تمت بحمد الله الملك والمقررا عنها ، فثبت الأثر في اليوم ، التمسك بالأثر في الفرجان ، أكثر من أن يكون ، التمسك بالسريرة

Introduction

Les légumineuses constituent après les céréales la seconde source protéique pour l'alimentation humaine et animale. Parmi ces légumineuses cultivées, la féverole, qui n'a bénéficié d'aucune attention particulière durant les vingt dernières années n'occupe que de petites surfaces (5000 ha) et son rendement n'a pas cessé de diminuer ; il est estimé à 6.8 qx/ha (les statistiques agricoles ne séparent pas les fèves des féveroles) (ITGC, 2003). Il est très faible comparé à ceux enregistrés chez les principaux pays du bassin méditerranéen producteurs de féverole comme l'Egypte, l'Italie, le Maroc, l'Espagne et la France où les rendements peuvent atteindre 38qx/ha. La production mondiale est proche de 5 millions de tonnes dont la Chine est le principal pays producteur (Beulin, 2006) (figure n°1).

L'Algérie souffre d'un déficit très important en protéines animales et sa ration alimentaire est apportée essentiellement par les céréales et en partie par les légumineuses. La féverole constitue un aliment de valeur riche en protéines avec une teneur importante en lysine pouvant compléter les céréales (figure n° 2).

La culture de la féverole améliore la structure du sol grâce à son système racinaire puissant et dense. Elle constitue une bonne tête d'assolement et peut s'intégrer dans une rotation pour la résorption de la jachère dans le système céréalier traditionnel.

Malgré son intérêt agronomique, les superficies consacrées à cette culture ne cessent de régresser depuis 1987. Ceci est dû à plusieurs contraintes telles que le déficit hydrique, la salinité, les adventices, les maladies fongiques (botrytis, rouille, anthracnose), les nématodes, les insectes (bruches) et les pucerons. La féverole est cultivée en mode

traditionnel avec l'utilisation presque exclusive de semences non certifiées et l'absence de mécanisation pour les opérations importantes comme le semis et la récolte (Maatougui et *al.*, 1996).

La température est parmi les contraintes abiotiques, celle qui affectent le plus la culture de la féverole qui craint le froid et ne peut être cultivée sans risques là où la température minimale peut descendre à -4°C (hautes plaines) (Bouthier et *al.*, 2004). Le froid hivernal, les gelées printanières et les vents chauds et secs (siroco) sont la principale limitation dans les hauts plateaux et les plaines intérieures (Tableau n°1). Ces conditions affectent la production de gousses et expliquent les faibles rendements dus à la coulure des fleurs (Maatougui, 1996 ; Mouhouche, 1996).

Le stress thermique affecte tous les métabolismes de la plante notamment la nutrition azotée qui réagit fortement à cette contrainte. La réponse de la plante se traduit par une baisse des activités enzymatiques qui se répercutent sur la production de la biomasse et des rendements. En effet, le stress thermique peut affecter l'activité de la nitrogénase responsable de la fixation de l'azote et l'activité nitrate réductase qui contrôle la première étape de l'assimilation de l'azote combiné du sol. Les fluctuations de ces activités peuvent être attribuées généralement soit à des variations de réaction pour une quantité d'enzyme active donnée, soit à des variations de la quantité d'enzyme active présente, qui elle-même dépend des vitesses de synthèse de novo (Mazliak, 1981).

La féverole, comme toutes les légumineuses assure sa nutrition azotée par deux voies: l'assimilation de l'azote minéral du sol ou / et la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique. Cette aptitude à fixer l'azote atmosphérique, limite l'utilisation coûteuse des engrais azotés qui sont néfastes pour la santé humaine et l'environnement. Dans cette optique, nous nous sommes

intéressés à l'étude des réponses physiologiques de la féverole cultivée sous contrainte thermique.

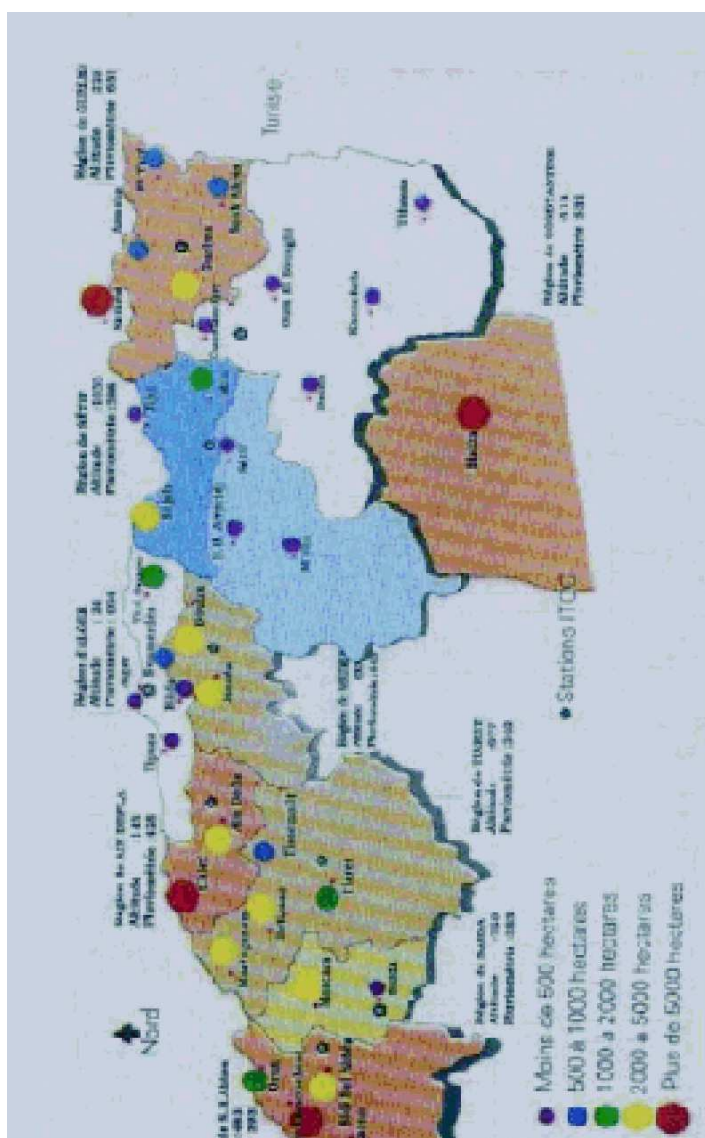


Figure 1. Répartition de la fève et la féverole en Algérie

Source : Revue céréaliculture 1996

Réponse physiologique de la fève (Vicia faba minorL.) au stress thermique

Zones/wilayas	Pluies annuelles (Moy. annuelle)	Température Méd (C°)	Moyennes Méd (C°)	Période (années)	Altitude (m)
Plaine côtière					
Oran	370	12.0	23.3	1961-90	80
Alger (souchant)	473	13.0	22.6	1937-90	130
Mostaganem	276	11.5	22.8	1976-90	104
Tipaza	639	15.5	21.6	1960-84	90
Boumerdes	574	14.5	23.1	1970-90	62
Biskra	733	13.8	23.5	1940-63	240
Béjaïa	496	13.0	22.1	1969-90	160
Jijel	1150	15.1	22.1	1980-91	147
Sétif	729	13.0	21.9	1961-90	142
Arenche	613	12.3	22.8	1961-90	47
Tarif	690	14.9	21.9	1960-90	145
Moyenne	613	13.5	22.6		140
Hautes plaines					
Tlemcen	371	11.7	24.0	1941-90	806
Sidi-bel-abbès	293	9.6	23.9	1931-60	470
Mascara	511	9.3	23.9	1930-83	600
Relizane	293	12.0	25.6	1933-68	44
Chlef	429	12.2	25.6	1939-90	140
Am. d'Alger	522	12.2	25.7	1933-89	300
Tizi-ouza	891	11.6	24.6	1961-90	430
Mila	569	9.3	21.3	1931-90	500
Constantine	513	9.3	21.3	1961-90	634
Québla	652	12.1	23.6	1970-84	270
Souk-ahraz	633	9.0	23.4	1960-84	637
Moyenne	533	10.5	23.9		443
Hautes plateaux					
Saida	383	10.8	23.8	1934-83	840
Tisret	533	8.5	20.4	1963-90	1023
Tissemsilt	422	7.3	21.3	1930-83	889
Médéa	810	9.4	18.6	1931-90	930
Bouira	393	9.9	23.5	1967-83	325
Séif	398	9.0	20.1	1981-90	1081
Boudj-bou-ameridi	390	9.0	20.1	1973-90	916
Dum-el-bouaghi	360	10.3	23.5		917
Moyenne	461	9.3	21.5		889
Sahara					
Biskra	106	6.4	40.1		124

Tableau 1: Caractéristiques climatiques (pluies, températures, altitude) des wilayas productrices des fèves et féveroles dans leur zone agro climatique respective.

(Revue céréaliculture, 1996).

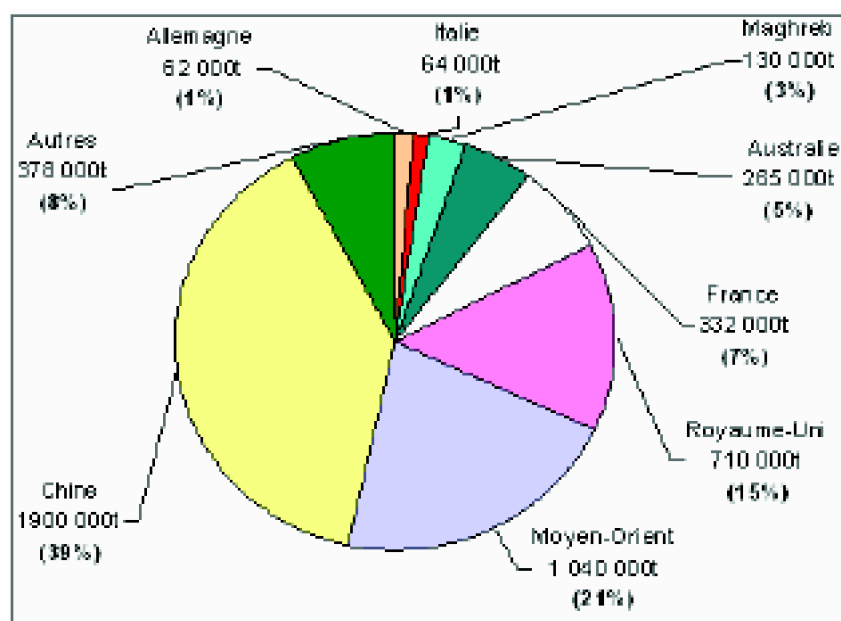


Figure n° 1 : Production moyenne mondiale de fèves (Moyenne 2003/2004)

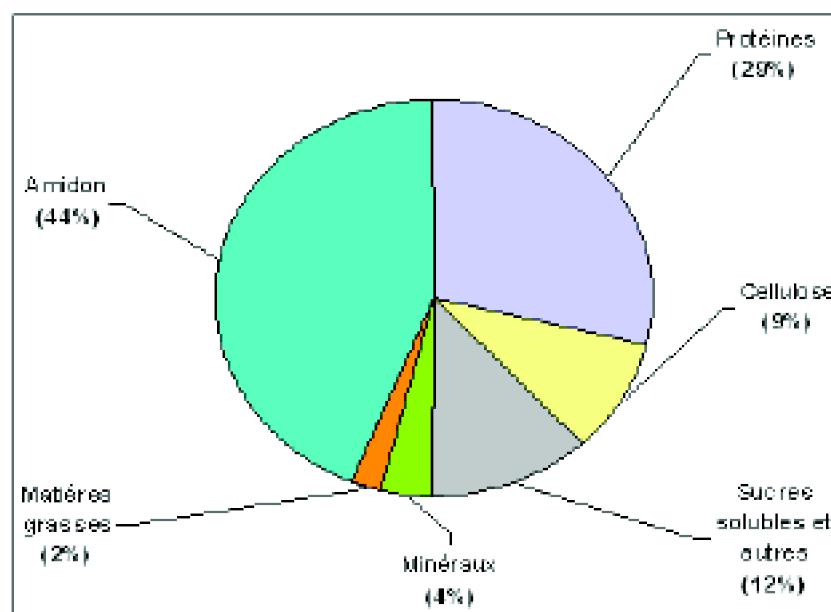


Figure n° 2 : Composition de la graine de fève

Source : (Beulin, 2006)

Synthèse bibliographique

I-La fixation biologique de l'azote atmosphérique:

1-1- Le macrosymbiote:

La fèveverole (*Vicia faba L. minor*) est une légumineuse annuelle appartenant à la grande famille des fabacées et à la sous famille des papilionacées. Elle est originaire du Sud-Ouest de l'Asie. C'est une plante de taille moyenne à grande (60 à 140 cm), avec des feuilles glabres composées de deux ou trois paires de folioles opposées de forme ovale. Les fleurs sont de couleur blanche ou violacée, disposées par grappe de deux à neuf fleurs à l'aisselle des feuilles. La pollinisation est allogame et entomophile. Le taux de nouaison est très faible. Le fruit est une gousse verte en végétation, noirâtre à maturité; les racines sont pivotantes et abondantes, avec une profondeur qui peut atteindre 70 cm (Bouthier et *al.*, 2004).

La fèveverole se distingue de la fève par sa tige plus ramifiée (tallage important) à la base, par son feuillage légèrement plus sombre et ses gousses ainsi que ses graines plus petites. Les inflorescences apparaissent en grappes. Il existe un grand chevauchement entre la floraison et le début de remplissage des grains. De ce fait, on peut trouver des

gousses en cours de remplissage à plusieurs niveaux de la plante de bas en haut (Carrouée, 2005).

1-2-Le microsymbiote:

Les *Rhizobia* appartiennent à l'ordre des eubactériales et à la famille des rhizobiacées; elles vivent à l'état libre dans le sol, très mobile par leur ciliature polaire ou péritriche, sous forme de bâtonnets Gram négatives et strictement aérobies. Ils forment des colonies circulaires, lisses à bord régulier et à élévation convexe. Elles présentent une mucosité importante résultant de la production des exopolysaccharides

Les *Rhizobia* ne présentent aucune caractéristique morphologique ou autre, permettant de les distinguer des autres bactéries telluriques. Leur classification autrefois basée uniquement sur leur aptitude à infecter leur plante hôte (groupes d'inoculation croisée), est actuellement affinée grâce à l'outil moléculaire qui a permis l'émergence de nouveaux genres et espèces (Zahran, 2001 ; Zakhia et De Lajudie, 2001) (Tableau n° 2).

l'assimiler.

-Elles sont productrices de sidérophores, des structures gélatineuses riches en fer et facilement assimilables par la plante.

-Elles sont capables de dégrader plusieurs polluants de l'environnement (TNT...etc).

1-3-La symbiose *Rhizobium*-légumineuse

La fixation de l'azote atmosphérique constitue la deuxième source d'azote pour les légumineuses. C'est un phénomène qui est fondamentalement comparable à celui de la photosynthèse puisqu'il conduit à une synthèse de composés organiques à partir de substances organiques présentes dans l'atmosphère (Blondeau, 1980). L'assimilation photosynthétique du CO₂ nécessite l'élaboration de molécules azotées, enzymes ...etc, constitutifs des membranes chloroplastiques, nécessaires à la capture de l'énergie et au transfert d'électrons. Ainsi, le métabolisme du carbone et de l'azote sont interdépendants et toute modification favorable ou défavorable à l'assimilation du carbone se répercute sur le métabolisme azoté (Delhon et al., 1995). Selon Vincent (1970), Saadallah et al (2002), la fixation symbiotique de l'azote est un processus coûteux en énergie contrôlé par une enzyme très sensible à l'oxygène: la nitrogénase

C'est une enzyme responsable de la réduction de l'azote moléculaire en ammoniac.



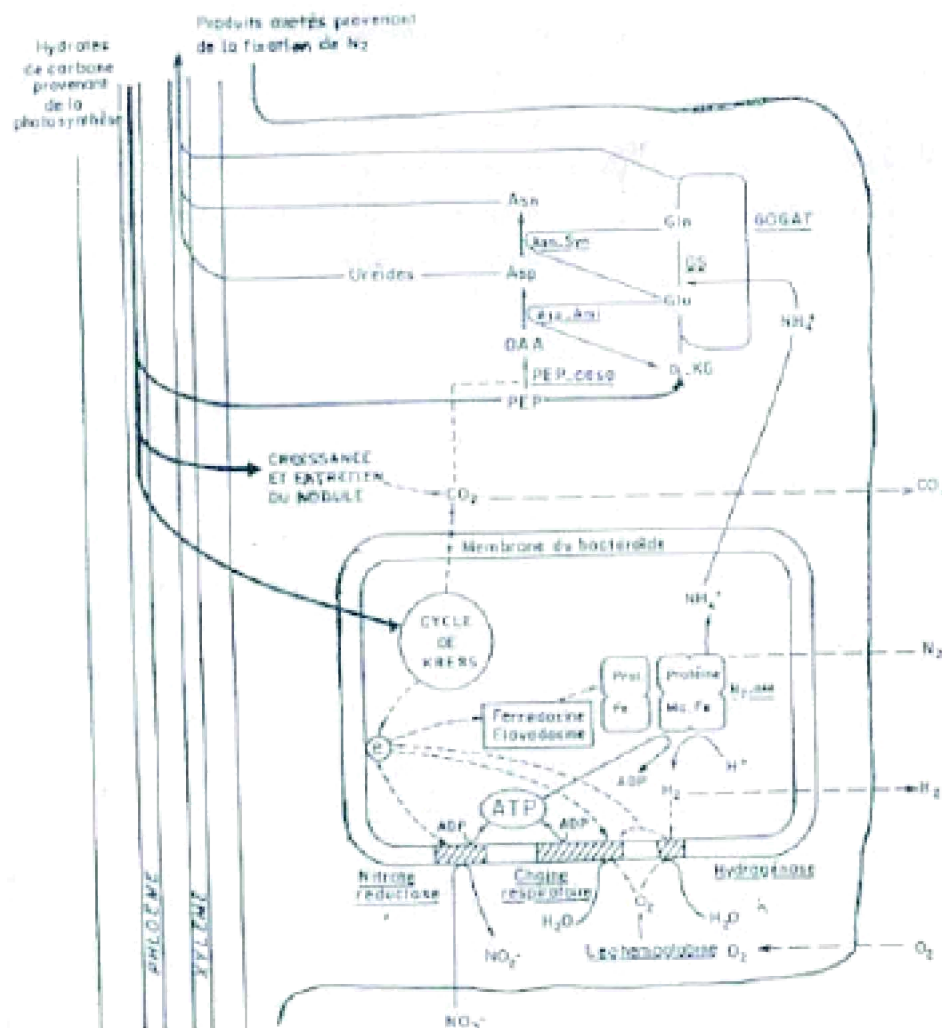


Figure 3. Schéma représentant le fonctionnement d'une nodosité

(Pelmont, 1995)

C'est un complexe enzymatique constitué de deux protéines 1 et 2.

La protéine 1 contient du molybdène et du fer. Elle est appelée molybdoferrédoxine. Elle est formée de 4 composants identiques; son rôle est de réduire l'azote en ammoniac.

La protéine 2 ou molybdoprotéine, contient du fer et du soufre. Elle est formée de deux composants. Elle a pour fonction de transférer à la protéine 1 les électrons nécessaires à son fonctionnement.

C'est la production inévitable d'hydrogène qui alourdit le bilan énergétique de la réduction biologique de l'azote moléculaire. En général, la formation d'une molécule d'hydrogène par la nitrogénase nécessite l'équivalent de 8 ATP et l'oxydation de l'hydrogène par la bactérie qui fournirait seulement 2 ATP. *Bradyrhizobium* possède une hydrogénase membranaire Hup⁺ permettant d'oxyder l'hydrogène formé par la nitrogénase en fournissant de l'ATP (Dénarié et Joly, 1994).

Une partie importante (30%) du flux d'électrons transféré à la nitrogénase sert à réduire les protons en H₂; cette production de H₂ (perte d'énergie) est liée au mécanisme

de fonctionnement de la nitrogénase qui est inévitable dans le système fixateur (Dénarié et al., 1992).

Dommergues et Mangenot (1970) affirment que cette hydrogénase pourrait jouer trois rôles bénéfiques pour la fixation d'azote :

- Recycler une partie de l'énergie dépensée par la synthèse de l'hydrogène par la nitrogénase.
- Consommer l'oxygène qui au-delà de faible concentration inactive la nitrogénase.
- Eliminer l'hydrogène inhibiteur compétitif de la réduction de l'azote.

Il y a toujours au moins une molécule d'hydrogène formée par une molécule d'azote réduite. Mais dans la symbiose ce rapport est généralement plus élevé (Dénarié et Truchet, 1979 ; Gladiem et al., 1985).

1-4-Le Processus d'infection:

Au niveau de la relation *Rhizobium*-légumineuses, il existe un haut niveau de spécificité d'hôte. Cette spécificité est basée sur une reconnaissance qui se fait grâce à un dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques. Ce sont les gènes nod bactériens localisés sur le plasmide qui contrôlent la spécificité d'hôte, l'infection et la nodulation (Cook et al., 1997 ; Zahran, 2001).

Il existe trois types de gènes:

1-Les gènes *nod ABC de structure* : ils sont communs à toutes les souches de *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium...etc* ; et interchangeables, nécessaires pour induire le « curling » et la division cellulaire. Leur mutation empêche le *Rhizobium* d'induire l'infection et la nodulation (Truchet et al., 1993 ; Begun et al., 2005).

2-Les gènes *nod spécifiques hsn (host-specific nod genes)* : ils sont responsables de la spécificité d'hôte et de la reconnaissance entre la bactérie et la plante. Ils ne sont pas interchangeables et une mutation au niveau de ces gènes a pour effet de provoquer un changement de spécificité de la souche à l'égard de la plante cible (Freiberg et al., 1997 ; Patriarca, 2002).

3-Les gènes *nod D* : Ces des gène régulateurs; ils assurent le fonctionnement et l'expression des gènes nod communs et spécifiques en présence des flavonoides (Freiberg et al., 1997 ; Perret, 1997).

Selon Prevost (2003), l'induction et l'expression des gènes nod chez *Rhizobium leguminosarum* sont significativement affectées par les basses températures (10°C et 15°C).

Le développement des nodules par infection des poils absorbants caractérise les légumineuses tempérées (croissance indéterminé) cas de la luzerne, alors que par exemple, chez l'arachide, la pénétration des bactéries se fait par les blessures (Fisher et Long, 1992).

Il existe une réelle communication chimique entre la plante et la bactérie du sol. Cet

échange démarre dès que pointent les premières racines qui envoient un message chimique par la sécrétion de flavonoides afin d'attirer les bactéries fixatrices d'azote vers les racines (Begun et al., 2005). Ces substances activent leur multiplication au voisinage des racines. Elles sont alors adsorbées par le poil absorbant (Swensen et Murray, 1983 ; Beck et al., 1991). Il a été démontré que les températures de 35°C et 40°C affectent la mobilité des *Rhizobia* (Zahran, 1999).

En réponse à des signaux végétaux "les flavonoides", produits phénoliques, les *Rhizobia* excrètent des molécules lipochitoooligosaccharides (LCO) (Haghuwanishi, 1994). Comme ces flavonoides sont actives à des concentrations faibles (10^{-12} mM), ceci suggère qu'elles sont perçues par des récepteurs spécifiques à haute affinité (Geuts et Franssen, 1996 ; Freiberg et al., 1997). Elles activent les gènes nod bactériens dont les produits vont faciliter le mécanisme d'infection. Par exemple, la naringénine est une flavone de *Rhizobium leguminosarum* (Boote et al., 2002).

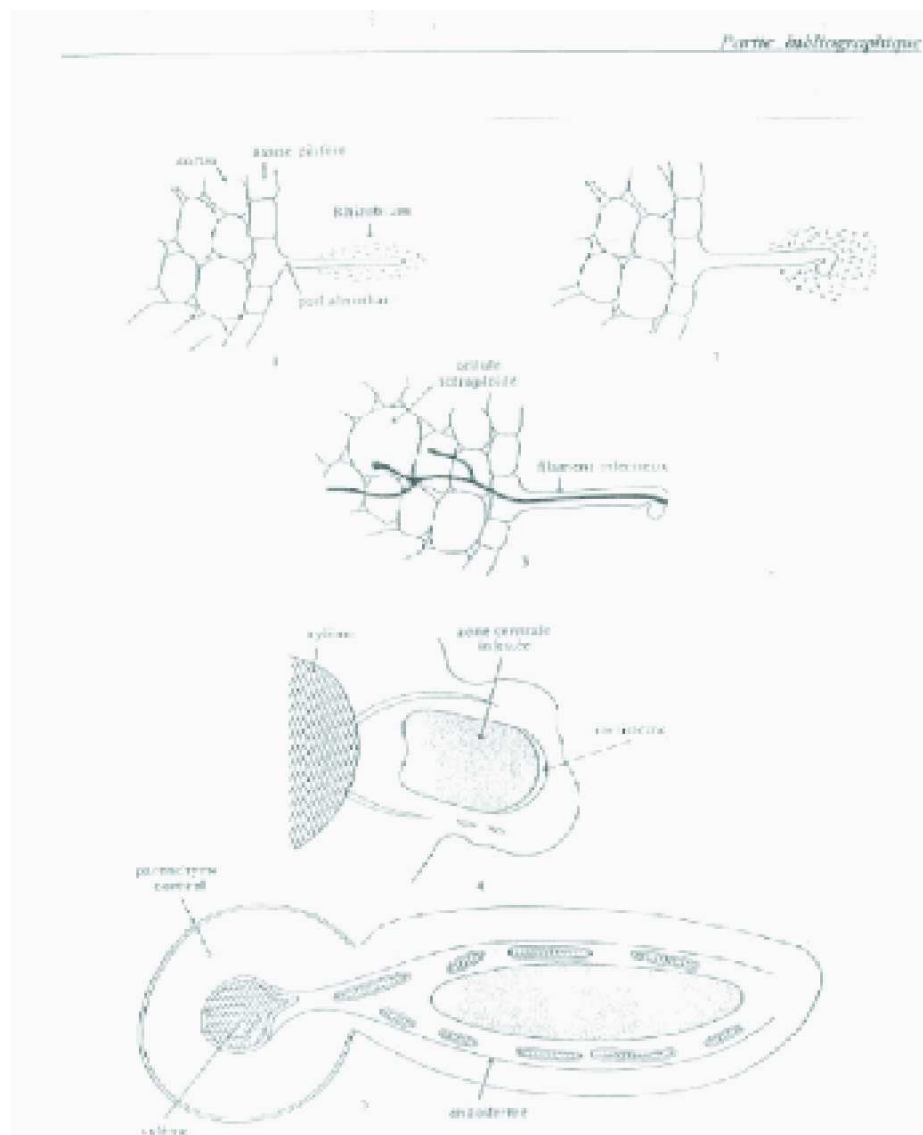


Figure 4. Schéma représentant la genèse d'un nodule de pois

(Pelmont, 1995)

Sanchez et Helper (2000) , Browse et Xin (2001), affirment qu'après la reconnaissance, la membrane plasmique est dépolarisée avec augmentation du pH intracellulaire ainsi que le taux de calcium chez *Medicago sativa*

L'adhésion des bactéries sur les poils absorbants se fait grâce aux glycoprotéines (léctines) secrétées par les racines des légumineuses et les polysaccharides de la paroi bactérienne qui jouerait le rôle de récepteurs (Kijine et al., 1997). Les poils absorbants infectés se courbent et forment une "crosse de berger" à l'intérieur de laquelle les bactéries se multiplient (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Duhoux et Nicole, 2004). C'est également à cet endroit que la paroi du poil absorbant est lysée puis s'invagine pour former le cordon d'infection (Dénarié et Truchet, 1979 ; Mylona et al., 1995 ; Prescott et al., 2004). Le cordon d'infection progresse et se déplace vers la base du poil absorbant, puis franchit les parois des cellules du cortex racinaire en direction des cellules polyploïdes. Le cordon d'infection poursuit sa progression en se ramifiant et déverse par endocytose les *Rhizobia* dans les cellules du méristème nodulaire. Les cellules de *Rhizobium* contenus dans les cordons d'infections sont ensuite libérées dans le cytoplasme de ces cellules végétales par endocytose (Newcomb et al., 1981 ; Pelmont, 1995 ; Mylona et al., 1995).

Au sein de ce symbiosome (bactéroïde entouré de la membrane pér bactéroidale). L'activité fixatrice est réalisée en présence de la nitrogénase capable de réduire l'azote moléculaire en ammoniacque et de la légghémoglobine qui colore le cortex central du nodule en rose (Denarié et Joly, 1994 ; Turner et Young, 2000).

après Trinchant et Pladys (1985), Saadallah (2002), la concentration intra nodulaire d'oxygène dépend de trois mécanismes :

- Une zone corticale interne limitant la diffusion de l'oxygène vers la zone centrale infectée de la nodosité.
- La respiration intense des bactéroïdes, empêchent l'accumulation de l'oxygène et diminue son taux intra-nodulaire.
- La leghémoglobine facilite la diffusion d'oxygène vers les chaînes respiratoires dans les cellules infectées. Selon Balandreau et Dommergues (1971) , Trinchant et Pladys (1985), la légghémoglobine ne fait que libérer l'oxygène nécessaire à la respiration des bactéries à basses pressions afin de préserver la nitrogénase.

Quand la plante fleurit et cesse de croître, la légghémoglobine s'altère, devient verdâtre et se dégrade. Le nodule dégénère et ne fixe plus l'azote (Salon et al., 2001).

En fait, la plante possède à elle seule tout le programme génétique nécessaire au développement du nodule (Meyer et al., 1993).

1-5-Effet de la température sur l'infection et la nodulation:

Les températures extrêmes peuvent affecter le processus d'infection (recourbement racinaire), la formation de la légghémoglobine, le développement du nodule(Cloutier et al.,

1992), la fixation et donc le taux de matière sèche (Karanja et Wood, 1988 ;Michiels et al., 1998).

Selon Lunch et Smith (1993), les basses températures 2°C et 5°C réduisent la survivance et la multiplication de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* dans le sol. Elle affecte aussi le processus d'infection, ceci est probablement dû à la sensibilité des sites d'infection des racines (Evans et al., 1993). D'après Bordeleau et Prevost (1994), ces sites d'infection peuvent être complètement inhibés à une température supérieure à 24.2°C chez les légumineuses tempérées.

Les plantes tropicales poussent difficilement dans les régions à basses températures. En effet, chez *Vigna unguiculata*, en dessous de 17°C, le dialogue se fait très mal entre la plante et la bactérie (Truchet et al., 1993). Haghuwanshi (1994) a aussi remarqué qu'il y avait une diminution dans la concentration et le nombre de flavonoides excrétés par le pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) à basses températures. D'après Makarova et al (2003), les racines du pois (*Pisium sativum* L.) variété de *Marat* n'arrivent plus à produire les léctines et les flavonoides en présence de *Rhizobium leguminosarum* bv *viceae* à 8°C. Ceci pourrait être dû au ralentissement de la croissance des cellules du poil absorbant à cette température. Zhang et Smith (1994), Evans et Dobrowolski (1993) affirment aussi que les basses températures réduisent le nombre de poils radiculaires qui porteront le cordon d'infection au niveau de la plante entraînant ainsi un blocage dans le processus de reconnaissance mutuel.

Les faibles températures causent le prolongement de la période de préinfection chez la féverole et le trèfle (Davidson et al., 1986). En effet, chez le trèfle, l'infection est retardée de 6 jours à 7°C par rapport au témoin (Roughley, 1970); son transfert d'une température de 6°C à 15°C pendant 24h augmente le taux d'infection et la production de nodules (Obaton et al., 1996 ; Obaton et al., 2001).

L'application des flavonoides (naringenin et hesperetin) sur la surface des semences de *Pisum sativum* inoculé avec *Rhizobium leguminosarum* bv *viceae* juste avant le semis, améliore significativement l'infection à 7°C (Mario et al., 2005). Sally et al (2001) affirment que le stade le plus sensible à basses températures (7°C et 12°C) est l'initiation du nodule chez le lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Car à ces températures les flavonoides sont insuffisantes pour stimuler les gènes nod bactériens. En effet, chez *Bradyrhizobium* elles sont réduites à 12°C et absentes à 7°C (Browse et Xin, 2001).

D'après Beck et al (1991), Zhang (2002), certaines souches des régions froides peuvent produire plus de nodules avec une bonne activité de la nitrogénase à basses températures chez le soja en augmentant ainsi son rendement.

Le trèfle inoculé avec les souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifoli* isolées de la Scandinavie, montre une nodulation précoce à 10°C par rapport aux souches isolées des régions du Sud cependant, il n'y a pas eu de différence pour la nodulation à 20°C (Bordeleau et Prevost, 1994).

Arayangkoon et al (1990) et Zahran (1999), affirment qu'à 29°C la formation des nodules est réduite voir inhibée chez le pois chiche; elle est optimale entre 23°C et 25 °C.

1-6-Effet de la température sur la fixation biologique de l'azote atmosphérique:

L'effet de la température sur le système symbiotique est très complexe. Il varie considérablement avec l'espèce végétale, la souche de *Rhizobium* ainsi que leur interaction (Kuzma et Layzell, 1994 ; Martensson et Rydberg, 1996).

La fixation d'azote est plus inhibée par les températures extrêmes, que ne le sont d'autres fonctions physiologiques majeures comme la respiration et la photosynthèse (Zhang et Smith, 1994 ; Sultan et al., 2001). Toutefois, le transfert des plants des températures optimales vers les suboptimales à différents stades phénologiques a contribué à la compréhension des effets de la température sur le fonctionnement de la symbiose.

Les légumineuses des régions tempérées nodulent et fixent l'azote à des températures comprises entre 10°C et 30°C et les légumineuses tropicales entre 15°C et 35°C jusqu'à 40°C. En effet, L'activité de la nitrogénase de 5 souches de *Rhizobium* isolées de l'arctique était grande à basses températures

par rapport à celles isolées des régions tempérées quand elles étaient en symbiose avec le sainfoin (Vlassak et Vanderleyden, 1997).

Chez les médicago annuelles, la fixation d'azote est faible durant les périodes froides (Obaton et al., 2001). Chez le trèfle souterrain, presque aucune activité fixatrice d'azote au niveau du nodule n'est observée à 3°C. Elle est décelée entre 11°C et 15°C avec un optimum à 19°C (Bordeleau et Prevost, 1994).

Poustini et al (2005) affirment que chez *Phaseolus vulgaris* le nombre des nodules, le poids des nodules, la fixation d'azote et la croissance de plants sont faibles à 17°C par rapport à 25°C. De même la fixation d'azote est retardée de 7 jours à 17°C.

L'efficacité des souches dans la fixation d'azote diffère chez une même espèce bactérienne. Chez *Rhizobium trifoli* la souche TA1 est efficace pour toutes les températures testées, alors qu'avec la souche CC17, la fixation est importante à 22°C et l'est moins à des températures élevées (Lipsman et Lindstrom, 1986).

Chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*.L), des altérations irréversibles et des suppressions génomique au niveau du plasmide (psym) se sont produites suite à une température de 45°C durant 3h (problèmes des pays tropicaux) (Zhang et al., 1991 ; Dart et Mercer, 2002).

Enfin, la dégénérescence du tissu du bactéroïde est rapide à des températures élevées et peut raccourcir la période de son activité (Pelmont, 1995 ; Leena, 2002).

1-7- Effet de la température sur le *Rhizobium* à l'état libre:

La recherche d'une corrélation entre les origines environnementales, la croissance des souches de *Rhizobium* avec leur performance symbiotique sous les températures extrêmes a fait l'objet de plusieurs études (Begun et al., 2005).

La limite extrême des températures pour la symbiose dépend de la plante hôte, mais aussi de la souche de *Rhizobium* utilisée; ces dernières deviennent performantes lorsqu'elles sont mises dans un environnement similaire à celui à partir duquel elles ont été prélevées (Zahran, 1999).

Pour la plupart des *Rhizobia*, l'optimum de température se situe entre 28°C et 31°C (Dart et Mercer, 2002). Les températures extrêmes du sol affectent leur croissance et leur survie et par conséquent la taille de la population rhizobienne du sol (Zahran, 2001).

La majorité des *Rhizobia* (*Vigna cowpea*) obtenue à partir d'un environnement chaud et sec de sahel savanah croissent à 40°C; mais un fort pourcentage des souches qui persistent à 45°C perdent leur infectivité (Sultan et al., 2001).

La perte de la viabilité des *Rhizobia* est observée chez l'inoculum pois chiche, lentille et fève quand ils sont exposés à des températures de 44°C (Evans et al., 1993), alors que les souches de *Bradyrhizobium japonicum* résistent à 48.7°C (Kishinevsky et al., 1992 ; Michiels et al., 1998).

Maâtallah et al (2002) affirment que les particules argileuses du sol jouent un rôle important dans la survie du *Rhizobium trifoli* et *R. melliloti* (croissance rapide) à des températures supérieures à 40°C. En effet, ces deux souches n'ont pas résistées dans les sols sableux à fortes températures, alors qu'elles ont survécu dans des sols à texture lourde. Toutefois, l'amendement d'un sol sableux avec 5% de montmorillonite, d'illite et de cendre protège ces souches des fortes températures. D'autre part, *Bradyrhizobium japonicum* (croissance lente) s'est bien développé dans les sols sableux et à forte température (jusqu'à 62°C) en Australie.

D'après Vlassak et Vanderleyden (1997) , Zahran (1999) , Aouani et al., (2001), le changement de température et de la durée d'exposition pourraient être à l'origine de la création de la variabilité des souches avec le temps.

Outre, Bohnert et al (1995) , Matersson et Rydberg (1996) ont montré que la performance chez les souches de *Rhizobium* à basses températures est influencée par leurs origines géographiques.

En effet, d'après Karanja et wood (1988), les souches isolées à partir des régions chaudes (kenya), tolèrent les fortes températures (supérieure à 30°C) par rapport à celles isolées des régions froides qui sont plus sensibles aux fortes températures (supérieure à 30°C).

Les 26 souches de pois chiche isolées des étages aride et saharien du Maroc étaient plus affectées par les basses températures (Berraho, 1984).

Des *Rhizobia* adaptés au froid ont été sélectionnés dont le but d'améliorer la productivité des légumineuses qui sont soumises aux basses températures (cas du sainfoin *Onobrychis viciifolia*, une légumineuse fourragère des régions tempérées). Une façon d'aborder ce problème est d'utiliser des *Rhizobia* associés à des espèces de légumineuses indigènes des régions de l'arctique et sub-arctique

qui sont le *Mesorhizobium sp* isolé des *Astragalus* et *Rhizobium leguminosarum* isolés des *Lathyrus sp* du Canada; ces *Rhizobia* sont considérés comme psychrotrophes puisqu'ils peuvent pousser à 0°C (Prevost et al., 2003).

Les *Rhizobia* de l'arctique se sont avérés plus efficaces que les *Rhizobia* des régions tempérées pour améliorer la croissance du sainfoin et plus compétitifs pour la nodulation à basses températures. Des études biochimiques sur l'adaptation au froid montrent qu'il y a une synthèse plus abondante des protéines de choc dû au froid chez les *Rhizobia* de l'arctique adaptés aux basses températures (-10°C) que chez ceux qui ne le sont pas (Cloutier et al., 1992). En effet, il s'est avéré qu'après un choc thermique de 25°C à 10°C, 5°C et 0°C, il y a eu une synthèse plus importante de ces protéines qui sont les CSP «cold-shock-proteins» de 6,1 kDa, avec une production plus importante à 0°C chez les souches adaptées au froid par rapport aux souches sensibles (Prevost et al., 2003). Les «cold-shock-proteins» sont aussi induites suite à un traitement de 30°C à 15°C chez *Sinorhizobium meliloti* (Browse et Xin, 2001).

En plus de la production de ces protéines spécifiques à basses températures, il y a aussi un changement dans la composition des lipides par l'augmentation du taux d'acides gras insaturés qui jouent un rôle dans le maintien de la fluidité de la membrane et de sa perméabilité (Vlassak et Vanderleyden, 1997). Les acides gras insaturés représentent 20% des acides gras totaux à 25°C. Cette proportion augmente de 80% à 5°C (Drouin et al., 2003).

Cette résistance aux basses températures confèrent à ces souches le pouvoir de s'adapter dans d'autres régions quand les périodes froides deviennent limitantes pour la croissance rhizobienne (Michiels et al., 1998).

Outre, des «heat-shock-proteins» sont produites suite à un traitement de 35°C à 45°C comme indice de tolérance chez *Bradyrhizobium japonicum* (Munchbach et al., 1999 ; Zhang et al., 2002); dont 7 gènes codant pour ces «heat-shock-proteins» ont été identifiés chez cette même espèce (Freiberg et al., 1997 ; Perret, 1997).

Actuellement, le rôle exact de ces protéines charpentes secrétées à fortes et à basses températures n'est pas encore clair et si la tolérance des *Rhizobia* aux températures extrêmes revient réellement à la production de ces protéines ou bien à d'autres mécanismes (Margianga et Avilio, 1993 ; Turner et Young, 2000 ; Aranjuelo et al., 2004).

II-L'assimilation de l'azote minéral du sol:

L'azote nitrique constitue la source principale d'azote pour la majorité des végétaux et représentent la fourniture préférentielle pour tous les végétaux supérieurs (Heller, 1989).

Au début du cycle de développement de la légumineuse, l'azote est fourni par la graine et à partir de la levée, l'assimilation de l'azote nitrique prend le relais (Wery, 1987).

Cette assimilation consiste en une réduction de l'ion NO_3^- en NO_2^- . L'aboutissement de la chaîne enzymatique serait les ions ammonium NH_4^+ (Saravitz et al., 1994 ; Jiang et al., 2001). Cette assimilation est assurée par une chaîne de réactions enzymatiques qui aboutit à la formation de glutamine et de glutamate (Hirel et al., 1992 ; Turner et Young, 2000).

L'assimilation des nitrates se fait en trois étapes qui sont l'absorption, la réduction et l'accumulation des nitrates.

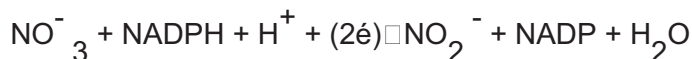
-**L'absorption** des ions NO_3^- par les racines est un phénomène actif, stimulé par la lumière qui nécessite de l'énergie (ATP) et qui augmente avec les concentrations croissantes en ions NO_3^- (Arrese-Igor et al., 1998 ; Abdellaoui et al., 1999). Le NO_3^- est alors soit stocké dans la vacuole et intervient alors dans le contrôle de la pression osmotique, soit réduit et transformé en acides aminés et protéines (Gojon et al., 1991 ; Busch, 1993 ; Jiang et al., 2001).

- **La réduction** a lieu dans les feuilles chez les espèces herbacées selon Robin et Salsac (1987) et

Bussi et al (1989), trois facteurs principaux interviennent dans la réduction des nitrates :

- La quantité d'enzyme
- La disponibilité des nitrates
- La disponibilité du NADPH

La voie d'assimilation des nitrates comprend la réduction des nitrates en nitrites dans le cytoplasme par la nitrate réductase (Bazzigalupi et al., 1992).



2-1- La nitrate réductase:

La nitrate réductase est l'enzyme qui catalyse la première étape du métabolisme du nitrate, particulièrement sensible à la protéolyse et présente en très faible quantité dans les cellules (Rideout et al., 1994 ; Vincentz et Caboche, 1997). Elle est responsable de la réduction des nitrates en nitrites, mise en évidence pour la première fois chez le soja (Heller, 1989). La nitrate réductase est une enzyme présente chez tous les organismes susceptibles de métaboliser les nitrates (plantes, champignons, quelques espèces de levures et de bactéries) (Touraine et Gojon, 1997 ; Fan et al., 2005). C'est une molybdo-flavoprotéine de masse molaire comprise entre 200 et 270 Kilodaltons, inductible par son substrat et par la lumière (Pilar, 2004).

2-2-La nitrite réductase:



L'enzyme est localisée dans les chloroplastes des feuilles vertes et les proplastides des racines (Rideout et al., 1994). C'est une enzyme de masse moléculaire 60-64 Kilodaltons qui catalyse la réduction des nitrites en ammonium (Silveira et al., 2001).

D'après Imsande et Touraine (1994), les nitrites qui sont toxiques à fortes doses ne peuvent être accumulées et leur présence dans la cellule n'est que temporaire.

Une fois le NH_4^+ formé, il est rapidement incorporé dans les acides aminés en

raison de sa toxicité (Patriarca et al., 2002). Il est pris en charge par un système enzymatique GDH (Soltani et al., 1992 ; Turner et Young, 2000) qui catalyse le passage de l'azote inorganique à une molécule organique (Young, 1993 ; Saravitz et al., 1994).

2-3- Effet de la température sur l'assimilation de l'azote du sol:

La température est parmi les facteurs de l'environnement qui affecte considérablement la croissance et le développement des végétaux.

D'après Mazliak (1981), les basses températures provoquent chez les plantes sensibles des dégâts physiologiques au niveau des tissus et qui sont connus sous le nom de "maladies physiologiques du froid" ou "chilling injury", occasionnées par des variations brusques de températures. Toute variation de température affectant un être vivant provoque deux sortes de réactions très différentes:

- A- Les réactions biochimiques du métabolisme changent de vitesse (sans que la structure des enzymes catalysant ces réactions ne change).
- b-La structure des macromolécules cellulaires se modifie (membranes...), accumulation de certains solutés (proline, sucres...etc).

Les plantes d'origine tropicale et subtropicale comme le riz sont sensibles aux températures comprises entre 0°C et 20°C, alors que celles des régions tempérées ne manifestent aucune sensibilité (Georgieva et Lichtenthaler, 1999).

Madowitch et al (1986) affirment que la température joue un rôle essentiel dans l'absorption de l'eau et des éléments minéraux nécessaires à la plante et agit sur la vitesse du métabolisme. Havaux et Lannoye (1985) ont montré qu'il y avait une augmentation significative du poids sec chez le maïs avec chaque augmentation de température de 5°C.

Selon Soltani et al (1992), l'absorption des nitrates et de l'ammonium chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.) est très affectée par la température par rapport aux autres ions et de ce fait, sur la translocation de l'azote des racines vers les parties aériennes.

Le pois chiche semé en Octobre, en Inde, croît très lentement jusqu'à la fin du mois de Janvier lorsque les températures commencent à augmenter. La floraison est tardive. De grandes quantités de matière sèche sont accumulées et le rendement en grains est de 3000 à 4000kg /ha. Lorsque le même génotype est cultivé tardivement, il croît rapidement, fleurit précocement, accumule de faibles quantités de matière sèche avec un rendement de 200kg/ha (Berraho, 1984).

Les températures fraîches empêchent les plantules de mobiliser l'azote nécessaire à la fabrication des protéines qui composent la chlorophylle surtout chez les plantes d'origines tropicales adaptées aux températures chaudes(Tuker, 2004). En effet, des apports d'azote au sol favorisent l'ARN car cette activité est induite et régulée par le flux de nitrates, lui-même contrôlé par la température et par l'absorption par les racines (Delhon et al., 1995 ; Touraine et Gojon, 1997).

D'après Derieux et al (1989), chez le maïs (LG9), un traitement à 4°C durant 3 jours

s'est traduit par une réduction remarquable de l'activité photosynthétique et le rendement a chuté de près de 60%. En réalité, les basses températures diurnes sont beaucoup plus limitantes pour la croissance que les basses

températures nocturnes, ce qui suggère un effet direct sur la photosynthèse (NADPH pour l'ANR) (Warner et Huffaker, 1989 ;Chainsompongpan et *al.*, 1990). L'assimilation du CO₂ par les feuilles de fève est significativement réduite en dessous de 15°C (Boote et *al.*, 2002).

La photosynthèse et la respiration sont aussi nettement affectées à 35°C et 45°C (Leena, 2002 ; Schrader et *al.*, 2004). Il semble que cette inhibition de la photosynthèse puisse être attribuée en grande partie à une destruction de l'appareil photochimique suite à un changement dans l'ultrastructure des chloroplastes (Mardowitch et *al.*, 1986 ;Talwar et *al.*, 1999) avec une perte rapide des propriétés fonctionnelles des membranes thylacoidiennes et fermeture des stomates (Harding et *al.*, 1990). C'est surtout l'activité de la *rubisco* qui est affectée par ces fortes températures (Aranjuelo et *al.*, 2004).

La faible température mène à un déficit hydrique de la plante suite à une mauvaise ascension de l'eau et par conséquent, a une accumulation de l'acide abscissique au niveau des jeunes feuilles (Lipsman, 1986 ; Sultan et *al.*, 2001).

Le froid peut affecter les protéines enzymatiques de plusieurs façons soit en diminuant la vitesse des réactions qu'ils catalysent ou en changeant l'affinité de ces enzymes pour leur substrat, mais il peut également modifier le contenu des tissus en enzymes, ou perturber la stabilité de ces protéines (Deane-Drumond et *al.*, 1980 ; Mazliak, 1981 ; Georgieva et Lichtenthaler, 1999). En effet, selon Turner et Young (2000), les températures extrêmes affectent nettement l'activité de la nitrate réductase et de la glutamine synthétase.

III- Participation des deux activités à la nutrition azotée:

Une meilleure connaissance des deux voies de la nutrition azotée chez les légumineuses pourrait permettre de mieux subvenir aux besoins de la plante au cours de son cycle de développement (Baccou et Yves, 1985).

Ces deux processus sont souvent complémentaires et se succèdent dans le temps (Desperrier et *al.*, 1985), ou bien concurrentiels. Ils sont tous les deux nécessaires pour obtenir un rendement maximal (Sekhon et *al.*, 1986 ; Wery, 1986), mais les deux enzymes responsables des activités fixatrice et assimilatrice fonctionnent avec des intensités différentes (Martensson et Rudberg, 1996 ;Jiang et *al.*,2001).

Les légumineuses possèdent la capacité de fixer l'azote atmosphérique, mais exigent au départ une certaine disponibilité en NO₃⁻ (dose starter) pour que la fixation symbiotique puisse s'instaurer et assurer par la suite l'alimentation de la plante en azote (Soltani et *al.*, 1992).

Chez le fênegrec, les deux activités fonctionnent simultanément en présentant un maximum pendant la floraison. Des concentrations en nitrates de 1,5 et 5 mM, favorisent le développement des nodosités alors que les fortes concentrations limitent la fixation (Desperrier et *al.*, 1985).

La nitrate réductase est moins sensible aux contraintes du milieu que la nitrogénase (Conjonet *al.*, 1992). Cette différence de sensibilité assure probablement à la plante une alimentation azotée dans les conditions de stress (Wery et *al.*, 1986 ; Patriarca et *al.*, 2002). En effet, les plantes qui dépendent de la fixation d'azote sont très sensibles aux fortes températures comparées aux plantes assimilatrices (Browse et Xin, 2001 ; Salon et *al.*, 2001 ; Serraj et *al.*, 2001).

Les deux activités nitrate réductase et nitrogénase sont antagonistes par le fait d'une compétition pour les équivalents réducteurs entre l'assimilation du nitrate et la fixation d'azote (Silveira et *al.*, 2001).

Le coût énergétique de la réduction de l'azote moléculaire peut au mieux être égal à celui de la réduction du nitrate, mais dans la majorité des cas, il est de 30 à 50 % plus important. Théoriquement, la production de 1 Mole de NH_4^+ nécessite 15 ATP par la réduction de nitrates et 12 ATP seulement par la fixation symbiotique, mais le coût énergétique de celle-ci augmente par la croissance et le maintien des nodosités et surtout par la production d'hydrogène (Robin et Salsac, 1987).

VI-La proline :

4-1-Généralités :

La proline ou l'acide pyrrolidine 2-carboxylique ($\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2\text{N}$) est l'un des vingt principaux acides aminés naturels qui entrent dans la constitution des protéines (Kazoko et Kazuo, 1994).

Cet amino-acide s'accumule sous l'action du sel, du stress hydrique et du froid (Paquin, 1977). Cette accumulation peut être accompagnée par d'autres acides aminés comme l'alanine, l'asparagine, la glutamine, la sérine ou la glycine ainsi que certains carbohydrates comme le mannitol, le sorbitol et le glycérol chez *Arabidopsis thaliana* (Kazoko et Kazuo, 1994). Leur structure chimique présentant des affinités pour les groupements carbonés des protéines, protègeraient leur intégrité structurale (Calu, 2006).

Plusieurs auteurs associent l'accumulation de la proline à la résistance des plantes aux contraintes du milieu. Elle sert de critère de résistance aux stress biotiques et abiotiques et peut expliquer au mieux la stratégie d'adaptation de ces plantes (Sanchez et *al.*, 2001).

En réalité, le processus d'accumulation reste encore mal connu et les causes sont multiples:

Aucune voie métabolique ne semble être responsable de l'élargissement et du changement du pool en acides aminés. L'inhibition de la synthèse protéique et la dégradation (protéolyse) de celle-ci ont été suggérées comme étant les principales causes et que la source d'azote pour la proline provient des protéines foliaires (Venekamp et Koot, 1988).

Les acides organiques qui proviennent de la respiration oxydative constituent aussi une source directe de l'accumulation de la proline sous des conditions de stress (venekamp et *al.*, 1988 ; Théberge, 1996 ; Dionne et *al.*, 2001).

Il y a une accumulation de la proline associée à l'inhibition de son oxydation (Havaux et Lannoye, 1982).

D'après Herzog (1989), la proline peut être accumulée au niveau des feuilles et transportée vers les tissus meristématiques pour contribuer à l'ajustement osmotique au niveau des organes de croissances durant le stress.

D'autres hypothèses considèrent la proline comme un agent protecteur des enzymes et des structures membranaires (Sanchez et *al.*, 2001 ; Benlaribi et *al.*, 2005).

Au cours de ces dernières années, la plupart des connaissances acquises dans le domaine de la dégradation des protéines en relation avec les stress environnementaux, montrent que la protéolyse intervient dans toutes les étapes de développement de la plante, de la germination jusqu'à la sénescence et dans tous les compartiments cellulaires (Rashmi et Agarwal, 1998 ; Belkhodja, 2002).

4-2-Effet de la température sur l'accumulation de la proline :

Les végétaux sont capables d'augmenter considérablement leur résistance au froid lorsqu'ils sont soumis à des températures voisines de 0°C (Mazliak, 1981 ; Touraine et Gojon, 1997) et ceci grâce aux sites d'actions primaires localisés au niveau des membranes cellulaires ainsi qu'à d'autres mécanismes (Levitt, 1989 ; Delauna et Verma, 1993).

D'après Kazoko et Kazuo (1994), le gène *rd29A* d'*Arabidopsis* a été induit 5h après l'exposition des plants à 4°C. Calu (2006) affirme que la P5C (Pyrroline-5-carboxylate) est l'enzyme clé dans la production de proline chez *Arabidopsis thaliana* durant le stress.

L'adaptation au froid de l'orge s'est caractérisée principalement par une accumulation rapide de composés cryoprotecteurs tels que les sucres solubles et les acides aminés comme la proline. C'est pour cela que la mesure de la concentration en proline pourrait servir d'indice de résistance au froid qui peut atteindre des valeurs beaucoup plus élevées (soit 25 fois) que la valeur initiale, selon la sévérité du stress (Havaux et Lannoye, 1982 ; Belaribi et *al.*, 2005).

Il a été démontré que l'enrichissement artificiel en proline chez la luzerne et les céréales d'hiver entraîne une augmentation marquée de leur tolérance au froid (Borochoy et *al.*, 1989).

Des concentrations de 1mM, 10mM et 100mM de proline ont été appliquées sur des cultures d'embryons de Mélèze hybride et de chêne à 4°C ; les résultats montrent que ces

cultures arrivent à survivre et à croître normalement, contrairement au témoin (0mM) dont la croissance est totalement inhibée. Le pic d'accumulation de la proline coïncide avec le maximum de tolérance au froid (Gleeson et *al.*, 2004).

II-MATERIEL ET METHODES:

L'essai a été réalisé dans une serre en verre, au niveau de la station expérimentale de l'institut national agronomique d'El Harrach.

II-1-Conditions de l'essai:

Les expériences sont réalisées dans un phytotron qui nous a permis d'effectuer des traitements de températures choisies, avec une photopériode de 14h de lumière et 10h d'obscurité, une intensité lumineuse de 2000 lux et 60% d'humidité relative.

Les traitements de températures sont au nombre de 8 (2°C, 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C et 35°C) avec 3 répétitions pour chaque température.

Les plants subissent le traitement dans un phytotron pendant une période de 24h; ils sont ensuite retirés pour effectuer des mesures.

La variété utilisée est la *GISA 402* (ICARDA), caractérisée par sa résistance à l'orobanche et à l'antracnose. Le semis a été réalisé le 02/03/02 dans des pots en plastique préalablement remplis d'un mélange équivalent de terre, sable et terreau préalablement désinfecté.

Les graines n'ont pas été inoculées, car le *Rhizobium* existe dans le sol.

II-2- Dispositif expérimental:

L'essai est mené selon un dispositif «blocs aléatoires complets» (fig n°5). Les pots ont été disposés en trois blocs. Chaque bloc (essai) comporte 3 sous blocs (sous essais), correspondant chacun à un stade phénologique donné de la culture (stade végétatif, début floraison et remplissage des gousses).

- A : végétatif.
- B : floraison.
- C : gousse.



Photo n° 2 : Les plants de fève sous serre au stade prés floraison.



Photo n° 3 : Système racinaire de *Vicia faba minor nodulé*.

Stade A	5°	35°	20	10°	2°	15°	30°	25°
Stade B	5°	10	30°	25°	2°	35°	15°	20°
Stade C	30°	15°	25°	5°	35°	10°	20°	2°

Figure n° 5: Schéma du dispositif expérimental (exemple d'un bloc).

II-3-Description du dispositif de mesure de L'ARA:

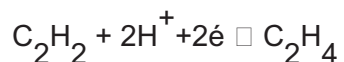
Au cours de notre expérimentation, nous avons utilisé la méthode "in situ" de la réduction d'acétylène mise au point par (Balandreau et *al.*, 1971) afin d'estimer l'efficacité.

La nitrogénase est l'enzyme qui catalyse la réduction biologique de l'azote atmosphérique selon la réaction suivante:



Cette enzyme est capable d'accepter d'autres substrats autres que le N_2 ,

caractérisés par une triple liaison, dont l'acétylène qu'elle réduit en éthylène:



Cette méthode consiste à isoler la partie souterraine de la plante de l'atmosphère extérieure et ceci grâce à un sac en plastique hermétiquement fermé pour assurer l'étanchéité du dispositif d'incubation.

A l'aide d'une seringue hypodermique, on prélève 5ml d'acétylène C_2H_2 à partir d'une bouteille sous pression. Ces 5ml sont injectés directement dans le pot préalablement plastifié et on laisse incubé pendant 30mn. Avec la même seringue, on prélève 5ml du mélange gazeux interne qu'on injecte dans le tube vénoject de 13ml fermé avec un bouchon en caoutchouc. Ce tube est préalablement vidé, par un prélèvement de 5ml d'air afin d'éviter toute compression.

L'éthylène produit est dosé dans un chromatographe en phase gazeuse (C.P.G). L'injection dans le chromatographe est effectuée à l'aide d'une seringue hypodermique de 1ml. Dans le tube vénoject, 1ml



Photo 1 : Dispositif de mesure de l'ARA

du contenu gazeux est prélevé et injecté à travers la pastille du chromatographe. La hauteur du pic d'éthylène permet de déduire le nombre de moles d'éthylène contenu dans 1ml injecté.

Les pics de sortie sont repérés sur le chromatographe dans l'ordre suivant : air, C₂H₄, C₂H₂. De ce fait, la hauteur des pics des différents échantillons nous permet de calculer l'ARA selon la formule suivante:

$$\text{ARA} = \frac{\text{Hech} \cdot V1 \cdot V2 \cdot V4 \cdot V5 \cdot 60 \cdot 10^6}{\text{Hech} \cdot 24500 \cdot V3 \cdot V6 \cdot V2}$$

$$\text{ARA} \text{ (}\mu\text{moles C}_2\text{H}_4\text{/h/plt).}$$

- V1 : volume éthylène étalon.
- V2 : volume d'injection au chromatographe.
- V3 : volume flacon étalon.
- V4 : volume vénoject.
- V5 : volume du pot.
- V6 : volume de prélèvement de l'échantillon.
- T : temps d'incubation.

II-4-Description du dispositif de mesure de L'ANR:

La mesure choisie pour effectuer nos mesures de l'ANR au laboratoire est la méthode " in situ ", la plus simple à mettre en œuvre proposée par Robin et *al* (1983). Cette méthode permet de mesurer l'activité de l'enzyme qui refléterait l'intensité de la fourniture du substrat à l'enzyme. Le dosage se fait sur une feuille entière, ce qui nous rend plus proche de la réalité. L'ANR décroît des feuilles récentes aux feuilles les plus anciennes (Fan et *al.*, 2005).

Cette méthode consiste à prélever une feuille saine entièrement formée du sommet de la plante où l'ANR est maximale et cela après 6h d'éclairement environ. Cet échantillon est immédiatement coupé. Il est pesé et placé dans un tube vénoject. Ensuite on fait plonger le pétiole de la feuille excisée dans une solution de KNO₃⁻ (0,5M) recouvert de papier aluminium pour assurer l'obscurité totale afin de réprimer la photosynthèse et de ce fait supprimer l'activité de la nitrite réductase. Le tube est bien fermé par un bouchon en caoutchouc, transpercé par deux aiguilles creuses qui permettent de procéder à un balayage de l'atmosphère durant 1 minute à partir d'une bouteille d'azote gazeux. Le but de l'anoxie est de bloquer la respiration et de supprimer ainsi la compétition pour le pouvoir réducteur entre la nitrate réductase et la respiration. Le débit est réglé à une pression de 1,5 bars; ce balayage est interrompu par le retrait simultané des deux aiguilles.

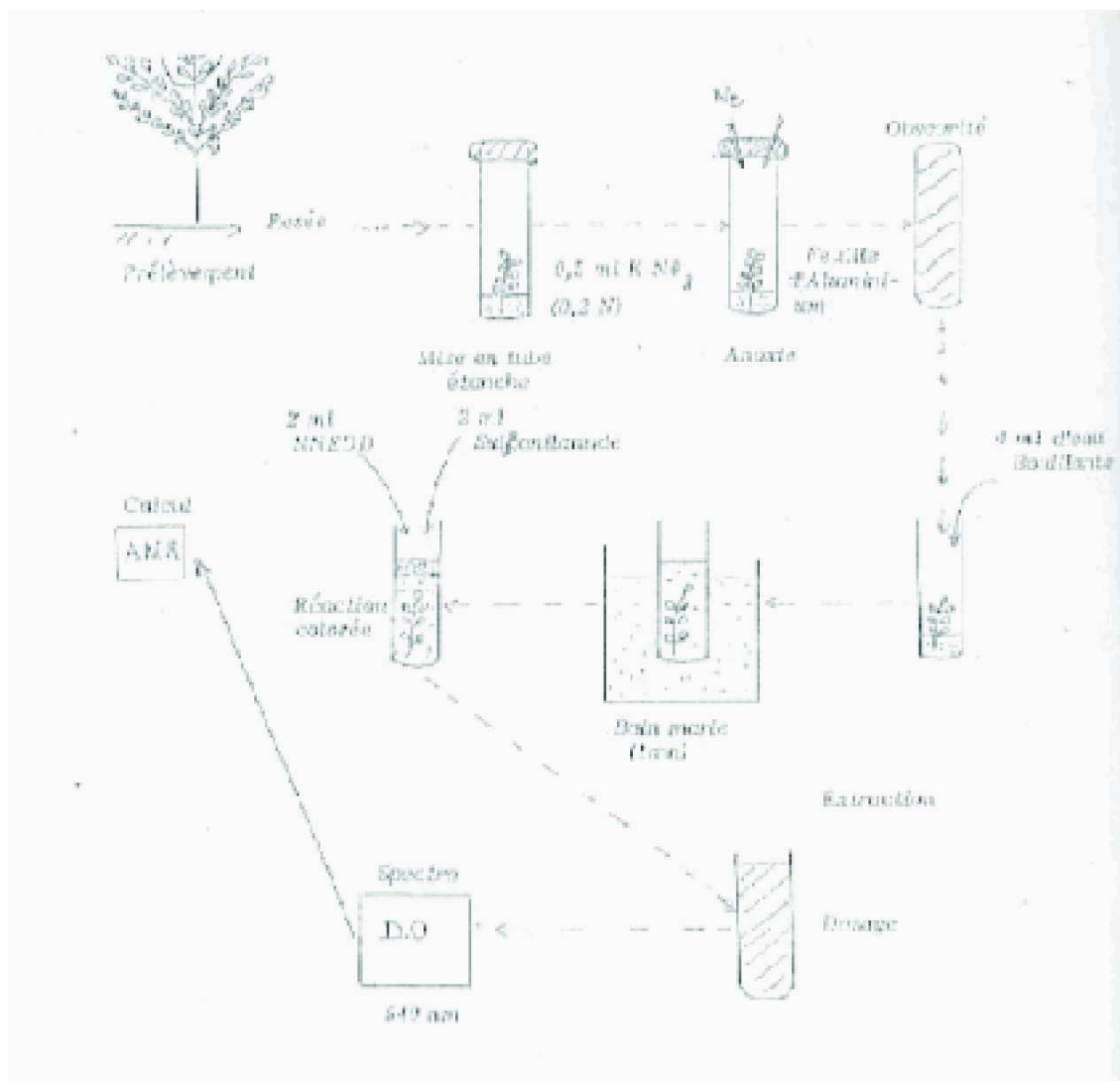


Figure 16 : Principe de la mesure de l'ANR

Après une période d'incubation de 30 mn, temps nécessaire pour la production de nitrites, 4 ml d'eau distillée bouillante sont ajoutés dans chacun des tubes vénoject, et placés dans un bain-marie durant 10mn afin d'extraire les nitrites produits.

Après refroidissement, 2ml de sulfanilamide (10g/l dans HCl 1,5N) et 2ml de N.N.E.D (n.naphtyléthylène-diamine-dichlorure 0,2g/l) sont ajoutés, ce qui permet d'obtenir une coloration rose figure n° 16.

Le dosage se fait au spectrophotomètre à 540 nm, qui donne des valeurs de densité optique (DO) proportionnelle à la quantité de nitrites diffusés dans le milieu.

Un échantillon témoin est laissé à l'air libre et a la lumière, permet de retrancher à partir de la densité optique des échantillons, la part des nitrites présentes dans les tissus avant l'incubation.

L'activité nitrate réductase est exprimée en $\mu\text{moles de NO}_2^-$ produit par gramme de

poids frais et par heure.

Cette activité se calcule par la formule suivante :

$$\text{ANR} = \frac{\text{DO} \cdot \text{V} \cdot 60}{\text{P} \cdot \text{T} \cdot \text{E}}$$

P.T. E

- **ANR:** $\mu\text{moles de NO}_2^- / \text{g MF/h}$.
- DO: densité optique.
- V : volume d'extraction 8,5ml.
- P : poids frais d'échantillon.
- T : temps d'incubation 30mn.
- E : coefficient d'extinction molaire $47,8 \cdot 10^{-3}$.

II-5- Description du dispositif du dosage des nitrates:

II-5-1-Préparation de l'échantillon:

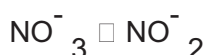
Pour le dosage des nitrates, comme pour les mesures de l'ANR, des feuilles entières ont été prélevées du sommet de la plante. Ces feuilles sont pesées afin de déterminer leur poids frais, elles sont ensuite introduites dans une étuve à 65°C pendant 24h. Une fois retirée de l'étuve, la feuille est repesée pour déterminer son poids sec et enfin elle est broyée pour obtenir une poudre fine.

La poudre de chaque feuille est conservée dans un flacon en verre. Les nitrates sont extrait par 10ml de HCl 0,1N pendant 48h à 4°C et dosé à l'aide d'une cologne réductrice de cadmium.

II-5-2-Principe de la méthode de dosage:

Pour la détermination des nitrates, on utilise un procédé de réduction des ions nitrates (NO_3^-) en nitrites (NO_2^-) par une colonne réductrice de cadmium, tout comme la nitrate réductase dans le végétal (Treguer et Lecorre, 1975 in Robin et al., 1983).

Cd



Les nitrites réagissent avec le sulfanilamide en milieu acide pour donner un composé diazoté qui forme avec la N-naphtyl-éthylène diamine dichlorure un complexe coloré en rose.

Le dosage des nitrites se fait au spectrophotomètre à 540 nm.

La quantité de nitrates est exprimée en $\mu\text{moles de NO}_2^-$ par gramme de poids sec et

se calcul par la formule suivante:

$$\text{Teneur en NO}_3^- = \frac{\text{DO} \cdot \text{Dilution}}{\text{Poids sec} \cdot E}$$

($\mu\text{Moles/gMF}$) Poids sec . E

DO: densité optique.

E : coefficient d'extinction molaire $47,8 \cdot 10^{-3}$.

II-6- Dosage de la proline:

La technique de dosage utilisée est celle de Trolle et Lindley (1955), simplifiée et mise en point par Dreier et Goring (1975).

On pèse 100 mg du matériel végétal pris dans le tiers médian de la feuille auxquels sont ajoutés 2ml de méthanol à 40%; l'ensemble est chauffé au bain-marie à 85°C durant 60mn. Après refroidissement, on prélève 1ml de l'extrait auquel on ajoute un mélange qui contient de la Ninhydrine, de l'acide acétique et l'acide ortho phosphorique H_3PO_4 (D 1.7).

Le mélange est porté à ébullition au bain-marie durant 30mn à 100°C. Après l'apparition de la couleur rouge et une fois refroidie, on rajoute 5ml de benzène et après agitation on a séparation de la solution en

deux phases, une phase inférieure et une phase organique supérieure. Celle-ci est pipetée et sa densité est mesurée à 528 nm.

$$\text{Concentration en proline } (\mu\text{M/g MF}) = \frac{y \cdot 2 \cdot 1000}{\text{MF} \cdot 115,13}$$

MF.115,13

- y : densité optique.
- MF : masse de matière fraîche.
- Masse molaire de la proline = 115,13g.

II-7-La croissance bactérienne:

La souche de *Rhizobium* que nous avons utilisée dans cette étude est une souche de *Rhizobium Leguminosarum* bv *viciae* extraite de nodosité d'un plant de fève (*Vicia faba minor*) suite à un piégeage qui permet de sélectionner directement à partir du sol et à l'aide de notre plante cible les souches pour lesquelles cette dernière a le plus d'affinité.

Nous avons utilisé pour l'isolement et la purification de la souche, le milieu YEM (Vincent, 1970) dont la composition est la suivante :

- Mannitol 10g
- Extrait de levure 0.4g
- K_2HPO_4 0.5g

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g
- NaCl 0.1g
- Agar 15g

-Le PH est ajusté à 7 à l'aide d'une solution de NaOH ou HCl (N/10).

-Stérilisation à l'autoclave pendant 20mn à 120°C.

7-1-Collecte des nodules :

Un plant de féverole a été déterré et acheminé au laboratoire où son système racinaire est lavé à l'eau courante, rincé à l'eau distillée puis séché au papier absorbant.

Un nodule ne montrant aucune altération structurale est alors excisé pour l'extraction des bactéries.

7-2-Extraction, isolement et purification des souches :

a- Extraction:

Les bactéries sont extraites en conditions d'asepsie par écrasement d'un nodule dans 0.5 ml d'eau physiologique stérile.

Pour éviter toute contamination, la surface du nodule est stérilisée par passages successifs dans les conditions suivantes :

- Ethanol à 90% pendant 30 secondes.
- Chlorure mercurique (HgCl_2) à 0.1% pendant 3 mn.

Le HgCl_2 étant toxique pour les bactéries, il est nécessaire de rincer le nodule dans des bains successifs d'eau distillée stérile afin d'éliminer les traces de HgCl_2 qui pourraient compromettre la viabilité des bactéries. Le nodule est alors écrasé à l'aide d'une tige en verre dans 0.5ml d'eau physiologique stérile.

b- Isolement et purification de la souche:

A partir du broyat ainsi obtenu cinq boîtes de pétri contenant du milieu YEM sont ensemencées.

Afin de faciliter les procédures d'isolement et de purification de la souche de *Rhizobium*, nous avons ajouté 10ml/l d'une solution de rouge Congo à 0.25% au milieu YEM, pour distinguer les colonies de *Rhizobium* des contaminants qui absorbent fortement le rouge Congo (Vincent, 1970).

Après trois jours d'incubation à 28°C, les colonies de *Rhizobium* sont reconnaissables par leur non absorption au rouge Congo, ainsi qu'à leur aspect gommeux et translucide; elles sont ensuite isolées et purifiées par des repiquages successifs sur le milieu YEM.

7-3-La préculture:

A l'aide d'une pipette stérile, on transvase stérilement la suspension bactérienne dans des tubes à essai contenant 10ml du milieu YEM liquide, qui seront mis à l'obscurité sur agitation orbitale durant 24h à 28°C.

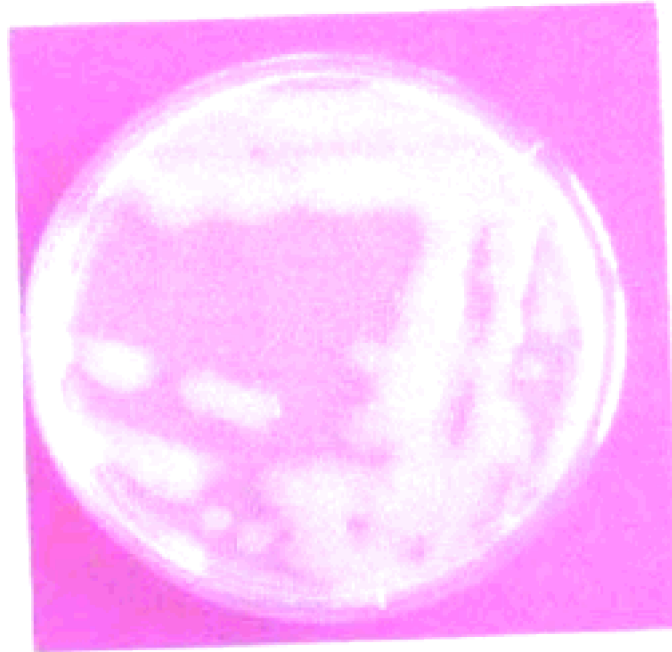


Photo n° 4 : *Rhizobium leguminosarum bv viciae*

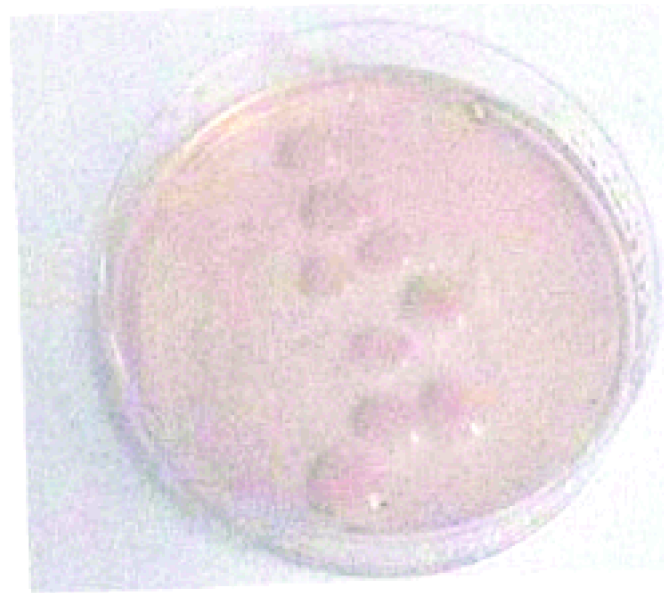


Photo n° 5 : Dénombrement de *Rhizobium* sur boîte

7-4-La culture

On remplit l'erenmeyer avec du milieu YEM liquide au (1/5) afin de permettre une bonne aération du milieu et à l'aide d'une pipette stérile, on prélève 1ml de la préculture qu'on transvase stérilement dans l'erenmeyer. Des dilutions successives sont faites dans des

tubes à essais contenant 9ml d'eau physiologique stérile où on met 1ml de la culture. On agite au vortex puis on prélève à nouveau jusqu'à la dilution 10^{-12} .

Des prélèvements en cours de culture peuvent être faits afin de surveiller la croissance de la souche par densité optique et dénombrement (dilution étalement). En effet, après chaque dilution 2 gouttes (0.1 ml) sont prélevées et ensuite mises dans une boîte de Pétri avec 3 répétitions à 28°C. Au bout de 2 jours, nous constatons l'apparition de petites colonies blanches muqueuses légèrement bombées. Après dénombrement, nous pouvons déduire le nombre de bactéries contenues dans la solution de départ.

La croissance de la bactérie a été suivie par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 620nm.

Résultats et discussions

1-Effet de la température sur l'assimilation des nitrates:

L'évolution de l'ANR (activité nitrate réductase) en fonction de la température révèle des courbes pratiquement de la même allure (figure n° 6). D'une manière générale, l'ANR est élevée après traitement des plants à basses températures et diminue progressivement avec l'augmentation des températures pour les trois stades de développement. Statistiquement les températures 2°C et 5°C (groupe A) se démarquent des autres températures (groupe B) par leur effet sur l'ANR pour les deux stades (végétatif et gousse). Tandis qu'au stade floraison, l'analyse statistique fait ressortir plusieurs groupes à savoir 2°C, 5°C et 10°C (A), 20°C, 30°C et 35°C (C) et deux groupes intermédiaires 15°C (AB) et 25°C (BC). Voir annexe.

Selon Alofe et al (1973), Hallark et Huffarker (1978), la température a plusieurs effets sur l'activité nitrate réductase. En effet, c'est un des facteurs de l'environnement susceptible de faire varier à la fois la quantité d'enzymes ainsi que leur vitesse de réaction.

La nitrate réductase est l'une des premières enzymes inactivée par les fortes températures et son activité semble dépendre essentiellement de la quantité d'enzymes

présente après les traitements de la température (Arrese-Igor et *al.*, 1998 ; Vasilieva et *al.*, 2001).

D'après Aslam et *al.* (2002), le rythme de prélèvement du nitrate est modulé par la température et par le cycle jour/nuit chez le coton. Il exige un approvisionnement continu en carbohydrates véhiculés par la sève élaborée durant le jour (Bazzigalupi et *al.*, 1992 ; Toker, 2004) qui induisent l'expression des gènes de la nitrate réductase (Bush, 1993 ; Vincentz et Caboche, 1997).

Les faibles températures nocturnes ont un effet marqué sur l'ANR surtout chez les jeunes plantules. En effet, cette activité augmente durant la journée suite à un traitement de 0°C durant la nuit qui précède (Deane-Drumond, 1980). Il est avéré que l'obscurité provoque une inactivation naturelle de cette enzyme, mais les basses températures assurent sa conservation en maintenant un pool d'enzymes pendant la phase obscure (Alofe et *al.*, 1973). La disponibilité de ce pool pendant le jour permet une forte ANR durant les heures chaudes du midi (Deane-Drumond, 1980).

Chez le blé, l'ANR est élevée pour les plants ayant subis des faibles températures durant la nuit. Elle diminue progressivement avec l'augmentation des températures de traitements. Bazzigalupi et *al.* (1992), expliquent ces fluctuations soit par des variations dans la quantité d'enzymes présentes ou par des variations dans leur vitesse de réaction.

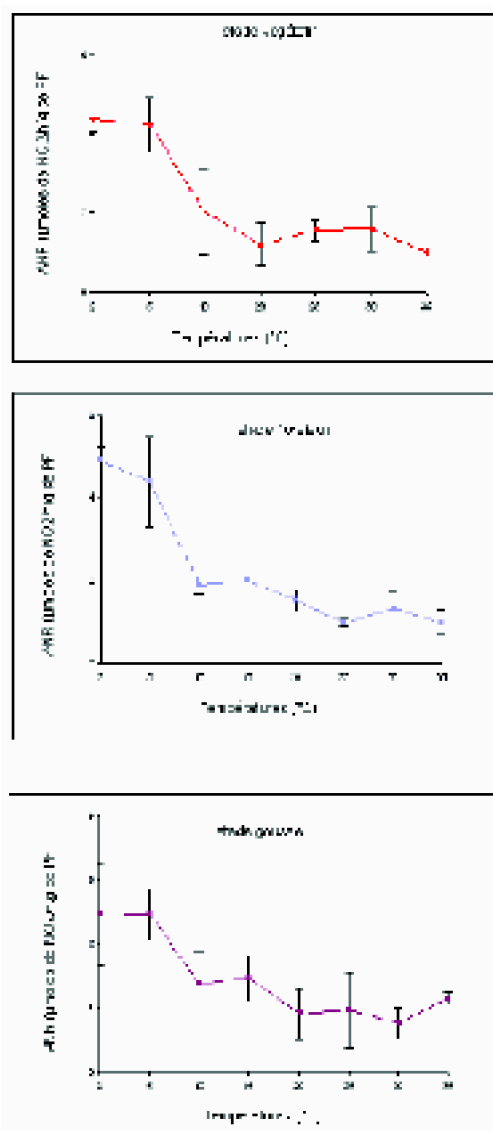


Figure n°6 : Evolution de l'ANR en fonction de la température

On remarque d'après la courbe n° 6 que l'ANR diminue progressivement avec l'élévation des températures. En effet, chez la fève, les températures comprises entre 41 et 43°C durant 16 et 24h respectivement provoquent une diminution de l'ANR qui peut reprendre normalement 24h après la levée du stress (Arrese-Igor et *al.*, 1998). Les fortes températures 29.4°C réduisent l'ANR de 40% en les comparant avec ceux obtenus à 18.3°C. Elles provoquent une diminution rapide de l'ANR par une faible synthèse (induction) et/ou la dénaturation de l'enzyme chez le maïs (Alofe et *al.*, 1973).

La mesure de l'ANR à plusieurs températures comprises entre 21 et 36°C, montre qu'il y a une augmentation de 45% en allant de 21 à 27.4°C et une réduction de 28% de 27 à 36°C chez la fève. Cette diminution de l'ANR à forte température serait due à la dénaturation de l'enzyme (Rideout et *al.*, 1994).

La diminution de l'ANR au stade gousse par rapport aux stades végétatif et floraison serait probablement due à l'épuisement du sol en nitrate.

2-Effet de la température sur la teneur en nitrates des feuilles:

La figure n° 7 montre l'évolution de la teneur de NO_3^- exprimé sur la base du poids frais en fonction de la température pour les trois stades phénologiques.

Les courbes montrent que les concentrations en NO_3^- sont faibles à basses températures, mais augmentent aux températures élevées.

L'analyse statistique fait ressortir pour la teneur en nitrates des feuilles des différences significatives et la comparaison des moyennes selon le test de Newman et Keuls à 5% révèle la présence de plusieurs groupes homogènes.

Au stade végétatif, la quantité de nitrates est faible de 2°C à 15°C, elle augmente à 20°C avec un maximum à 35°C.

Au stade floraison, la teneur en nitrate reste faible de 2°C à 15°C, ensuite elle croît progressivement entre 20°C et 35°C

Toutefois, on constate un maximum d'accumulation des nitrates au stade floraison. Cela pourrait être expliqué par le fait qu'à ce stade, la plante a besoin d'accumuler une plus grande quantité d'azote qui va servir à l'enrichissement du grain par la suite (Robin et al., 1983).

Pour le stade gousse, à 2°C, 5°C et 10°C, la concentration en nitrate reste toujours faible puis augmente à partir de 15°C jusqu'à 35°C. Macduff et al (1987) ont démontré que chez le colza, les concentrations de NO_3^- au niveau des feuilles, des tiges et des pétioles sont réduites à 3°C et 5°C mais augmentent à 7°C, 17°C et 25°C

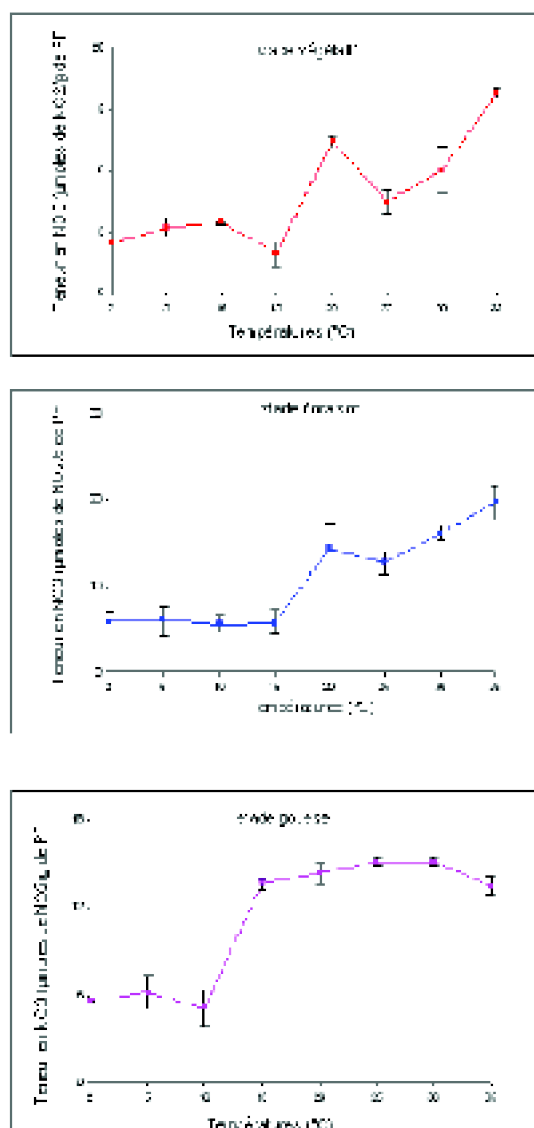


Figure n°7 : Evolution de la teneur en nitrates des feuilles en fonction de la température

Le transfert d'azote vers les parties aériennes est particulièrement affecté par les basses températures, ce qui pourrait expliquer la faible quantité en nitrates au niveau des feuilles (Sultan *et al.*, 2001). Fan *et al* (2005) affirment qu'il y a une forte accumulation des nitrates surtout au niveau des racines à basses températures (7°C), pendant la nuit et les jours nuageux chez le lupin.

A fortes températures, l'absorption de l'eau et des éléments minéraux est accentuée; ce qui explique les fortes teneurs en nitrates accumulées au niveau des feuilles à partir de 15°C.

3-Evolution de l'assimilation et de la teneur en nitrates des feuilles:

La figure n° 8 montre l'évolution de l'ANR et du taux de NO_3^- au niveau des feuilles en fonction des températures pour les trois stades de la plante.

On remarque que l'ANR évolue d'une façon inversement proportionnelle à la quantité de nitrates accumulés au niveau des feuilles pour les faibles températures à savoir (2°C, 5°C et 10°C) et les températures 20°C, 25°C, 30°C et 35°C pour les trois stades de la plante. En effet, d'après Robin et *al* (1983), toute modification dans le sens d'une diminution de l'ANR est une augmentation de la teneur en nitrate dans les tissus.

Sultan et *al* (2001) affirment que la mauvaise ascension des nitrates vers les feuilles à faibles températures réduit leurs arrivés au niveau des sites de réduction. D'après Berges et *al* (2002), l'ANR augmente à 17°C puis diminue à fortes températures (33°C) chez le blé. Une augmentation de la température aurait donc pour conséquence la diminution de la concentration en nitrate réductase d'où la baisse de l'ANR à partir de 30°C. Fan et *al* (2005) suggèrent que l'accumulation des nitrates durant les fortes températures pourrait être directement liée à l'inhibition de l'ANR suite à la dénaturation de l'enzyme

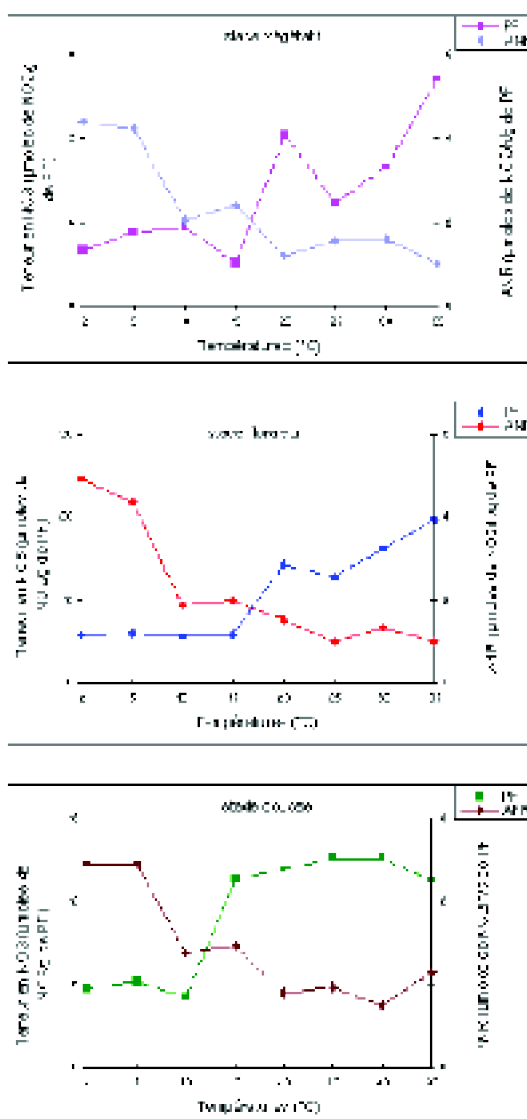


Figure n° 8: Evolution de l'ANR et de la teneur en NO₃ en fonction de la température

4-Effet de la température sur l'activité réductrice d'acétylène (ARA):

La figure n° 9 donne l'évolution de l'ARA en fonction des températures de traitement aux trois stades phénologiques.

L'activité réductrice d'acétylène est affectée quelque soit le stade de la plante. Au stade végétatif la courbe montre une évolution faible statistiquement identique aux températures 2°C et 5°C. Elle augmente progressivement à partir de 10°C pour atteindre son maximum à 25°C. Au delà de cette dernière, l'activité diminue sensiblement à 30°C et 35°C. L'allure des courbes est la même aux stades floraison et gousses. L'analyse de la

variance donne des différences très hautement significatives entre les traitements de températures et le test de Newman et keuls fait ressortir des groupes homogènes différents.

Selon Harding et Sheehy (1980), l'effet des températures sur *Medicago sativa* montre que la fixation d'azote est plus importante à 15°C qu'à 5°C ce qui confirme nos résultats. Selon Lurch et al (1993), Zhang et al (2002), les faibles températures (4°C et 9°C) réduisent la conductance des nodosités à la diffusion de l'oxygène chez le soja. Saadallah et al (2001) affirment que la température de 3°C augmente la résistance à la diffusion de l'oxygène dans les nodosités, ayant pour conséquence une inhibition de l'activité de la nitrogénase. Toutefois, pour Macdowal et al (1989) et Guasch et al (2001), la diminution de la perméabilité à l'oxygène est associée à des modifications structurales des cellules du cortex interne. Alors que pour Delgado et al (1993), elle serait due à une réduction de la photosynthèse et à la translocation des photosynthétats. D'après Schweitzer et Harper (1980), l'activité de la nitrogénase des nodosités serait limitée par un manque d'oxygène plutôt que par un manque de substrats carbonés.

L'ARA atteint un niveau d'activité important au stade floraison (figure n° 9) et correspond aux nombreux résultats qui situent l'optimum de fixation de l'azote au stade floraison début formation des gousses chez les légumineuses (Wery, 1987 ; Salon et al., 2001). La baisse qui se produit ensuite est interprétée comme une conséquence de la compétition exercée par les gousses au cours de leur remplissage. Elle est accentuée par la diminution rapide de l'activité des nodosités les plus âgées et la sénescence des feuilles dont les composés sont dégradés et remobilisés vers les graines (Frossard et Friaud, 1989 ; Serraj et al., 2001).

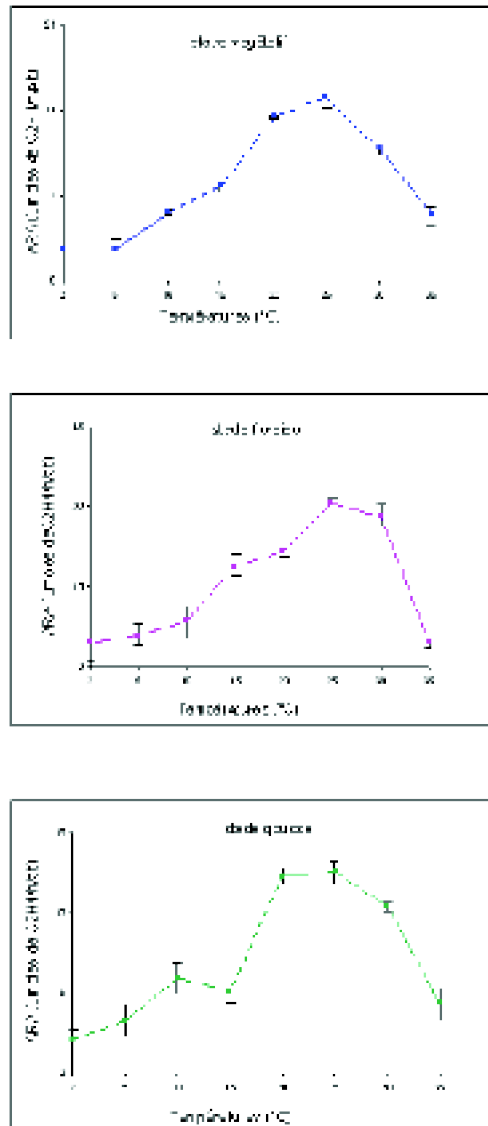


Figure n° 9 : Evolution de l'ARA en fonction de la température

La structure du nodule change, se durcifie quand les températures sont basses (7°C), l'activité du bactéroïde est moindre, elle s'accroît à 11°C mais la fixation d'azote ne devient efficiente qu'à 19°C chez le trèfle (Robin et al., 1987).

Les faibles températures affectent beaucoup moins la fixation biologique de l'azote que les fortes températures (Boote et al., 2002). En effet, ces dernières inhibent l'ARA en causant la sénescence précoce des nodules (Bordeleau et prévost, 1994 ; Ounane et al., 2002). D'après Roughley (1970), Zaharan (1999), elles perturbent le développement et le fonctionnement des nodosités. Chez la fève, la nodulation est fortement inhibée à 42°C et 45°C pendant une durée de 12h et 9h respectivement et les nodules formés à 35°C sont petits avec une faible activité de la nitrogénase (Zhang, 1999).

L'application d'un choc thermique de 40°C pendant 8h chez *Phaseolus vulgaris* se traduit par une diminution de 70% de l'ARA ; qui reprend son niveau initial après une semaine (Mariangela et Avilio, 1993 ; Hungria et al., 1993).

La reprise de l'ARA pourrait être liée à la production de nouveaux nodules qui est un processus long et coûteux en énergie (Georgieva et Lichtenthaler, 1999) et le taux d'activité réductrice de l'acétylène par plant, dépend principalement de la masse et du nombre de nodules (Kuzma et Layzell, 1994).

Chez la fève, la nodulation est sévèrement réduite à 30°C pendant 3 jours (Bryans et al., 1996). A fortes températures, la nitrogénase est rapidement dénaturée et les nodosités sont anormalement pigmentées (Arayangkoon et al., 1990).

Outre la limitation de la photosynthèse qui pourrait entraîner une diminution partielle de l'activité de la nitrogénase, l'accroissement de la production d'hydrogène est considéré comme un inhibiteur de la fixation de l'azote. Selon Harding et Sheehy (1980), Arayangkoon et al (1990), Kato et Saiko (1991), les températures supérieures à 25°C causent un accroissement de la production d'hydrogène.

5-Evolution de l'activité réductrice de l'acétylène et de l'activité nitrate réductase:

La comparaison des deux activités ARA et ANR (figure n°10) au cours des trois stades laisse entrevoir une interaction entre le fonctionnement de ces deux enzymes qui participent à un équilibre de la nutrition azotée en réponse au stress thermique.

Il apparaît pour les trois stades que la diminution de l'ARA est compensée par l'augmentation de l'ANR pour les températures 2°C et 5°C avec des points d'intersection pour les deux activités à 10°C et 15°C. Ensuite, ces deux activités divergent pour les températures 20°C et 25°C pour converger ensuite au delà de 30°C où on note une faible activité des deux enzymes

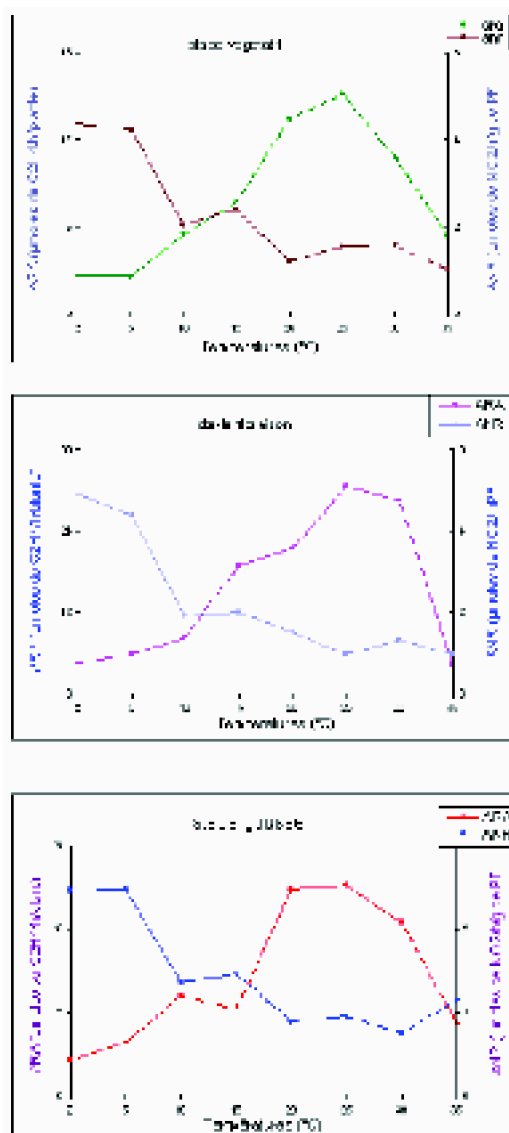


Figure n° 10 : Evolution des deux activités ARA et ANR en fonction de la température

Les mesures d'activité nitrogénase et nitrate réductase en fonction du stade phénologique de la plante peuvent servir à évaluer les potentialités relatives à l'utilisation de l'azote de l'air et de l'azote du sol (Pizelle et Thiery, 1977).

A 15°C, la fève croît normalement dans une terre riche en azote, bien que la fixation d'azote soit sensiblement affectée (Katto et Saiko, 1991).

Chez le soja, la réduction de NO_3^- au niveau des feuilles est maximale au stade végétatif jusqu'à la floraison, puis décroît rapidement pendant que la fixation de l'azote s'intensifie pour atteindre un maximum durant le remplissage des gousses (Touraine et Gojon, 1997).

L'ARA et l'ANR se succèdent dans le temps et elles sont toutes les deux nécessaires pour obtenir un rendement maximum (Obaton, 1982 ; Jefing et al., 1992). 6-Effet de la température sur la nodulation

On remarque d'après la figure n°11 que le nombre de nodules ne semble pas être

très affecté par les différentes températures car la durée du stress n'est pas très prolongée alors que l'optimum de l'ARA se situe aux environs de 25°C. Par contre, les faibles et les fortes températures affectent sévèrement cette activité. En effet, on a une diminution de la courbe à 2°C, 5°C et 10°C suite à l'inactivation de la nitrogénase et à sa dénaturation à 30°C et 35°C pour les trois stades phénologiques déjà confirmés par plusieurs travaux de (Chamber et Iruthayathas, 1988 ; Jefing et *al.*, 1992 ; Huhgria et *al.*, 1993).

7-Evolution du nombre de nodules et de l'ARA:

La figure n°12 représente l'évolution du nombre de nodules et de la fixation symbiotique de l'azote en fonction des températures aux trois stades phénologiques.

On remarque qu'au sein du même stade et pour les différentes températures, le nombre de nodules ne semble pas être très affecté par les différentes températures; ceci est peut être dû à la durée du stress qui n'est pas assez prolongée pour provoquer des modifications apparentes dans le nombre de nodules.

Selon Dommergues et Mangenot(1970), Mylona (1995), Serraj et *al* (2001), Il ne s'agit pas d'une inhibition directe de la croissance du nodule, mais probablement d'une inhibition du fonctionnement du complexe enzymatique (nitrogénase) impliqué dans la fixation à différentes températures.

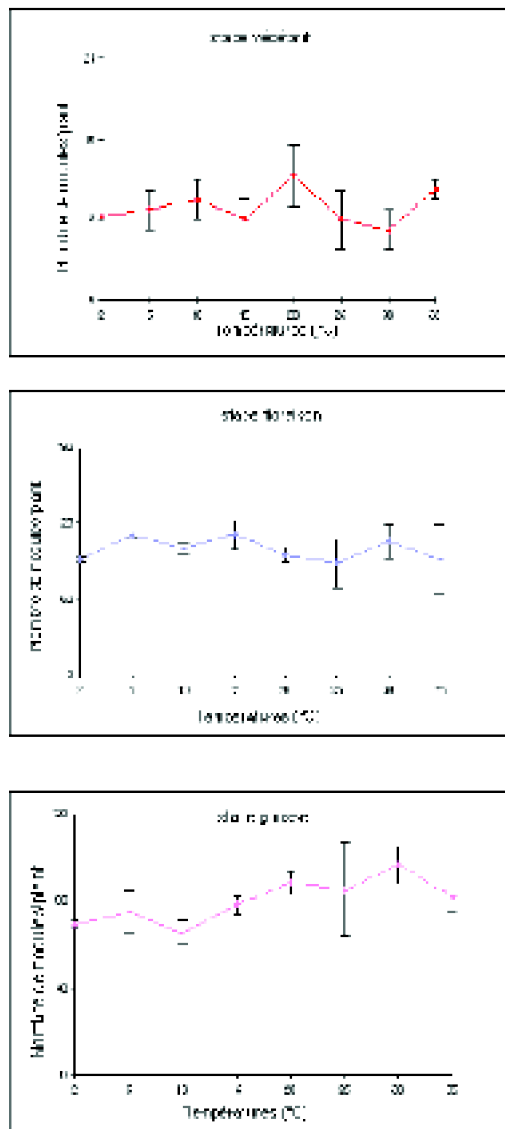


Figure n°11 : Evolution du nombre de nodules en fonction des températures

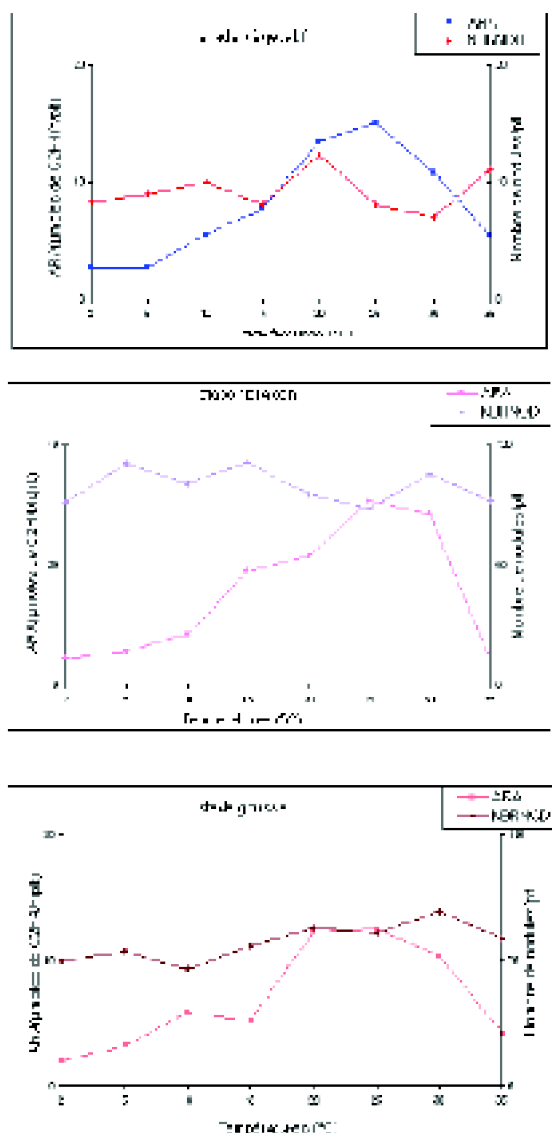


Figure n° 12 : Evolution du nombre de nodules et de l'ARA en fonction de la température

Arayangkoonet *al* (1990) et Dart et Mercer (2002) affirment qu'il y a une réduction dans la teneur des nodules en lég'hémoglobine chez *Vigna sinensis* lorsque la température dépasse 36°C ou descend au-dessous de 21°C.

Selon Lipsman et Lindstrom (1986), chez le trèfle, les plants répondent à des températures basses en produisant peu de nodules mais de taille plus grande. Cette augmentation du tissu nodulaire à basses températures serait une forme de compensation contre une activité fixatrice d'azote faible par unité de tissu.

Les travaux de Kuzma et Layzell (1994), chez le soja, montrent que le poids et le nombre de nodules augmentent à partir de 10°C et jusqu'à 30°C.

8-Effet de la température sur la teneur en proline des

feuilles:

La figure n°13 représente la teneur en proline accumulée pendant les différents traitements. L'analyse statistique fait ressortir des différences significatives pour les stades végétatif et floraison et des différences non significatives pour le stade gousse.

Au stade végétatif, l'accumulation est plus importante à 2°C par rapport au témoin, alors qu'il n'y a pas de différences importantes pour les autres traitements. Quant au stade floraison, l'accumulation est plus forte à 5°C alors qu'elle est pratiquement similaire aux autres températures. Au stade gousse, il n'y a pas de différences entre les traitements pour la production de la proline.

La quantité de proline augmente d'autant plus vite que la température est faible (Mazliak, 1981). La proline peut remplir le rôle d'osmo-protecteur, comme l'ont signalé Terbea et al (1995) dans leur étude sur des géotypes hybrides de maïs où ils ont mis en évidence une relation directe entre le contenu en proline et la stabilité membranaire des cellules. En effet, la proline maintient la complète hydratation des enzymes et des protéines membranaires par interaction avec les phospholipides pendant le froid (Herzog, 1989). Sanchez et al (2001), Belkhodja (2002), Calu (2006) affirment qu'il y a une rigidification des phospholipides membranaires qui protégeraient les cellules de la plante contre la rupture, la nécrose et la mort des cellules.

La quantité de proline accumulée est plus importante à 10/5°C par rapport à 20/15°C jour et nuit pendant 4 jours chez les espèces *Médicago polymorpha*, *M. Trancatula*, *M. rugosa* et *M. sutellata* (Sanchez-Diaz et al., 2004).

Withers et King (1979) ont démontré que le refroidissement d'une section de tige de tournesol arrêta temporairement la translocation de la proline pendant 10 à 15 minutes en augmentant ainsi

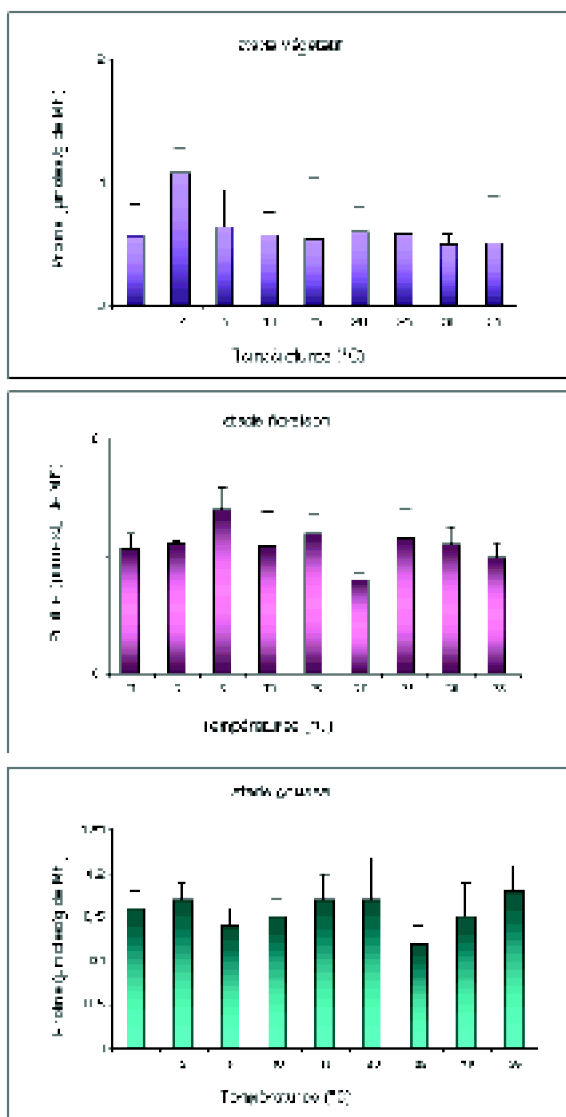


Figure n° 13 : Effet de la température sur l'accumulation de la proline

sa teneur au niveau des feuilles. De même, Segata(1970), a démontré que la proline augmente au niveau des feuilles du maïs à grain à 6°C et que sa translocation est moindre à cette température. En effet, d'après Bohnert et al (1995), des cellules de *Medicago sativa* mises en suspension à 2°C durant 48h accumulent plus de proline par rapport à celles maintenues à 21°C. Rashmi et Agarwal (1998), ont observé aussi une diminution de sa translocation à partir des feuilles vers le collet et les racines chez le riz à 7°C.

Une fois le stress terminé, la croissance reprend à nouveau, utilisant la proline comme source d'azote(Kuzma et Layzell, 1994 ; Dionne et al., 2001).

9- Effet de la température sur la croissance

bactérienne:

Evaluer la thermotolérance d'une souche bactérienne revient à suivre sa croissance par la lecture de la densité optique (DO) en fonction du temps pour trois températures 18°C, 28°C et 37°C (figure n° 14).

Juste après l'ensemencement de la bactérie dans le milieu et après la phase de latence, on assiste au démarrage de la croissance proprement dite ou exponentielle qui commence lentement puis augmente rapidement. La DO atteint un maximum de 1,59 à 28°C. Cette croissance est estimée par le calcul du temps de génération qui est de 1h.84mn; ce qui est en accord avec les données de la littérature où le temps de génération est inférieur à 3h chez *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* et les autres espèces à croissance rapide (Vincent, 1970 ; Berraho, 1984).

Le déclin correspond à l'arrêt de leur multiplication suite à la disparition de un ou de plusieurs composés nécessaires à leur croissance et à l'accumulation de produits inhibiteurs résultants du métabolisme microbien (Vincent, 1970 ; Maâtallah et *al.*, 2002).

A 18°C, on remarque que la courbe monte très lentement et progressivement suite aux faibles températures; la DO passe de 0.288 à 0.763 après 36h. La souche se multiplie pendant les premières heures ensuite les divisions diminuent, la croissance reste lente et stable en fonction du temps.

A 37°C, la phase de latence est immédiatement suivie par une phase exponentielle rapide. La densité optique passe de 0.062 à 1.046 après 14h correspondant à une croissance forte de la souche. La DO diminue et se stabilise à un certain niveau et dure plusieurs heures. Cette stabilité pourrait être due à la mortalité des bactéries à cette température (Munévar, 1981).

A 18° C, on remarque que la courbe monte très lentement et progressivement suite aux faibles températures ; la DO passe de 0.288 à 0.763 après 36h. La souche se multiplie pendant les premières heures ensuite les divisions diminuent, la croissance reste lente et stable en fonction du temps.

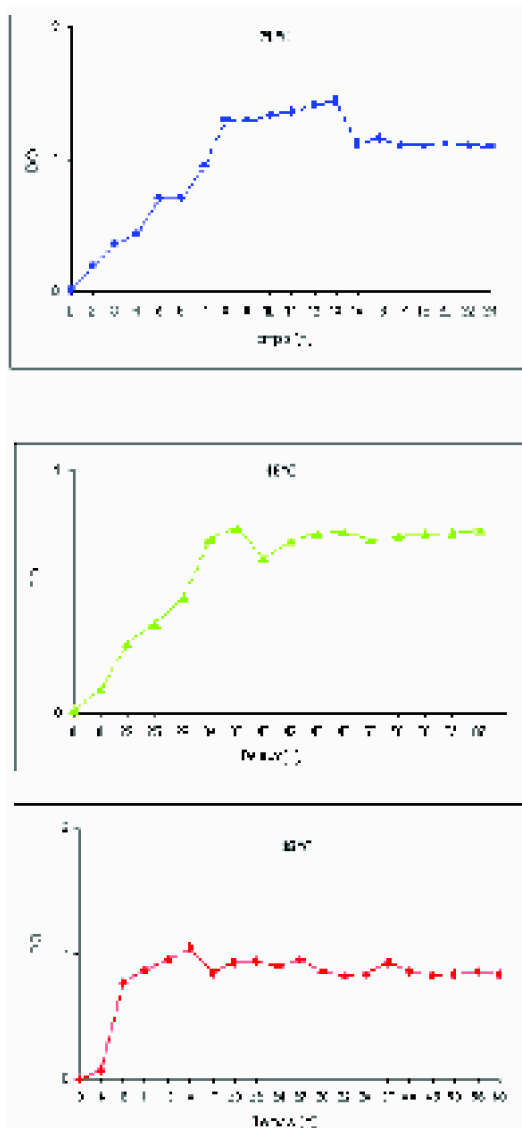


Figure n° 14 : Evolution de la densité optique du milieu en fonction du temps

D'après Prescott et al (2003), le métabolisme d'une bactérie devient actif à température élevée et de ce fait elle se divise plus vite. Mais au-delà d'un certain temps cette température deviendra létale. Alors qu'à basse température les enzymes travaillent lentement et la bactérie ne se divise pas rapidement.

En général, la croissance de la souche s'accompagne par une production de polysaccharides excrétés dans le milieu extérieur. Le niveau de production de ces EPS varie durant la croissance de la souche. En effet, il est initialement faible durant la phase de latence et en début de phase exponentielle puis devient important en fin de la phase exponentielle et en phase finale pour les trois températures.

On remarque aussi que la DO est plus importante à 37°C par rapport à 18°C. D'après Vincent (1970), Duhoux et Nicole (2004), cette importance serait probablement due aux températures élevées qui pourraient activer la multiplication des bactéries au départ et la production des EPS vers la fin de la croissance qui protégeraient la souche contre les

contraintes physiques (dessiccation, chaleur...)

La figure n° 15 montre le nombre de bactéries en fonction du temps d'incubation pour les trois températures.

A 28°C, le nombre de bactéries augmente d'une façon croissante et progressive. En effet, il atteint son maximum après seulement 13h de temps; pour ensuite décroître entre 13 et 20h.

A 18°C, le nombre de cellules augmente progressivement pour atteindre son maximum après 22h, suivi par une chute entre 22 et 48h. Ceci pourrait être dû essentiellement à l'effet des basses températures sur la multiplication des bactéries.

A 37°C, le nombre de bactéries augmente entre 8 et 18h, il est cependant réduit entre 18h et 36h. Ce qui pourrait être dû à la mortalité des cellules à forte température.

Le déclin des courbes s'explique par la réduction du nombre de ces cellules et de leur multiplication ainsi qu'à l'épuisement ou à l'altération des caractéristiques physico-chimiques du milieu qui ne sont pas renouvelés car l'apparition de la biomasse s'accompagne de la disparition du substrat (Pintopatriarca et *al.*, 2002). Les résultats obtenus indiquent que notre souche croît difficilement à 18°C et 37°C et que sa croissance est optimale à 28°C.

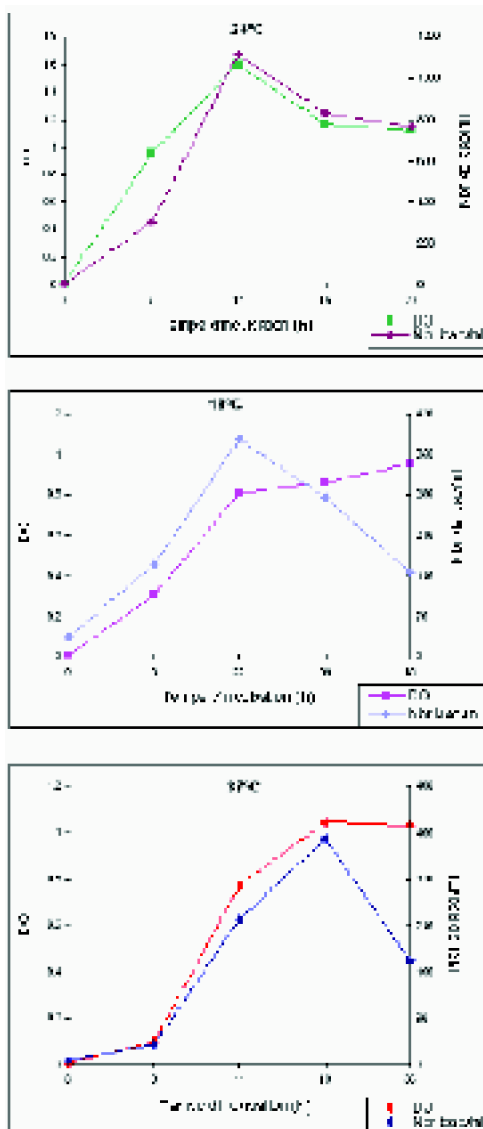


Figure n°15 : Evolution de la DO et du nombre de bactéries en fonction du temps

La plupart des *Rhizobia* s'accommode à une température de croissance située entre 28 et 31°C; Il semble même que beaucoup d'entre elles ne peuvent se développer à 37°C (Pelmont, 1995). Toutefois, *Mesorhizobium plurifarium* et *Sinorhizobium arboris* ont montré que la température maximale de croissance sur milieu YEM peut aller jusqu'à 43°C avec une grande variabilité de la thermotolérance entre les espèces et les souches étudiées (Graham, 1990)

Conclusion:

Les différents paramètres étudiés chez la féverole *Vicia faba minor* sont affectés par les contraintes thermiques. Les résultats obtenus nous permettent de tirer les conclusions suivantes :

L'effet du stress thermique sur la nutrition azotée se manifeste par une diminution des activités enzymatiques impliquées dans ce métabolisme. La température a un effet remarquable sur l'assimilation de l'azote minéral, car les faibles températures conservent la nitrate réductase durant la phase obscure et les fortes températures dénaturent l'enzyme et diminuent ainsi son activité.

L'activité réductrice d'acétylène s'est montrée très sensible aux contraintes thermiques et cela suite à un faible fonctionnement de la nitrogénase aux basses températures et à sa dénaturation aux fortes températures; cette sensibilité est importante pour les trois stades phénologiques. Les températures moyennes de l'ordre de 25°C favorisent cette activité et cela pour tous les stades phénologiques étudiés.

La comparaison des deux activités ARA et ANR au cours des trois stades phénologiques laisse entrevoir une interaction entre le fonctionnement de ces enzymes qui participeraient à un équilibre de la nutrition azotée en réponse au stress thermique. En effet, nos résultats montrent un phénomène de complémentarité ou de compensation des deux voies de la nutrition azotée en réaction aux variations de la température. Il semble que la féverole réagisse en équilibrant le fonctionnement des deux voies métaboliques : quand l'assimilation est fortement déprimée la fixation compense cette perte pour assurer dans une certaine mesure la fourniture de l'azote à la plante.

En Algérie, souvent l'assimilation ne peut pas compenser la baisse de la fixation, soit parce que le sol est pauvre en nitrate, soit parce que la plante ne peut pas en absorber et en réduire suffisamment. Toutefois, il serait intéressant d'améliorer le fonctionnement de cette enzyme soit par des apports d'azote ce qui est coûteux, soit par la sélection de variétés ayant une bonne activité nitrate réductase sous contraintes thermiques.

Nos résultats montrent également que l'action de la température sur l'ANR est corrélée négativement à la teneur en nitrates des feuilles. En effet, à basses températures la teneur en nitrates au niveau des feuilles reste faible ceci pourrait être expliqué soit par un mauvais fonctionnement de la nitrate

réductase azotée et/ou à une faible accessibilité du nitrate au site de réductions de cette enzyme. A fortes températures, l'accumulation des nitrates est attribuée selon plusieurs auteurs à la baisse de l'ANR suite à la dénaturation de la nitrate réductase.

La souche utilisée s'est révélée relativement sensible à 18°C et 37°C ; ce qui explique la difficulté de conférer à la fève une bonne fixation d'azote à faibles et aux fortes températures et peut être une couverture partielle de ces besoins en azote au moment où la fixation prend place.

L'effet du stress thermique sur l'accumulation de la proline se traduit par une augmentation de sa concentration au niveau des feuilles à 2 et à 5°C au stade végétatif et floraison. Cette accumulation pourrait toutefois être suffisante/nécessaire pour jouer un rôle d'osmo-protéctant. L'évaluation de la capacité d'une plante à accumuler de la proline pourrait constituer une voie intéressante dans la recherche de gènes de résistance au stress thermique. Cette étude a pour conséquence de considérer l'accumulation de la proline dans les tissus comme un signe d'adaptation et de tolérance au stress thermique chez la fève.

Au terme de ce travail, nous avons mis en évidence l'intérêt et le rôle essentiel de la température sur la régulation de la nutrition azotée. En effet, la fève peut assurer son alimentation azotée par l'assimilation des nitrates du sol pendant la saison froide et par la fixation de l'azote atmosphérique au printemps.

L'objectif étant de favoriser au mieux la fixation symbiotique de l'azote sous contrainte thermique afin de réduire l'utilisation des engrais azotés. Cet objectif ne peut être atteint que par la recherche de couples variétés-souches capables de bien fonctionner dans les milieux où les contraintes thermiques constituent un facteur limitant de la culture de la fève.

Références bibliographiques

- Abdellaoui A., Larhrmin A., Talouizte A., 1999**, Accumulation, Absorption et Assimilation des nitrates chez différentes variétés de blé tendre marocain : influence de la lumière. *Can.J.Bot.* 77(10) : 1485-1489p.
- Alofe C.O., Scharader L.E., Smith R.R., 1973**, Influence of high day and variable night temperatures on nitrate reductase activity of young corn (*Zea mays* L.) plants. *Crop Sci.* 13 : 625-629p. *Annals of botany.* 57 : 345-352p.
- Aouani M.E., Mhamdi R., Jebara M., Amarger N., 2001**, Characterization of *Rhizobia* nodulating chickpea in Tunisia. *Agronomie.* 21 :577-581p.
- Aranjuelo I., Irigo J.J., Sanchez-Diaz M., 2004**, Effect of increased temperature and drought associated to climate change on productivity of nodulated alfalfa. [http://ressources. Ciheam](http://ressources.Ciheam).
- Arayangkoon T., Schomberg H., Weaver., 1990**, Nodulation and nitrogen fixation of guar at high root temperature. *Plant soil.* 26 : 209-213p.
- Ardourel M., Demont N., Debelle F., Maillet F., De Billy F., Promé J., Dénarié J., Truchet G., 1994**, *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors : different structural requirements for bacterial entry into target cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant cell.* 6 : 1357-1374p.
- Arrese-Igor C., Gordon A.J., Michin F.R., Denison R.F., 1998**, Nitrate entry and nitrite formation in the infected region of soybean nodules. *J.Exp.Bot.* 49 : 41-48p.

- Aslam A., Travis R.L., Rains D.W., 2002**, Diurnal fluctuations of nitrate uptake and in vivo nitrate reductase activity in Pima and Cotton. *Crop Science*. 41:372-378p.
- Balandreau J., Dommergues Y., 1971**, Mesure in-situ de l'activité nitrogénase. *C.R. Acad.Sci. Paris*, 273 : 2020-2023p.
- Bazzigalupi O., Deroche M.E., Lescure J.C., Bachelier C., Tardif S., 1992**, Activité nitrate réductase in vitro de jeunes plantules de blé (*Triticum aestivum* L.) cultivées dans les conditions de détermination de la faculté germinative et après amélioration de la nutrition et de l'éclaircissement. *Agronomie*. 12 : 711-721p.
- Beck D.P., Wery M., Saxena M.C., Ayadi A., 1991**, Dinitrogen fixation and nitrogen balance in cool-season food legumes. *Agronomie.J.* 83 : 334-340.
- Begun A., Leibovith S., Migner P., Zhang F., 2005**, Specific flavonoides induced nod gene expression and pré-activated nod gene of *rhizobium leguminosarum* increased pea (*pisium sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *J.Exp.Bot.* 52 (360): 1537-1543p.
- Belkhodja M., 2002**, Comportement métabolique de génotypes de fèves (*Vicia faba* L.) sous stress salin in : Séminaire national sur les légumineuses alimentaires. Hammam Bouhadjar du 10 au 12 mai 1998.Dec 2002.
- Benlaribi M., Zérafa R., Merghem R., 2005**, Peut-on considérer l'accumulation de la proline comme signe de tolérance au déficit hydrique§. Actes du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales. Dec. INA. Alger.
- Berraho E., 1984**, Etude des souches de *Rhizobium* du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) isolées de plusieurs types de sol du Maroc. Diplôme de Docteur de 3^{ème} cycle écologie microbienne. Rabat.
- Berges J.A., Varelo D.E., Harrison P.J., 2002**, Effect of temperature on growth rate cell composition and nitogen metabolism in *Thalassiona pseudonana*. *Ecology*.225: 9-13p.
- Blondeau R., 1980**, Fixation de l'azote atmosphérique. Vuibert Ed. Paris, 103p.
- Bohnert H., Nelson D.E., Jensen R.G., 1995**, Adaptation to environmental stresses. *Plant cell*. 7 : 1099-1111p.
- Boote K.J., Minguez M.I., Sau F., 2002**, Adapting the cropgro legume model to stimulate growth of Faba bean. *Agronomie*. 94 : 743-756p.
- Bordeleau L., Prevost D., 1994**, Nodulation and nitrogen fixation in extreme environment. *Plant Soil*. 161 : 115-125p.
- Borochoy A., Walker M.A., Pauls P.K., 1989**, Effects of acclimatation on the morphological and physiological properties of alfalfa (*Medicago sativa*) suspension cultures cells. *J.Plant.Physio*.133 : 671-677p.
- Bouthier A., Gaillard B., Bonnifert J.P., 2004**, Perspectives Agricoles. N° 301 : 86-90p.
- Browse J., Xin Z., 2001**, Temperature sensing and cold acclimation. *Plant. Biol.* 4(3) : 241-247p.
- Bryan J.A., Berlyn G.P., Gordan J.C., 1996**, Towards a new concept of the evolution of symbiotic nitrogen fixation in the leguminosae. *Plant soil*. 186 : 151-159p.

-
- Bush D.R., 1993**, Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. *Annual.rev.plant.physio.* 44 : 513-542p.
- Bussi C., Habib R., Salsac L., 1989**, Mesure in-vivo et in situ de l'activité nitrate réductase chez le pêcher (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Agronomie.* 9 : 409-414 p.
- Calu G., 2006**, *Arabidopsis thaliana* et *Thellungiella halophila*, plantes modèles dans l'étude du stress salin. Spectosciences.
- Carrouée B., 2005**, Redynamisons la culture des protéagineuses. pleinchamp.com.
- Chainsompongpan N., Li P.H., Davis D.W., Markhar A.H., 1990**, Photosynthetic responses to heat stress in common bean genotypes differing in heat acclimation potential. *Crop.sci.* 30 : 100-104p.
- Chamber M.A., Iruthayathas E.E., 1988**, Nodulation and nitrogen by fast-and slow-growing *rhizobia* strains of soybean on several temperate and tropical legumes. *Plant and soil.* 112 : 239-245p.
- Cloutier J., Prévost D., Nadeau P., Antoun H., 1992**, Heat and shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia. *Appl. Envir. Microbio.* 58 : 2846-2853p.
- Conjon A., Bussi C., Salsac L., 1992**, Distribution of NO_3^- reduction between roots and shoots of peach tree seedlings as affected by NO_3^- uptake rate. *Plant Physio.* 82 : 505-512.
- Cook D.R., Vandernbosch K., Bruijn F.J., Huget T., 1997**, Model legumes get the nod. *Plant.cell.* 9 : 275-281p.
- Cornillon P., 1984**, Influence de la température des racines sur la croissance des jeunes plants d'aubergine (*Solanum melongena* L.) et de piment (*Capsicum annuum* L.). *Agronomie.* 4(6) : 543-548p.
- D'Haese W., Holsters M., 2002**, Nod factors structures, responses and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology:* vol 12, n°6.
- Dart P.J., Mercer F.V., 2002**, The effect of growth temperature, level of ammonium nitrate, and light intensity on the growth and nodulation of cowpea (*Vigna sinensis* endl.ex hassk.). *Australian. J. agricultural research:*16(3). 621-345p.
- Davidson I.A., Robson M.J., Drennan A., 1986**, Effect of temperature and nitrogen supply on the growth of perennial Ryegrass and white clover. Carbon and nitrogen economies of mixed swards at low temperature. *Annals of botany.* 57 : 697-708p.
- Deane-Drumond C.E., Clarkson D.T., Johnson C.B., 1980**, The effects of differential root and shoot temperature on the nitrate reductase activity assayed in vivo and in vitro. *Planta.* 148 : 455-461p.
- Delauney A.J., Verma D.P.S., 1993**, Proline biosynthesis and osmoregulation in plant. *Plant.J.* 4. 215-223p.
- Delhon P., Gojon A., Tillard P., Passama L., 1995**, Diurnal regulation of NO_3^- uptake in Soybean plants, change in NO_3^- influx, exflux, and nitrogen utilization in the plant during the day/night cycle. *J.Exp.Bot.* 46 : 1585-1594p.
- Dénarié J., Joly P.B., 1994**, La fixation de l'azote II. Les enjeux de la recherche. *Biofutur.* 133 : 30-34p.
-

- Dénarié J., Truchet G., 1979**, La symbiose *Rhizobium* légumineuses : Rôles respectifs des partenaires. *Physio.Vég.* 17(3) : 643-667p.
- Dénarié J., Debelle F., Rosenberg H., 1992**, Signaling and host range variation in nodulation. *Ann.Rev.Microbiol.* 46 : 497-531p.
- Derieux M., Bourdu R., Duburcq J.B., Boizard H., 1989**, La crise de croissance de la plantule de maïs à basse température. *Agronomie.* 9 : 207-212p.
- Desperrier N., Baccou J., Sauvaire Y., 1985**, Influence de la teneur en nitrate sur l'évolution des activités nitrate réductase et nitrogénase du fénugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Agronomie.* 5(6) : 539-547p.
- Dionne J., Castonguay Y., Nadeau P., Desjardins Y., 2001**, Amino acid and protein changes during cold acclimation of green-Type Annual blue grass (*Poa annua* L.). *Crop Science.* 41: 1862-1870 p.
- Dommergues Y., Mangenot F., 1970**, Ecologie microbienne. (Masson Eds). Paris. 796p.
- Drouin P., Prevost D., Antoun H., 2003**, Physiological adaptation to low temperatures of strains of *Rhizobium Leguminosarum* bv.viciae associated with *Lathyrus*. *Microbiol.Ecol.* 32(2): 111-120p.
- Duhoux E et Nicole M., 2004**, Associations et interactions chez les plantes. *Biologie Vég. ATLAS.*
- Ehrhardt D.W., Wais R., Long S.R., 1996**, Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cells.* 8 : 673-681p.
- Evans J., Wallace C., Dobrowolski N., 1993**, Interaction of soil type temperature on the survival of *rhizobium* bv viciae. *Soil biol. Biochem.* 25 : 1153-1160 p.
- Fan X.H., Tang C., Rengel Z., 2005**, Nitrate uptake, nitrate reductase distribution and their relation to proton release in five nodulated grain legumes. *Annals of Botany* .90 : 315-323p.
- Fisher R.F., Long S.R., 1992**, *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature*, 357 : 655-660p.
- Freiberg C., Fellay A., Bairoch W.J., Broughton A., Rosenthal A., Pereet X., 1997**, Molecular basis of symbiosis between *rhizobium* and legumes. *Nature.* 387 : 394-401p.
- Frossard J.S., Friaud J.F., 1989**, Root temperature and short term accumulation of carbohydrates in two different structural requirements for bacterial entry into target cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant cell.* 6 : 1357-1374p.
- Georgieva K., Lichtenthaler H.K., 1999**, Photosynthetic activity and acclimation ability of pea plants to low and high temperature treatment as studied by means of chlorophyll fluorescence. *J.Plant.Physio.* 155 : 416-423p.
- Gerbuad A., 1995**, Effets à court terme de manipulations de la photosynthèse sur l'activité nitrogénase (ARA) des nodosités de Soja. In : Facteurs limitant la fixation symbiotique de l'azote dans le bassin méditerranéen. Montpellier (France). Ed. INRA, Paris. (Les colloques, n°77).
- Geurts R., Franssen H., 1996**, Signal transduction in *Rhizobium*-induced nodule

- formation. *Plant.Physio.*112 : 447-453p.
- Gladiem H., Duhoux E., 1985**, Fixation de l'azote et l'agriculture tropicale. *La recherche.*16.
- Gleeson D., Lelu-Walter M.A., Parkinson M., 2004**, Influence of exogenous L-proline on embryogenic cultures of larch (*Larix Leptoeuropaea Dengler.*), sitka spruce (*Picea sitchensis* (bong.) carr.) and oak (*Quercus robur* L.) subjected to cold and salt stress. *Ann.For.Sci.* 61: 125-128p.
- Gojon A., Bussi C., Grignon C., Salssac A., 1991**, Distribution of NO_3^- reduction between roots and shoots of peach-tree seedling as affected by NO_3^- uptake rate. *Plant.Physio.* 82 : 505-512p.
- Graham P.H., 1990**, Competitive ability and efficiency in nodule formation of strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl.Evr.Mic.*56(10): 3035-3039p.
- Guasch L.M., Deflape M.R., Fernandez-Pascual M., 2001**, Effects of different O_2 concentrations on nitrogénase activity, respiration, and O_2 diffusion résistance in *Lupinus albus* L.cv. *Multolupa* nodules. *Plant.Physio.* 158: 1395-1402p.
- Haghuwanshi A., 1994**, Effect of temperature on flavonoid production in pigeonpea (*cajanus cajan*.L) in relation to nodulation. *Biol.Fert.Soil.* 17 : 314-316p.
- Hallark W.B., Huffarker., 1978**, Influence of ambient nitrate, temperature and light on nitrate assimilation in sudangrass seedling. *Physio.Plant.* 44 : 147-152
- Harding S.A., Guikema J.A., Paulsen G.M., 1990**, Photosynthetic decline from high temperature stress during maturation of wheat. Interaction with senescence process. *Plant. Physio.* 92 : 648-653p.
- Harding S.C., Sheehy J.E., 1980**, Influence of shoot and root temperatures on leaf growth, photosynthesis and nitrogen fixation of Lucerne. *Annals of botany.* 45 : 229-233p.
- Havaux M., Lannoye R., 1982**, Changements biochimiques observés pendant l'adaptation au froid de l'orge. *Agronomie.* 2(10) : 923-930p.
- Havaux M., Lannoye R., 1985**, Effets des basses températures positives sur les réactions photochimiques primaires de la photosynthèse du maïs (*Zea mays* L., CV : «LG 9». *Agronomie.* 5(4) : 331-337p.
- Heller R., 1989**, Physiologie végétale. Tome II: Nutrition. Ed. Masson, Paris, 240p.
- Herzog H., 1989**, Influence of pre-hardening duration and dehardening temperatures on varietal freezing resistance in faba beans (*Vicia faba* L.). *Agronomie.* 9 : 55-61p.
- Hirel B., Marsolier W., Verma D., 1992**, Forcing expression of a soybean root glutamine synthetase gene in tabaco laeves induces a native gene encoding enzyme. *Plant.Mol.Biol.* 20 : 207-218p.
- Huhgria M., Franca A., Sprent J., 1993**, New sources of high temperature tolerant rhizobia for (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and soil.* 149 : 103-109p.
- Hungria M., Franco A.A., 1993**, Effects of high temperatures on nodulation and nitrogen fixation in (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and soil.* 149 : 95-102p.
- Imsande J., Touraine B., 1994**, N-demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant.physio.*105 : 3-7p.

ITGC 2003., Statistiques agricoles, serie B.

Jefing Y., Herridge D.F., Peoples M.B., Rerkasem B., 1992, Effects of nitrogen fixation and nitrogen balance of soybean grown after low land rice. *Plant and soil*. 147: 235-242p.

Jiang Z., Sullivan W.M., Hull R.J., 2001, Nitrate uptake and metabolism in Kentucky bluegrass as affected by nitrate levels. *Research. J.* 9.

Karanja N.K., Wood M., 1988, Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L) in Kenya : Tolerance of high temperatures and antibiotic resistance. *Plant and soil*. 112 : 15-22p.

Katto T., Saiko M., 1991, Effects of chilling temperature and low irradiation on nitrogen uptake and assimilation by soybean plant. *Tohoku Agric. Res.* 45 : 137-128p.

Kazoko Y.S., Kazuo S., 1994, A novel cis-acting element in a *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature or high salt stress. *Plant cell*. 6 : 251-264p.

Kevin P., Connell O., Gustafson A.M., Lehnamm M.D., Thomashow M.F., 2000, Identification of cold shock gene loci in *Sinorhizobium meliloti* by using a lux AB reporter transposon. *App. Envir. Microb.* 66(1): 401-105p.

Kijne J.W., Bauchrowitz M.A., Diaz C.L., 1997, Root lectins and *Rhizobia*. *Plant physio.* 115: 869-873p.

Kishinevsky B.D., Sen D., Weaver R.W., 1992, Effect of high root temperature on *Bradyrhizobium* peanut symbiosis. *Plant soil*. 143 : 275-282p.

Kuzma M.M., Layzell D.B., 1994, Acclimation of soybean nodules to changes in temperature. *Plant. Physio.* 106 : 263-270p.

Leena A., 2002, Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between *rhizobia* and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis*. University of Helsinki. Finland.

Levitt J., 1989, La crise de croissance de la plantule de Maïs à basse température. *Agronomie.* 9 : 207-212p.

Lipsman P., Lindstrom K., 1986, Adaptation of red clover *Rhizobia* to low temperatures. *Plant Soil.* 92 : 55-62p.

Loque D., 2003, Gene expression of the nitrate reductase is repressed in *Arabidopsis* roots. *Plant. Physio* : 132-958p.

Lynch D.H., Smith D.L., 1993, Soybean (*Glycine max*) nodulation and nitrogen fixation as affected by exposure to low root-zone temperature. *Physio. Plant.* 88 : 212-220p.

Maatoughui M.E.H., 1996, Situations des fèves en Algérie et Perspectives de relance. *Céréaliculture.* n°29 : 6-14p.

Maâtallah j., Berraho E., Sanjuan J., Lluch C., 2002, Phenotypic characterization of *rhizobium* from Chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie.* 22:321-329p.

Macduff J.H., 1986, Effects of root temperature and from of nitrogen nutrition on nitrate reductase activity in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Annals of botany.* 57 : 345-352p.

- Makarova LE., Latysheva SE., Ekimova EG., 2003**, The involvement of endogenous phenolic compounds in the response of pea (*Pisum sativum* L.) seedling roots to inoculation with *Rhizobium leguminosarum* bv *viceae* at various temperature. *Russ. J.Plant Physio.* vol :50(2).261-264p.
- Mardowitch J., Richter C., Hoddinott J., 1986**, The influence of plant temperature on photosynthesis and translocation rates in bean and soybean .*Can.J.Bot.* 64 : 2337-2346p.
- Margiangela H., Avilio A.F., 1993**, Effect of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and soil.* 149 : 95-102p.
- Mario D., Junior L., Carlos C., 2005**, Effects of addition of flavonoids signals and environmental factors on nodulation and nodule development in the pea (*Pisum sativum*) with *Rhizobium leguminosarum* bv *viceae* symbiosis. *Aus.J.Soil.* 41(2) : 267-276p.
- Martensson A.M., Rydberg I., 1996**, Cultivars x *rhizobia* strains interactions in peas with respect to early symbiosis, nodule initiation and nitrogen uptake. *Plant Breeding.* 115 : 402-406p.
- Mazliak P., 1981**, Régulation à court terme et à long terme de l'activité des enzymes membranaires par la température. *Physio.Vég.* 19 (4) : 543-563p.
- Meyer CH., Hirel B., Morot-Gaudriy JF., Caboche M., 1993**, L'utilisation de l'azote par les plantes. *La Recherche.* 257, 24 : 956-962p.
- Michiels J., Verreth C., Vanderleyden J., 1998**, Effects of temperature stress on bean nodulating *rhizobium* strains. *App.Envr.Microb.* 60(4):1206-1212p.
- Mouhouche B., 1996**, Effet de l'intensité du stress hydrique sur les composantes du rendement de la culture de fève (*Vicia faba* L). *Céréaliculture.* 29 : 27-30p.
- Munchbach M., Nocker A., Narberhaus F., 1999**, Multiple small heat shock proteins in *rhizobia*. *Bacteriology.* 181(1): 83-90p.
- Munévar F., Wollum A., 1981**, Growth of *Rhizobium japonicum* Strains at Temperatures Above 27°C. *App.Microbio.* 42 (2): 272–276.
- Mylona P., Pawlowski K., Bisseling T., 1995**, Symbiotic nitrogen fixation. *Plant cell.* 7 :869-885p.
- Newcomb W., Creighton S., Latta L., 1981**, A reinvestigation of the origin of the peribacteroid membrane in root nodules of *Vicia faba*. *Can. J. Bot.* 59 : 1547-1552p.
- Ney B., 2001**, Grain legume seed filling in relation to nitrogen acquisition : A review and prospects with particular reference to pea. *Agronomie.* 21 : 539-552p.
- Norwich L., 1993**, Symbiose-légumineuse: Dialogue moléculaire. *La recherche.*24.
- Obaton M., Materon L., Zoklouta M., Gintzbutger G., 1996**, Effect of low temperature on the nitrogen nutrition of annual medics : preliminary results. CIHEM: le genre % Médicagos en Méditerranée série : *CIHEM.Option méditerranéenne.*
- Ounane SM., Bacha F., Irekti H., 2000**, Effet du stress thermique sur la nutrition azotée chez le pois chiche (*Cicer arietinum*). *Annales de L'Institut National Agronomique El- harrach.* Vol 21, n°1 et 2.
- Paquin R., 1977**, Effet des basses températures sur la résistance au gel de la luzerne

- Medicago medica* pers) et son contenu en proline libre. *Physio.Vég.* 15(4): 657-665p.
- Patriarca E.J., Tate R., Iaccarino M., 2002**, Key role of bacterial NH_4^+ metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Mol.Biol.* 66 :203-222p.
- Pecetti L., Carroni A.M., Pino E., 2004**, Cold tolerance of subterranean clover in a continental climate environment institute sperimentale per le colture foraggere, viale piacenza. *CIHEM. Option mediterraneenes.* 43-46p.
- Pelmont J., 1995**, Bactéries et environnement. Adaptations Physiologiques. Voll.Grenoble.
- Pereet X., 1997**, Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature.* 387 : 394-401p.
- Pilar F., 2004**, Influence of nitrate level on nitrate assimilation in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plant under saline stress. *Can.J.Bot.* 82(2) : 207p.
- Pintopatriarca P., Pass S., Raul D., Raposeiros R., 2002**, Variabilité des colonies d'isolement dans l'exposition de la nodulation aux contraintes chez le *Rhizobium* de l'haricot à hautes températures. *J.Bré.Microb* :33.2p.
- Pizelle G., Thiery G., 1977**, Variations saisonnières des activités nitrogénase et nitrate réductase de l'aune glutineux (*Alnus glutinosa* L.Gaertn). *Physio.Vég.* 15 (2) : 333-342p.
- Poustini K., Mabood F., Smith D., 2005**, Low root zone temperature effects on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* pré-incubated with methyljasmonate. *Plant.Soil.Sc.* 55(4) : 1p.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D., 2003**, Microbiologie. Ed. De boeck. Paris.
- Prevost D., Drouin P., Laberge S., Bertrand A., 2003**, Cold-adapted *Rhizobia* for nitrogen fixation in temperate region. *Can.J.Botany.* 81(12): 1153-1161p.
- Beulin X., 2006**, Le monde des protéagineux. *Prolea.* Avril. 2p.
- Rafael J., Garrido L.B., Bellido L.L., 2001**.- Effects of crop rotation and nitrogen fertilization on soil nitrate and wheat yield under rainfed mediterranean conditions. *Agronomie.* 21 : 509-516p.
- Rashmi P., Agarwal R.M., 1998**, Water stress induced changes in proline contents and nitrate reductase activity in Rice under light and dark conditions. *Physio.Mol.Biol.* 4: 53-57p.
- Rideout J.H., Chaillou S., Raper D., 1994**, Ammonium and nitrate uptake by soybean during recovery from nitrogen deprivation. *J.Exp.Bot.* 45 : 23-33p.
- Robin P., Conejero G., Tranchant J.P., Passama L., Salsac L., 1983**, Mesure de la réduction du nitrate dans les feuilles intactes. *Physio. Vég.* 21 : 123-128p.
- Robin P., Salsac L., 1987**, Interactions entre approches biochimiques et approches agronomiques de la nutrition azotée. In Nutrition azotée des légumineuses. Ed. INRA. Paris, (les colloques de l'INRA, n°37).
- Robin P., Blayac D., Salsac L., 1979**, Influence de l'alimentation nitrique sur la teneur en nitrate et l'activité nitrate réductase des racines et des feuilles de plants de Mais. *Physio.Vég.* 17(1) : 55-66p.
- Robin P., Conejero G., Passama L., Salsac L., 1983**, Evaluation de la fraction

- métabolisable du nitrate par la mesure *in situ* de sa réduction. *Physio. Vég.* 21(1) : 115-122p.
- Robin P., Gates G., Silsbury J.H., 1987**, Effect of temperature on growth and nitrogen fixation by swards of subterranean clover. *Annals of botany.* 59 : 461-469p.
- Roughley R.J., 1970**, The influence of root temperature, *Rhizobium* strain and host selection on the structure and nitrogen-fixing efficiency of the root nodules of *Trifolium subterraneum*. *Annals of Botany.* 34 :631-646p.
- Saadallah K., 2002**, Fixation de l'azote et consommation nodulaire de l'oxygène chez le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) sous contrainte saline. VIIIème journées scientifiques -AUF- Marrakech.
- Saadallah K., Drevon J.J., Abdelly C., 2001**, Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) sous contrainte saline. *Agronomie.* 21 : 627-634p.
- Sally C., Peltzer T., Lynette K., boot A., Craig A., 2001**, Effect of low root zone temperature on nodule initiation in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Aust.J.Agr.Rser.* 237(1) : 355-365p.
- Salon C., Munier-Jolain N., Duc G., Voisin A., Grandgirard D., Larmure A., Emery R., 2001**, Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association rhizobium-legumes. *Plant.Physio:* 49(2) 6P.
- Sanchez E., Lopez-Lefebvre LR., Garcia PC., Rivero RM., Ruiz JM., Romeo L., 2001**, Proline metabolism in response to highest nitrogen dosages in green beans plants (*Phaseolus Vulgaris* L.cv.Strike). *J.Plant.Physio.* 158 : 593-598p.
- Sanchez F., Hepler PK., 2000**, Ions changes in legume root hairs responding to nod factors. *Plant.Physio.*123: 443-451p.
- Sanchez-Diaz M., Hekneby M., Antolin M.C., 2004**, Cold tolerance of forage legumes growing in controlled continental mediterranean conditions. *CIHEAM.Option mediterraneennes.*
- Saravitz C.H., Chaillou S., Morot-Gaudry J.F., 1994**, Influence of nitrate on uptake of ammonium by nitrogen deprivation. *J. Exp. Bot.* 45 : 1575-1584p.
- Schrader S.M., Wise R.R., Wacholtz W.F., Ort D.R., Sharkey T.D., 2004**, High leaf temperature limits photosynthesis in Pima cotton. Thylakoid membrane responses to moderate heat stress. *Plant cell and env.* 27 :725-735p.
- Sekhon B.S., Kumar S., Dhillon K.S., Singh R., 1986**, Effect of nitrogen on nitrate reductase activity in the nodules and leaves of summer moong (*Vigna radiata*). *Annals of Botany.*58 : 515-521p.
- Serraj R., Vadez V., Sinclair T., 2001**, Feedback regulation of symbiotic nitrogen fixation under drought stress. *Agronomie.*21 : 621-626p.
- Shweitzer L.E., Harper J.E., 1980**, Effect of light, dark and temperature on root nodule activity of soybeans. *Plant.Physio.* 65 : 51-56p.
- Silveira J.A.G., Matos J.C.S., Cecatto V.M., Viegas R.A., Oliveira J.T.A., 2001**, Nitrate reductase activity, distribution, and response to nitrate in two contrasting *Phaseolus* species inoculated with *Rhizobium* sp. *Envir.Exp.Bot.* 46 : 37-46p.
- Soltani A., Hajji M., Grignon C., 1992**, Bilan des échanges ioniques en milieux $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ et coûts énergétiques de la croissance chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.).

Agronomie. 12 : 723-732p.

- Stohr C., 2001**, Regulation of growth, development and whole organism physiology; diurnal changes in nitrogen assimilation of tobacco roots. *J.Exp.Bot.* 52(359) : 1283p
- Sultan K., Gintzburger G., Obaton M., Robin C., Touchane H., Guckert A., 2001**, Growth and nitrogen fixation of annual *Medicago-Rhizobium* associations during winter in Mediterranean region. *Eurp.J.Agronomy*. 15 : 221-229p.
- Swensen J.B., Murray G.A., 1983**, Cold acclimation of field peas in a controlled environment. *Crop science*. 23 : 27-30p.
- Talwar H.S., Takeda H., Yashima S., Senboku T., 1999**, Growth and photosynthesis of groundnut genotypes to high temperature. *Crop science*. 39 : 460-466p.
- Terbea C.O., Cosmin O., Micut G.H., Pectu E., 1995**, Cell membrane stability, excised leaf water loss and free proline content as physiological trait for screening for drought resistance in maize. Congrès inter-drought, Montpellier sep 95. INRA, VI-18.
- Théberge M.C., Prévost D., Chalifour F.P., 1996**, The effect of different temperatures on fatty acid composition of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in the faba bean symbiosis. *New Phytologist* 134 : 657-664.
- Touraine B., Gojon A., 1997**, Intégration de l'absorption du nitrate dans la plante in : Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologiques, biochimiques et moléculaires. Ed. INRA.
- Triboi-Blondel A.M., 1986**, Influence de la température sur la mesure de l'activité nitrate réductase chez le colza et le tournesol. Répercussion sur l'estimation de l'azote minéral réduit dans des cultures de plein champ. *Inf.Tech.Cetio*. 97 : 3-11p.
- Trinchant J.C., Pladys D., 1985**, L'oxygène, facteur limitant de l'étape de fixation d'azote chez les nodosités des légumineuses. In : Nutrition azotée des légumineuses, Versailles, Ed. INRA, Paris, 1987, N°37.
- Truchet G., Prome J.C., Dénarie J., 1993**, Symbioses bactéries-légumineuses : un dialogue moléculaire. *La recherche*. 24 : 92-94p.
- Tuker D., 2004**, Low temperature induces expression of nitrate reductase that temporarily overrides circadian regulation of nitrate reductase activity in tomato. *Photosynthesis Research*: 74.1-9P.
- Turner S.L., Young P.W., 2000**, The glutamine synthetases of *Rhizobia*, phylogenetics and evolutionary implications. *Mol.Bil.Evol.* 17: 309-319p.
- Vasilieva G.G., Mironova N.V., Glyanko A.K., 2001**, The low above-zero temperature effect in the zone of roots on nitrate reductase activity in Pea organs in the processus of vegetating. *Turck.J.Bot.* 25:255-560p.
- Venekamp J.H., Koot J.T., 1988**, The sources of free proline and asparagine in field bean plants, *Vicia faba* L., during and after a short period of water with holding. *J.Plant.Physio.* 132 : 102-104p.
- Venekamp J.H., Lampe J.E.M., Koot J.T.M., 1989**, Organic acids as sources for drought-induced proline synthesis in field bean plants, (*Vicia faba* L). *Plant.Physio.* 133 : 654-659p.
- Vicent J.M., 1970**, Manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP. 164P.
- Vincenz M., Caboche M., 1997**, Regulation of nitrate and nitrite reductase expression

in *Nicotiana plum baginilifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. In : Assimilation de l'azote chez les plantes : Aspects physiologiques, biochimiques et moléculaires. Ed. INRA. France. Paris.

- Vlassak K.M., Vanderleyden J., 1997**, Factors influencing nodule occupancy by inoculant *Rhizobia*. *Plant. Sci.*16(2) : 163-229p.
- Warner R.L., Huffaker R.C., 1989**, Nitrate transport is independent of NADH and NAD(P)H nitrate reductases in barley seedlings. *Plant. Physio.* 91: 947-953.
- Wery J., 1987**, Relations entre la nutrition azotée et la production chez les légumineuses. In : Nutrition azotée des légumineuses, Versailles, Ed. Paris, N°37.
- Wery J., Slim S.N., Knight E.J., Malhotra R.S., Cousin R., 1994**, Screening techniques and sources of tolerance of extremes of moisture and air temperature in cool season food legumes. *Euphytica.* 73 : 73-83p.
- Wery J., Turc O., Salsac L., 1986**, Relationship between nitrogen fixation, nitrogen assimilation and growth in a legume. *Plant and Soil.* 96 : 17-29p.
- Withers L.A., King P.J., 1979**, Proline : a novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of (*Zea mays* L.). *Plant. Physio.* 64 : 675-678p.
- Young J.P.W., 1993**, Role of light and CO₂ fixation in the control of nitrate reductase activity in barley leaf. *Planta.* 190 : 277-283p.
- Zahrn H.H., 1999**, *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol and Molecular biology.* 63(4) : 968-989p.
- Zahrn H.H., 2001**, *Rhizobia* from wild legumes: diversity, Taxonomy of Biotechnology. Vol 91: 143-153p.
- Zakhia F., De Lajudie P., 2001**, Taxonomy of *Rhizobia*. *Agronomie.* 21 :569-576p.
- Zhang F., Smith D.L., 1994**, Effect of low root zone temperatures on the early stages of symbiosis establishment between soybean (*Glycine max* L.Merr.) and *Bradyrhizobium japonicum*. *J.Exp.Bot.* 45 : 1467-1473p.
- Zhang H., Harper R., Karsisto M., Lindstrom K., 1991**, Diversity of bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. *Int.J.Sys.Bac.*41(1):104-113p.
- Zhang H., Trevor C., Brian T., Driscoll I., Balakrishnan P., Smith D.L., 2002**, Low temperature-tolerant *Bradyrhizobium japonicum* strains allowing improved Soybean yield in short-season areas. *Agronomy.J.* 94 : 870-875p.

Annexes

Liste des abréviations

- **ARA** : Activité réductrice de l'acétylène
- **ARN** : Activité nitrate réductase
- **ATP** : Adénosine triphosphate
- **C.V %** : Coefficient de variation
- **Cd** : Cadmium
- **CM** : Carré moyen
- **CV** : Coefficient de variation
- **DDL** : Degré de liberté
- **DO** : Densité optique
- **E.T** : Ecart type
- **GOGAT** : Glutamine Oxyglutarate Aminotransférase (Glutamate synthase)
- **GDH** : Glutamine déshydrogénase
- **GS** : Glutamine synthétase

- **h** : Heure
- **H.S** : Hautement significatif
- **NIR** : Nitrite réductase
- **PF** : Poids frais
- **Plt** : Plant
- **Prob** : Probabilité
- **PS** : Poids sec
- **S** : Significatif
- **SCE** : Somme carré des écarts
- **T.H.S** : Très hautement significatif

ANNEXE A : PROTOCOLE DE DOSAGE DE LA PROLINE:

1- Extraction:

Peser les échantillons, environ 100mg de matière fraîche, pris à partir du tiers médian de la feuille, les mettre dans des tubes à essais. On ajoute 2ml du méthanol à 40%, les tubes sont ensuite mis au bain marie à 85°C Pendant 1h.

2- Préparation de la courbe étalon:

Préparation de la solution mère1:

Mettre 20mg de la proline dans une fiole jaugée à 100ml avec du méthanol à 40%.

Préparation de la solution mère 2 :

Prélever 10ml de la solution mère1 et les mettre dans une autre fiole jaugée (100 ml) ajuster à 100ml avec du méthanol 40%, la concentration en proline de la solution mère2 est donc de 20µg/ml.

-Prendre 10 fioles jaugées (10ml) numérotées de 1 à 10, et mettre respectivement de 1ml à 10ml de solution mère2 ml, et ajuster le reste avec du méthanol à 40%.

-Préparer 11 tubes de E_0 à E_{10} , ces tubes contiendront:

- E_0 : 1ml de méthanol à 40%: ce tube servira pour le zéro de la lecture des DO.
- E_1 : 1ml prélevé de la fiole n°1, soit 2 µg de proline.
- E_2 : 1ml prélevé de la fiole n 2, soit 4 µg de la proline.
- E_3 : 1ml prélève de la fiole n 3, soit 6 µg de le proline.
- E_4 : 1ml prélevé de la fiole n 4, soit 8 µg de la proline.
- E_5 : 1ml prélevé de la fiole n 5, soit 10 µg de la proline.

-
- E6 : 1ml prélevé de la fiole n 6, soit 12 µg de la proline.
 - E7 : 1ml prélevé de la fiole n 7, soit 14 µg de la proline.
 - E8 : 1ml prélevé de la fiole n 8, soit 16 µg de la proline.
 - E9 : 1ml prélevé de la fiole n 9, soit 18 µg de la proline.
 - E10 : 1ml prélevé de la fiole n10, soit 20 µg de la proline.

3- Préparation du réactif:

Dans une bouteille en verre opaque, préparer le mélange suivant:

SOLUTION A:

- 300ml d'acide acétique.
- 80ml d'acide ortho phosphorique D: 1,7.
- 120ml d'eau distillée.
- soit n : le nombre de tube à doser (extraits + étalon).

SOLUTION B:

- (n+4) 25 mg de ninhydrine
- (n+4) ml de la solution A
- (n+4) ml d'acide acétique.

4- Dosage:

- Prélever 1ml de l'extrait.
- Dans chaque tube (extrait +étalon) mettre 2ml de la solution B.
- Mettre au bain marie pendant 30mn à 100°C.
- Apparition de la couleur rose.
- Laisser refroidir.
- Ajouter 5ml de benzène dans chaque tube, apparition de deux phases:

1 - une phase aqueuse inférieure.

2 - une phase organique supérieure.

- Agitation.
- Pipeter la phase organique supérieure que l'on met dans des tubes propres contenant une petite spatule de Na_2SO_4 .
- Lecture de la DO à 528 nm.

5- Calculs:

Calculer l'équation de la droite de régression de la courbe étalon.

$$y = ax + b.$$

x : quantité de proline dans le tube (μg).

y : densité optique.

Calculer y: la quantité de proline de chaque échantillon (μg).

Concentration en proline ($\mu\text{M/g MF}$) =

$$\frac{y \cdot 2.1000 \cdot MF}{115,13}$$

MF : masse de matière fraîche.

Masse molaire de la proline = 115,13g.

ANALYSE DE LA VARIANCE:

Stade végétatif:

VARIANCES	SCE	DDL	CM	CV	SIGNIFICATION
VAR TEMP	34.35	7	4.91	25.8%	THS
VAR RESID	5.92	16	0.37		
VAR TOT	40.26	23	1.75		

ARN:

MOYENNES DES GROUPES HOMOGENES SELON LE TEST DE NEWMAN-KEULS SEUIL 5% :

ARA:

Traitements	Groupes homogènes
2	A
5	A
15	B
10	B
30	B
25	B
20	B
35	B

VARIANCES	SCE	DDL	CM	CV	SIGNIFICATION
VAR TEMP	400.27	7	67.75	15%	THS
VAR RESID	74.1	14	0.2		
VAR TOT	474.37	23	20.62		

ARA:

MOYENNES DES GROUPES HOMOGENES SELON LE TEST DE NEWMAN-KEULS SEUIL 5% :

La proline:

Traitements	Groupes homogènes
25	A
20	B
30	C
15	D
10	E
35	F
2	G
5	G

VARIANCES	SCE	DDL	CM	CV	SIGNIFICATION
VAR TEMP	0.27	7	0.04	20.7%	S
VAR RESID	0.25	16	0.02		
VAR TOT	0.52	23	0.02		

La proline:

Le nombre de nodules:

Traitements	Groupes homogènes
2	A
5	B
10	B
15	B
20	B
25	B
30	B
35	B

Réponse physiologique de la fève (Vicia faba minorL.) au stress thermique

VARIANCES	SCE	DDL	CM	CV	SIGNIFICATION
VAR TEMP	60.67	7	8.67	23.6%	S
VAR RESID	74.67	16	4.67		
VAR TOT	135.33	23	5.88		

Le nombre de nodules:

VARIANCES	SCE	DDL	CM	CV	SIGNIFICATION
VAR TEMP	427.92	7	61.13	9.0%	THS
VAR RESID	8.33	16	0.52		
VAR TOT	436.25	23	18.97		

Taux de nitrates:

MOYENNES DES GROUPES HOMOGENES SELON LE TEST DE NEWMAN-KEULS SEUIL 5% :

Traitements	Groupes homogènes
35	A
20	B
30	C
25	D
10	E
5	E
2	F
15	F

Stade floraison:

VARIANCES	SCE	DDL	CM	CV	SIGNIFICATION
VAR TEMP	2408.00	7	358.53	10%	THS
VAR RESID	101.70	16	0.00		
VAR TOT	2509.70	23	109.12		

ARA :

MOYENNES DES GROUPES HOMOGENES SELON LE TEST DE

NEWMAN-KEULS SEUIL 5% :

ARN :

Traitements	Groupes homogènes
25	A
30	B
20	C
15	D
10	E
5	F
2	G
35	H

VARIANCES	SCE	DDL	CM	CV	SIGNIFICATION
VAR TEMP	23.07	7	3.30	20.7%	THS
VAR RESID	4.06	16	0.25		
VAR TOT	27.13	23	1.18		

ARN :

MOYENNES DES GROUPES HOMOGENES SELON LE TEST DE NEWMAN-KEULS SEUIL 5% :

La proline :

Traitements	Groupes homogènes
10	A
2	A
5	A
15	AB
25	BC
30	C
35	C
20	C

VARIANCES	SCE	DDL	CM	CV	SIGNIFICATION
VAR TEMP	0.63	7	0.09	14.9%	HS
VAR RESID	0.44	16	0.03		
VAR TOT	1.07	23	0.05		

Réponse physiologique de la fêverole (*Vicia faba minor*L.) au stress thermique

La proline :

MOYENNES DES GROUPES HOMOGENES SELON LE TEST DE NEWMAN-KEULS SEUIL 5% :

Le nombre de nodules :

Traitements	Groupes homogènes
5	A
15	BC
25	BC
2	BC
30	BC
10	BC
35	BC
20	B

VARIANCES	SCE	DDL	CM	CV	SIGNIFICATION
VAR TEMP	26735.63	7	3819.38	14%	N.S
VAR RESID	3126.00	16	195.38		
VAR TOT	29861.63	23	1293.33		

Le nombre de nodules :

VARIANCES	SCE	DDL	CM	CV	SIGNIFICATION
VAR TEMP	674.95	7	96.42	10%	THS
VAR RESID	15.41	16	0.96		
VAR TOT	690.36	23	30.02		

Taux de nitrates:

MOYENNES DES GROUPES HOMOGENES SELON LE TEST DE NEWMAN-KEULS SEUIL 5% :

Stade gousse :

VARIANCES	SCE	DDL	CM	CV	SIGNIFICATION
VAR TEMP	360.51	7	51.50	2%	THS
VAR RESID	0.00	16	0.00		
VAR TOT	360.52	23	15.67		

ARA:

MOYENNES DES GROUPES HOMOGENES SELON LE TEST DE NEWMAN-KEULS SEUIL 5% :

VARIANCES	SCE	DDL	CM	CV	SIGNIFICATION
VAR TEMP	10.34	7	1.48	29%	THS
VAR RESID	2.97	16	0.19		
VAR TOT	13.31	23	0.58		

ARN :

MOYENNES DES GROUPES HOMOGENES SELON LE TEST DE NEWMAN-KEULS SEUIL 5% :

La Proline :

Traitements	Groupes homogènes
5	A
2	A
15	B
25	B
10	B
35	B
20	B
30	B

VARIANCES	SCE	DDL	CM	CV	SIGNIFICATION
VAR TEMP	0.24	7	0.03	19%	S
VAR RESID	0.17	16	0.01		
VAR TOT	0.40	23	0.02		

La Proline :

Réponse physiologique de la fève (Vicia faba minorL.) au stress thermique

MOYENNES DES GROUPES HOMOGENES SELON LE TEST DE NEWMAN-KEULS SEUIL 5% :

Le nombre de nodule :

Traitements	Groupes homogènes
2	A
15	A
20	A
35	A
5	AB
10	AB
30	AB
25	B

VARIANCES	SCE	DDL	CM	CV	SIGNIFICATION
VAR TEMP	2376.00	7	339.43	11.6%	NS
VAR RESID	1372.00	16	85.75		
VAR TOT	3748.00	23	162.96		

Le nombre de nodule :

VARIANCES	SCE	DDL	CM	CV	SIGNIFICATION
VAR TEMP	424.31	7	60.62	8.0%	THS
VAR RESID	12.47	16	0.78		
VAR TOT	436.78	23	18.99		

Taux de nitrates:

MOYENNES DES GROUPES HOMOGENES SELON LE TEST DE NEWMAN-KEULS SEUIL 5% :

Traitements	Groupes homogènes
25	A
30	A
20	A
15	A
35	A
5	B
2	B
10	B